

Ester Tartaroti

**Estudo Citogenético em Triatomínos do  
Gênero *Panstrongylus* (Triatominae, Heteroptera)**



1910000807





ESTER TARTAROTTI

**ESTER TARTAROTTI**

ESTUDO CITOGENÉTICO EM TRIATOMÍNEOS DO GÊNERO  
*PANSTRONGYLUS* (TRITOMINAE, HETEROPTERA)

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM TRIATOMÍNEOS DO GÊNERO  
*PANSTRONGYLUS* (TRITOMINAE, HETEROPTERA)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração Genética).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tarcília Vilas de Azoredo Oliveira



São José do Rio Preto  
1998

**ESTER TARTAROTTI**

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM TRIATOMÍNEOS DO GÊNERO  
*PANSTRONGYLUS* (TRITOMINAE, HETEROPTERA)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Genética).

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



807/98

São José do Rio Preto  
1998

## AGRADECIMENTOS

Para efetuação de um trabalho os principais ingredientes são a organização, troca de informações e companheirismo entre as pessoas. Todos esses aspectos aliados à dedicação e amor por tudo aquilo que se faz gera o fruto de mais uma etapa concluída em nossas vidas.

Agradeço à união de carinho e consideração por todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização desta dissertação de mestrado e, especialmente, à união de reconhecimento pela ação de vida que cada participante trouxe à sua maneira, soube compartilhar.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Maria Tereza Viela de Azeredo Oliveira pelas ensinamentos, dedicação, crítica, compreensão, preciosa amizade e carinho.

A Profa. Dra. Marlene K. Hosaka Kobayashi pelas sugestões valiosas, carinho e apoio na realização de alguns experimentos deste trabalho.

A Profa. Dra. Doralice Galla do Câmpus de Rio Claro pelas importantes sugestões e por tornar este trabalho, atenção e cordialidade.

Ao Prof. Dr. James Robert Curran pela atenção, leitura e correção do abstracto desta dissertação.

A Profa. Dra. Homage Ely Melo de Campos Brinde, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, pelo carinho e atenção na parte burocrática deste trabalho.

A Profa. Dra. Mary Massumi Toyama pela atenção e apoio na organização do ambiente físico que possibilitou a realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wiltonir João Tadei pela atenção e exemplo profissional.

Aos professores do Departamento de Biologia do IBRCE pela contribuição ao meu desenvolvimento científico, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. José S. Barata, Coordenador do Setor do Serviço Central de Apoio ao Aluno, pelo apoio e exemplo profissional.

**Dedico esta dissertação de mestrado a meu marido Miguel Cardoso da Silva pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho e a meu bebê que, por estar em meu ventre, participou intimamente das emoções e ansiedades da etapa final desta obra.**



## AGRADECIMENTOS

*Para efetuação de um trabalho os principais ingredientes são a cooperação, troca de informações e companheirismo entre as pessoas. Todos estes temperos aliados a dedicação e amor por tudo aquilo que se faz gera o fruto de mais uma etapa concluída em nossas vidas.*

*Agradecer é um ato de carinho e consideração por todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização desta dissertação de mestrado e, especialmente, é um ato de reconhecimento pela lição de vida que cada companheiro, a sua maneira, soube compartilhar.*

*Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira pelos ensinamentos, dedicação, crítica, compreensão, preciosa amizade e carinho;*

*À Profa. Dra. Marlene K. Hosaki Kobayashi pelas sugestões valiosas, carinho e apoio na realização de alguns experimentos deste trabalho;*

*À Profa. Dra. Doralice Cella do Câmpus de Rio Claro pelas importantes sugestões à proforma deste trabalho, atenção e cordialidade;*

*Ao Prof. Dr. James Robert Coleman pela atenção, leitura e correção do abstract desta dissertação;*

*À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, pelo carinho e atenção na parte burocrática deste trabalho;*

*À Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama pela atenção e apoio na organização do ambiente físico que possibilitou a realização de parte deste trabalho;*

*Ao Prof. Dr. Wladimir João Tadei pela atenção e exemplo profissional;*

*Aos professores do Departamento de Biologia do IBILCE pela contribuição ao meu amadurecimento científico, incentivo e amizade;*

*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, pelo fornecimento dos triatomíneos utilizados no presente trabalho. Aos amigos e funcionários deste Insetário, Sr. João Molina Gil e Sr. Bento Gregório de Jesus, pela disponibilidade, atenção e ajuda.*

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pela consideração, apoio e carinho;

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação pelo atendimento e serviços prestados;

Aos funcionários da Biblioteca do IBILCE, pela competência e dedicação no atendimento. Em especial aos funcionários Elza Mítico Sato, Gislaine de Lourdes Gameiro, Maria do Carmo Junqueira, Rogério Pereira Vaz, Rosana Pires Borelli.

A todos os amigos do Curso de Pós-Graduação, pela convivência e apoio tanto nos momentos mais difíceis quanto nas horas de alegria;

À chefia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), UNESP, por proporcionar ambiente de trabalho adequado,

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-UNESP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento financeiro;

Ao meu marido Miguel Cardozo da Silva pela presença constante e aos Meus Pais, Geraldo Antonio Tartarotti e Ida Helena Tartarotti, pelo amor e carinho.

Modificado de

Universidade de

Como se faz uma tese (1994)



## SUMÁRIO

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS                 | 8  |
| LISTA DE TABELAS                 | 16 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | 17 |
| Resumo                           | 18 |
| 1 INTRODUÇÃO                     | 20 |
| 1.1 Importância Médico-Santana   | 21 |
| 1.2 Apêndices                    | 22 |
| 1.3 Apêndices                    | 23 |
| 1.4 Proposição                   | 24 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS             | 25 |
| 2.1 Espécies e materiais         | 26 |
| 2.2 Equipamentos                 | 27 |
| 2.3 Manipulação                  | 28 |
| 2.4 Orçamentos e E               | 29 |
| 2.5 Descrições                   | 30 |
| 2.6 Preparação                   | 31 |
| 2.6.1 Extrair                    | 32 |
| 2.6.1.1 Contrac                  | 33 |
| 2.6.2 Trabalho                   | 34 |
| 2.6.2.1 Preparação               | 35 |
| 2.6.2.1.1 Impropriedade          | 36 |
| 2.6.2.1.2 Pontoamento            | 37 |
| 2.6.2.1.3 Bandagem               | 38 |
| 2.7 Procedimento                 | 39 |
| 2.8 Fotomicrografias             | 40 |
| 3 RESULTADOS                     | 41 |
| 3.1 Sistema Reprodutor           | 42 |
| 3.2 Morfologia                   | 43 |

Modificado de:

Umberto Eco

Como se faz uma tese (1996)

|                                                                                            |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                      | 8    |
| LISTA DE TABELAS.....                                                                      | 16   |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....                                                      | 17   |
| Resumo.....                                                                                | 18   |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                         | 20   |
| 1.1. Importância Médico - Sanitária.....                                                   | 21   |
| 1.2. Aspectos Citogenéticos dos Triatomíneos .....                                         | 29   |
| 1.3. Aplicação de Endonucleases de Restrição à Citogenética de Insetos.....                | 34 ✓ |
| 1.4. Proposição.....                                                                       | 36   |
| 2. MATERIAL E MÉTODO.....                                                                  | 37 ✓ |
| 2.1. Espécies analisadas.....                                                              | 38 ✓ |
| 2.2. Obtenção e Procedência.....                                                           | 38 ✓ |
| 2.3. Manutenção e Alimentação.....                                                         | 38 ✓ |
| 2.4. Órgãos e Estádios Analisados.....                                                     | 39 ✓ |
| 2.5. Dissecção dos Insetos.....                                                            | 39 ✓ |
| 2.6. Preparações Citológicas .....                                                         | 40   |
| 2.6.1. Esmagamento Celular .....                                                           | 40 ✓ |
| 2.6.1.1. Coloração Padrão: Orceína Lacto-Acética.....                                      | 40   |
| 2.6.2. Tratamentos e Colorações Específicas.....                                           | 40   |
| 2.6.2.1. Preparações citológicas para coloração.....                                       | 40 ✓ |
| 2.6.2.1.1. Impregnação com Nitrato de Prata .....                                          | 40   |
| 2.6.2.1.2. Bandamento-C.....                                                               | 41   |
| 2.6.2.1.3. Bandamento com Endonucleases de Restrição ( <i>Hae</i> III e <i>Alu</i> I)..... | 41 ✓ |
| 2.7. Procedimento para Análise das Lâminas .....                                           | 42 ✓ |
| 2.8. Fotomicrografias.....                                                                 | 42 ✓ |
| 3. RESULTADOS.....                                                                         | 43   |
| 3.1. Sistema Reprodutor Masculino de Triatomíneos.....                                     | 44   |
| 3.2. Morfologia Interna do Túbulo Testicular.....                                          | 45   |



3.3. Coloração com Orceína Lacto-Acética.....50

3.3.1. *Panstrongylus megistus*.....50

3.3.2. *Panstrongylus herreri* .....51

3.4. Impregnação com Nitrato de Prata.....61

3.4.1. *Panstrongylus megistus*.....61

3.4.2. *Panstrongylus herreri* .....62

3.5. Bandamento-C.....73

3.5.1. *Panstrongylus megistus*.....73

3.5.2. *Panstrongylus herreri* .....74

3.6. Bandamento com Endonucleases de Restrição.....83

3.6.1. *Panstrongylus megistus*.....83

3.6.2. *Panstrongylus herreri* .....84

⇒ 4. DISCUSSÃO.....95

4.1. Orceína Lacto-Acética.....96

4.2. Impregnação com Nitrato de Prata.....113

4.3. Bandamento-C.....132

4.4. Bandamento com Endonucleases de Restrição.....146

5. CONCLUSÕES.....168

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....171

Abstract.....188



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- **a)** *Panstrongylus megistus*, macho. **b)** *Panstrongylus herreri*, macho. **c)** *Panstrongylus megistus*, macho (I), *Panstrongylus herreri*, macho (II) (Aumento= 1,3x).

46

Figura 2- *Panstrongylus megistus*. **a)** Visão geral do aparelho reprodutor masculino. **I)** testículo, **II)** vaso deferente, **III)** glândula acessória (Aumento=8,4x). **b)** Disposição dos túbulos seminíferos após dissecação. As regiões **A**, **B**, **C** do túbulo seminífero contém respectivamente: células espermatogoniais; células meióticas e espermátides e espermatozóides (Aumento= 12,6 x).

48

Figura 3- *Panstrongylus herreri*. **a)** Visão geral do aparelho reprodutor masculino: **I)** testículo, **II)** vaso deferente, **III)** glândula acessória (Aumento=8,4 x). **b)** Disposição dos túbulos seminíferos após dissecação. Os túbulos indicados pelos números **6** e **7** são maiores e mais espessos que os demais (Aumento=12,6 x).

49

Figura 4- Cariótipos meióticos das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*. *P. megistus*: **(a)** Metáfase da primeira divisão meiótica e respectivo cariótipo com 9 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais ( $X_1X_2Y$ ). **(b)** Metáfase da segunda divisão meiótica e seu cariótipo ( $9A+X_1X_2Y$ ). *P. herreri*: **(c)** Metáfase da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais ( $X_1X_2Y$ ). **(d)** Metáfase da segunda divisão meiótica e correspondente cariótipo ( $10A+X_1X_2Y$ ). A=autossomos, S=cromossomos sexuais. Escala=5 $\mu$ m.

54

Figura 5- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a-b)** Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com único corpúsculo heteropicnótico. Observa-se também vesículas no interior do corpúsculo e a presença de regiões menos coradas ao redor deste. **(c)** Cisto espermatogonial. **(d)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. Observar os corpúsculos heterocromáticos espalhados no interior do núcleo. As setas indicam corpúsculos heteropicnóticos na periferia do núcleo. **(e-g)** Metáfases espermatogoniais. As setas indicam filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. Escala=10 $\mu$ m.

55

Figura 6- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a-c)** Núcleos no início da prófase I meiótica (estádio confuso) com três corpúsculos heteropicnóticos formados pelos cromossomos sexuais. **(d-e)** Núcleos em estágio mais adiantado da



prófase I. A seta indica os cromossomos sexuais. **(f-h)** Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). As setas indicam os cromossomos sexuais. **(i-l)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 9 bivalentes autossômicos e três cromossomos sexuais indicados pelas setas. **(m-n)** Metáfases da segunda divisão meiótica com 9 autossomos e três cromossomos sexuais. Notar que os autossomos são dispostos em anel e os cromossomos sexuais situam-se no centro deste. Escala=10 $\mu$ m.

56

Figura 7- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a-e)** Anáfases meióticas com ausência de cromossomos de migração tardia. **(f)** Telófases meióticas. **(g-h)** Espermátides no início da espermiogênese. As setas indicam a presença de corpúsculos no início da diferenciação celular. Observar a forma arredondada das células. **(i-n)** Espermátides nos estádios mais adiantados da espermiogênese. Notar que as células tornam-se progressivamente alongadas. As setas indicam diminutos corpúsculos heteropicnóticos. **(o-q)** Espermátides na fase final da espermiogênese. **(r)** Feixes de espermatozóides. Escala=10 $\mu$ m.

57

Figura 8- Túbulos testiculares de *P. herreri* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a-b)** Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com único corpúsculo heteropicnótico. Notar presença de vesículas no interior do corpúsculo. **(c-d)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. Observar os corpúsculos heteropicnóticos espalhados no interior do núcleo. As setas indicam corpúsculos heteropicnóticos na periferia do núcleo. **(e-h)** Metáfases espermatogoniais. As setas indicam filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. Escala=10 $\mu$ m.

58

Figura 9- Túbulos testiculares de *P. herreri* submetidos à técnica de orceína-lacto acética. **(a-c)** Núcleos no início da prófase I meiótica (estádio confuso). As setas indicam os corpúsculos heteropicnóticos formados pelos cromossomos sexuais. **(d-h)** Núcleos em estágio mais adiantado da prófase I. As setas indicam os cromossomos sexuais heteropicnóticos. **(i-l)** Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). As setas indicam os cromossomos sexuais. **(m-n)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e três cromossomos sexuais indicados pelas setas. **(o-q)** Metáfases da segunda divisão meiótica com 10 autossomos e três cromossomos sexuais. Notar que os autossomos são dispostos em anel e os cromossomos sexuais situam-se no centro deste. Escala=10 $\mu$ m.

59

Figura 10- Túbulos testiculares de *P. herreri* submetidos à técnica de orceína-lacto acética. **(a-g)** Anáfases meióticas. As setas indicam cromossomos com migração tardia. **(h-i)** Espermátides no início da



diferenciação celular. As setas indicam a presença de corpúsculos heteropicnóticos na periferia da célula. Observar a forma arredondada das células. **(j-o)** Espermátides nos estádios mais adiantados da espermiogênese. Notar o alongamento progressivo das células. **(p-q)** Espermátides na fase final da espermiogênese. Escala=10µm.

60

Figura 11- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. **(a-b)** Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com corpúsculo impregnado pela prata. Notar vesículas no interior do corpúsculo e o halo nucleolar ao redor deste. **(c-h)** Núcleos interfásicos das células espermatozoniais dos túbulos. Observar corpúsculos nucleolares dispersos em (c). As setas indicam corpos nucleolares que ora estão no centro, ora na periferia do núcleo. **(i-q)** Núcleos em prófase I da meiose (estádio confuso). As setas maiores indicam a região nucleolar. Notar a tênue ligação dos autossomos ao nucléolo. A seta menor indica os cromossomos sexuais fortemente marcados. Em (n-o) pode ser observada uma menor marcação na região nucleolar (pontas de seta). Escala=10µm.

65

Figura 12- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. **(a-l)** Núcleos em prófase I da meiose (diplóteno). As setas maiores indicam a região nucleolar e as menores indicam a ligação de autossomos ao nucléolo. **(m-p)** Núcleos em prófase I da meiose (diacinese). As setas maiores indicam a região nucleolar e as menores a ligação de autossomos à essa região. Observar que nesta fase houve uma tênue impregnação pelos íons prata. Escala=10µm.

66

Figura 13- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. **(a)** Núcleo em prófase I da meiose (diacinese). Notar a leve impregnação pelos íons prata na região nucleolar e a ligação de um autossomo a esta região. **(b-o)** Metáfases da primeira divisão meiótica. As pontas de seta indicam corpúsculos impregnados pelos íons prata ligados a autossomos. As setas assinalam corpúsculos e fragmentos nucleolares dispersamente localizados. Escala=10µm.

67

Figura 14- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. **(a-b)** Metáfases da primeira divisão meiótica. As pontas de seta indicam os cromossomos sexuais e as setas fragmentos e corpúsculos nucleolares dispersos na célula. **(c-i)** Metáfases da segunda divisão meiótica. A ponta de seta assinala os cromossomos sexuais e as setas indicam corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata. **(j-m)** Anáfases meióticas. As setas indicam corpúsculos e fragmentos



impregnados pelos íons prata. **(n-o)** Telófases meióticas com setas indicando fragmentos nucleolares. **(p-q)** Espermátides no início da espermiogênese com presença de corpúsculos nucleolares. **(r)** Espermátides em estágio mais adiantado da espermiogênese com ausência de marcação pelos íons prata. Escala=10µm.

68

Figura 15- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. **(a-b)** Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com corpúsculo impregnado pelos íons prata. Notar a presença de vesículas no interior deste corpúsculo e o halo nucleolar levemente marcado ao redor deste e em certas partes da cromatina. **(c-g)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais dos túbulos. Notar a presença de corpúsculos nucleolares dispersos em (c). As setas assinalam regiões nucleolares centrais e periféricas ao núcleo. **(h-p)** Núcleos em prófase I da meiose (estádio confuso). Notar a ligação de autossomos ao nucléolo. As setas maiores indicam corpúsculos nucleolares e a menor indica os cromossomos sexuais fortemente impregnados em (p). Escala=10µm.

69

Figura 16- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. **(a-c)** Núcleos da prófase I da meiose (estádio confuso). As setas indicam autossomos ligados ao corpúsculo nucleolar. **(d-m)** Núcleos diplotênicos. As setas maiores indicam corpúsculos nucleolares, provavelmente envolvendo os cromossomos sexuais e as menores assinalam a ligação de autossomos à região nucleolar. **(n-q)** Núcleos da prófase I da meiose (diacinese). Notar os cromossomos sexuais fortemente impregnados pelos íons prata. As setas indicam ligações cromatínicas entre alguns autossomos e os cromossomos sexuais. Escala=10µm.

70

Figura 17- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. **(a-b)** Núcleos da prófase I da meiose (diacinese). Observar os cromossomos sexuais fortemente corados pelo nitrato de prata (pontas de seta). **(c-j)** Metáfases da primeira divisão meiótica. As pontas de seta assinalam os cromossomos sexuais e as setas indicam corpúsculos e fragmentos nucleolares dispersos na célula. **(l-n)** Metáfases da segunda divisão meiótica. Notar o bloco formado pelos cromossomos sexuais no centro do anel de autossomos. As setas indicam corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata. Escala=10µm.

71

Figura 18- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. **(a-c)** Metáfases da segunda divisão meiótica. Observar a disposição anelar dos autossomos com os



cromossomos sexuais ao centro. As setas indicam corpúsculos e fragmentos nucleolares. **(d-l)** Anáfases meióticas. As setas maiores indicam cromossomos de migração tardia e as menores assinalam corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata. **(m-p)** Espermatídes na fase inicial da espermiogênese. Observar a presença de um corpúsculo nucleolar em cada célula. **(q-s)** Espermatídes em estágio de diferenciação mais adiantado com ausência de impregnação pelos íons prata. Escala=10µm.

72

Figura 19- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de bandamento-C. **(a-b)** Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com único corpúsculo heterocromático. **(c-e)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. Observar os corpúsculos heterocromáticos espalhados no interior do núcleo em (c). As setas indicam dois ou três corpúsculos heterocromáticos na periferia do núcleo. **(f)** Metáfase espermatogonial. As setas indicam regiões cromossômicas banda-C positivas. **(g-i)** Núcleos no início da prófase I meiótica (estádio confuso) com três corpúsculos heterocromáticos, provavelmente os cromossomos sexuais. **(j-q)** Núcleos em fase mais avançada da prófase I meiótica (estádio confuso). Notar que as regiões heterocromáticas são bastante espalhadas ao longo dos cromossomos. As setas indicam o bloco heterocromático formado pelos cromossomos sexuais. Escala=10µm.

77

Figura 20- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de bandamento-C. **(a-b)** Núcleos no estágio confuso da prófase I meiótica com regiões heterocromáticas dispersas ao longo dos cromossomos. Notar o bloco heterocromático formado pelos cromossomos sexuais (seta). **(c-t)** Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). As setas indicam os cromossomos sexuais. Notar que ora os cromossomos X apresentam-se heterocromáticos (j, o, q) e ora eucromáticos (f, g, l). Escala=10µm.

78

Figura 21- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de bandamento-C. **(a-c)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 9 bivalentes autossômicos e três cromossomos sexuais indicados pelas setas. **(d-f)** Metáfases da segunda divisão meiótica com 9 autossomos e três cromossomos sexuais unidos por pontes eucromáticas. Notar a posição dos heterocromossomos no centro do anel formado pelos autossomos. **(g-m)** Anáfases meióticas com ausência de cromossomos de migração tardia. **(n-o)** Telófases meióticas com citocinese. **(p-q)** Espermatídes no início da espermiogênese. As setas indicam a presença de corpúsculos heterocromáticos que desaparecem durante a diferenciação celular **(r)**. **(s-t)** Feixes de espermatozóides desprovidos de heterocromatina. Escala=10µm.

79



Figura 22- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos à técnica de bandamento-C. **(a-b)** Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com único corpúsculo heterocromático. **(c)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. As setas indicam dois ou três corpúsculos heterocromáticos na periferia do núcleo. **(d-e)** Núcleos em início de prófase I meiótica com vários pontos heterocromáticos. As setas indicam os corpos heterocromáticos formados pelos cromossomos sexuais. **(f-i)** Estádio mais adiantado da prófase (estádio confuso) com marcações heterocromáticas geralmente nas regiões teloméricas. As setas indicam o bloco heterocromático formados pelos cromossomos sexuais. Escala=10µm.

80

Figura 23- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos à técnica de bandamento-C. **(a-h)** Núcleos em estágio confuso da prófase I meiótica com corpúsculos heterocromáticos nas regiões cromossômicas centrais (setas maiores) e terminais (setas menores). Notar o bloco heterocromático formado pelos cromossomos sexuais. **(i-r)** Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno-diacinese). As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. Escala =10µm.

81

Figura 24- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos à técnica de bandamento-C. **(a-c)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e três cromossomos sexuais indicados pelas setas. **(d-e)** Metáfases da segunda divisão meiótica com 10 autossomos e três cromossomos sexuais heterocromáticos dispostos no centro do anel dos autossomos. Observar que os cromossomos sexuais apresentam-se unidos por pontes eucromáticas. **(f-h)** Anáfases meióticas, as setas indicam cromossomo com migração tardia. **(i-j)** Telófases meióticas com citocinese. **(l-m)** Espermátides no início da espermiogênese. As setas indicam a presença de corpúsculos heterocromáticos que desaparecem no decorrer da diferenciação celular. **(n-o)** Espermátides em um estágio mais adiantado da espermiogênese. A seta indica pequeno corpúsculo heterocromático. **(p)** Feixes de espermatozóides. Escala= 10µm.

82

Figura 25- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. **(a-f)** Núcleos poliplóides. **(a e d)** bandamento-C, com único corpúsculo heterocromático. **(b-c)** *Hae* III. Notar que o halo ao redor do corpúsculo está digerido pela endonuclease e que a cromatina nuclear também apresenta evidências de digestão. **(e-f)** *Alu* I. Notar que a cromatina nuclear e halo ao redor do corpúsculo heterocromático não foram digeridos. Escala=10µm.

88



Figura 26- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. **(a-h)** Início de prófase I (estádio confuso). As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. **(a e e)** Bandamento-C. **(b-d)** *Hae* III. **(f-h)** *Alu* I. **(i-q)** Prófase I da meiose, paquíteno. **(i e n)** Bandamento-C. Notar a heterocromatina espalhada ao longo dos cromossomos. **(j-m)** *Hae* III. As setas indicam autossomos apresentando um padrão de digestão enzimática que alterna bandas claras e escuras. **(o-q)** *Alu* I. As setas indicam a presença de heterocromatina nas regiões terminais dos cromossomos. Escala=10µm.

89

Figura 27- Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. **(a-h)** diplóteno. **(a e e)** Bandamento-C. As setas indicam os cromossomos X em estados hetero e eucromático. **(b-d)** *Hae* III. Notar os cromossomos sexuais resistentes a ação enzimática (setas). **(f-h)** *Alu* I. Observar os cromossomos sexuais, também resistentes a ação enzimática (setas). **(i-s)** Metáfases da segunda divisão meiótica. **(i e o)** Bandamento-C. **(j-n)** *Hae* III. **(p-s)** *Alu* I. Escala=10µm.

90

Figura 28- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. **(a-f)** Núcleos poliplóides. **(a e d)** Bandamento-C, com presença de único corpúsculo heterocromático. **(b-c)** *Hae* III. Notar que os núcleos apresentam o mesmo padrão cromatínico do bandamento-C. **(e-f)** *Alu* I. Observar padrão cromatínico semelhante ao do bandamento-C. Escala=10µm.

91

Figura 29- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. **(a-h)** Prófase I (estádio confuso). **(a e e)** Bandamento-C. As setas indicam pontos heterocromáticos na porção terminal dos cromossomos. **(b-d)** *Hae* III. As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. **(f-h)** *Alu* I. As setas indicam regiões heterocromáticas coincidentes com as da banda C. **(i-q)** Prófase I da meiose em estágio mais adiantado. **(i e n)** Bandamento-C. As setas indicam os cromossomos sexuais. **(j-m)** *Hae* III. Notar que os cromossomos X estão digeridos (pontas de seta). **(o-q)** *Alu* I. As setas indicam os cromossomos sexuais totalmente heterocromáticos. Escala=10µm.

92

Figura 30- Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. **(a-h)** Prófase I (paquíteno). **(a e e)** Bandamento-C. As setas indicam regiões heterocromáticas terminais. **(b-d)** *Hae* III. As setas



indicam regiões dos autossomos digeridas pela endonuclease. **(f-h)** *Alu* I. Notar que as regiões heterocromáticas do bandamento-C e de digestão enzimática coincidem, indicando serem do mesmo tipo de heterocromatina (setas). **(i-q)** Início de diplóteno (prófase I, estágio confuso). **(i e n)** Bandamento-C. As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. **(j-m)** *Hae* III. Notar que os cromossomos X apresentam-se digeridos pela endonuclease de restrição (pontas de seta). **(o-q)** *Alu* I. As setas assinalam os cromossomos sexuais não digeridos pela ação enzimática. Escala=10µm.

93

Figura 31- Túbulos testiculares de *P. herreri* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. **(a-i)** Prófase I da meiose (diplóteno). **(a e f)** Bandamento C. As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. **(b-e)** *Hae* III. As pontas de seta indicam uma tênue digestão nos cromossomos X. **(g-i)** *Alu* I. As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. **(j-r)** Metáfases da primeira e segunda divisão meiótica. **(j e o)** Bandamento-C. As setas indicam os cromossomos sexuais. **(l-n)** *Hae* III. As pontas de seta indicam um dos cromossomos sexuais, provavelmente o X, digerido. **(p-r)** *Alu* I. Notar que os cromossomos sexuais apresentam-se totalmente heterocromáticos (setas). Escala=10µm.

94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Comparação dos principais resultados obtidos através da técnica de orceína lacto-acética, em testículos de machos adultos jovens das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*.

53

Tabela 2-Comparação dos principais resultados obtidos através da impregnação com nitrato de prata, em testículos de machos adultos jovens das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*.

64

Tabela 3- Comparação dos principais resultados obtidos através da técnica de bandamento-C, em testículos de machos adultos jovens das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*.

76

Tabela 4-Comparação dos principais resultados obtidos através das técnica de endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I e bandamento-C, em testículos de machos adultos jovens da espécie *Panstrongylus megistus*.

86

Tabela 5-Comparação dos principais resultados obtidos através das técnica de endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I e bandamento-C, em testículos de machos adultos jovens da espécie *Panstrongylus herreri*.

87



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A= autossomos

B23= numatrina

Be= bainha epitelial

C= constitutiva

C23= nucleolina

Cap= célula apical ou de Verson

Ce= canal eferente

CF= centro fibrilar

CFD= componente fibrilar denso

CG= componente granular

Dej= duto ou canal ejaculador

Epc= espermátócitos

Epd= epididímo

Epg= espermatogônias

Epm= espermátides

Epz= espermatozóides

ER= endonucleases de restrição

Ger= germário

Gls= glândulas acessórias

Gp= gonóporo

M E= Microscopia eletrônica

MI= meiose I

MII= meiose II

Pb= pares de base

PCC= Cromossomos pré-condensados da fase G1

Pen= pênis

RNP= ribonucleoproteínas

RON= Região Organizadora Nucleolar

S= sexuais

Te= testículos

Vd= vaso deferente

Vs= vesículas seminais

Zc= zona de crescimento

Zm= zona de maturação

Zt= zona de transformação

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo comparativo entre duas espécies do gênero *Panstrongylus* (*P. herrei* e *P. megistus*), através da análise das diversas fases da espermatogênese, acompanhamento do ciclo nucleolar, localização das regiões organizadoras nucleolares (RONs), estudo do padrão de distribuição das regiões heterocromáticas nos cromossomos meióticos e correlação das diferenças e semelhanças encontradas no estudo citogenético de *P. herrei* e *P. megistus*, afim de corroborar o entendimento do processo evolutivo ocorrido entre estas espécies.

As preparações citológicas dos testículos foram obtidas pelo método convencional de esmagamento celular e posterior aplicação das técnicas citogenéticas de coloração com orceína lacto-acética, impregnação com nitrato de prata, bandamento-C e bandamento com endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I.

*Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herrei* apresentaram cariótipo  $2n=18+X_1X_2Y$  e  $2n=20+X_1X_2Y$ , respectivamente. Nos Heteroptera as espécies mais primitivas pertencem a família Pentatomidae com  $2n=14$  cromossomos e sistema sexual XY para machos. A maior parte dos outros heterópteros possui um complemento cromossômico relativamente mais alto sendo considerados mais recentes. Assim em termos evolutivos *Panstrongylus herrei* é uma espécie mais derivada que *Panstrongylus megistus*. As duas espécies não apresentaram constrição primária sugerindo que estes cromossomos são holocinéticos, corroborando portanto a hipótese de cromossomos holocêntricos em Heteroptera.

O sistema de cromossomos sexuais em *Panstrongylus* é do tipo  $X_1X_2Y$  e os experimentos com bandamento-C e endonucleases de restrição indicam que os dois cromossomos X de *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herrei*, possuem comportamento semelhante quanto ao grau de digestibilidade e regiões banda-C positivas e negativas, sugerindo uma origem em comum por fragmentação de um único X, hipótese também mais aceita encontrada na literatura. Os cromossomos X são mais frágeis que o Y, e a sobrevivência dos fragmentos é facilitada pelo mecanismo de meiose pós-reducional e holocentricidade destes cromossomos.

Em *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herrei* os cromossomos sexuais foram positivamente heteropicnóticos no início da prófase I e mantiveram-se juntos no estágio confuso. Na metáfase I os heterocromossomos apresentaram-se perifericamente, individualizados e isopicnóticos como os demais autossomos. Na metáfase II os heterocromossomos encontraram-se unidos no centro do anel de autossomos, sugerindo a formação de um pseudo-trivalente reforçando assim o comportamento pós-reducional destes cromossomos.

Observou-se formações de cistos celulares na espermatogênese. As células são contidas em um invólucro de origem mesodérmica e permanecem neste estado



até a sua diferenciação, posteriormente sendo liberadas na testicolífa. Os espermatócitos sofrem grande quantidade de multiplicações no interior do cisto. Tais multiplicações causam a redução do seu volume, sendo que este problema é solucionado através do fornecimento de energia pelos núcleos poliplóides. *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herrei* apresentaram estes núcleos com um único corpúsculo heterocromático.

Na impregnação pelos íons prata, os heterocromossomos de *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herrei* exibiram atividade organizadora nucleolar com forte impregnação na prófase I meiótica, também foram observadas ligações de um ou dois autossomos à região nucleolar. Os dados sugerem fragmentação do nucléolo, pois a partir da metáfase I são notados corpúsculos e fragmentos nucleolares no interior celular. Também verificou-se que nestes Heteroptera ocorre reativação de síntese de RNAr pós-meiótica, provavelmente relacionada a diferenciação celular.

Na análise dos cromossomos meióticos com bandamento-C, *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herrei*, apresentaram bandas intersticiais e terminais nos autossomos, padrão comum em Heteroptera. As bandas terminais corroboram a hipótese que nos cromossomos holocêntricos a heterocromatina é preferencialmente localizada próxima aos telômeros. Os cromossomos sexuais em *P. herrei* comportaram-se de forma totalmente heterocromática na espermatogênese e em *P. megistus* os cromossomos X alternaram entre bandamento positivo e negativo. Houve coincidência entre regiões banda-C+ e RON nos cromossomos sexuais e nas espermátides no início da diferenciação.

As endonucleases de restrição (ER), *Hae* III e *Alu* I, em *P. megistus* e *P. herrei*, apresentaram grande parte dos padrões de bandamento enzimáticos semelhantes ao bandamento-C, sugerindo a presença de um mesmo tipo de heterocromatina nas regiões coincidentes. Entretanto, alguns padrões de digestão da heterocromatina foram distintos como nos núcleos poliplóides de *P. megistus* (*Hae* III), prófase I de *P. herrei* (*Hae* III) e no paquíteno de ambas espécies (*Hae* III e *Alu* I). Os cromossomos X de *P. herrei* tratados com *Hae* III apresentaram sinais de digestão enzimática, sugerindo presença de heterocromatina diferente daquela do bandamento-C. Já em *P. megistus* estes cromossomos apresentaram-se heterocromáticos também exibindo padrão distinto do bandamento-C, em que os cromossomos X mostraram-se alternativamente heterocromáticos. Este trabalho sugere que outros elementos além da presença de sítios de reconhecimento, tais como, grau de empacotamento da cromatina e interação DNA-proteína, atuam nos resultados das ERs, pois, *P. megistus* e *P. herrei*, apresentaram certo padrão de digestão nos estádios iniciais da espermatogênese, porém os cromossomos metafásicos foram praticamente inacessíveis a atuação das endonucleases.

### 1.1. Importância Médico - Sanitária.

A doença de Chagas é uma parasitose de natureza endêmica com importante participação entre as doenças cardíacas na América do Sul. Segundo a Organização Mundial de Saúde é estimado que por volta de 20 milhões de indivíduos são afetados pelo *Trypanosoma cruzi* nas áreas endêmicas (Kirschner, 1993; Dias, 1993; Cardoso et al., 1995; Grimalta et al., 1995; Luquetti, 1995; Guhl & Schofield, 1996; Altche et al., 1996; Carvalho et al., 1996; Pinche et al., 1996). A doença de Chagas é a segunda principal endemia da América Latina, sendo a malária a primeira. Nas áreas endêmicas são estimadas, aproximadamente, 50.000 mortes por ano, resultantes da doença crônica por *T. cruzi* (Altche et al., 1996; Galei & Kirschner, 1996). Segundo Guhl & Schofield (1996) os países endêmicos são: México, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Brasil, Bolívia, Chile, Uruguai e os países da América Central.

O agente etiológico do mal de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e os vetores são os heterópteros hematofagos pertencentes à família Reduviidae, mais conhecidos como triatomíneos, provavelmente pela denominação de sua subfamília Triatominae. Os vetores do mal de Chagas são conhecidos popularmente de "barbeiros" ou "emeças" pelo fato de picar à noite a face descoberta da pessoa adormecida. Porém, o motivo mais relevante para a transmissão da doença é o hábito que estes triatomíneos têm de defecar após a hematofagia. Nesse momento, as fezes são evacuadas sobre os olhos, nariz, boca e feridas. Nesse momento, as mãos do indivíduo afetado são contaminadas com o parasita, que é transferido para a mucosa do indivíduo.

É interessante ressaltar que o *Trypanosoma cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*. As formas infectantes, encontradas nas fezes dos triatomíneos, penetram nas células da pele ou mucosa na região da picada e replicam-se intracelularmente principalmente em macrófagos. Nas células podem escapar do compartimento fagocitário e multiplicar-se livremente. Apresentam um ciclo biológico complexo, envolvendo um hospedeiro intermediário invertebrado (vetor) e um hospedeiro definitivo vertebrado (mamífero). São encontradas três formas distintas: a forma flagelada, a forma amastigota, a forma tríplice e a forma epimastigota. A forma flagelada é a forma circulante e infectante (Cardoso et al., 1995). Esta forma é alongada e

## 1. INTRODUÇÃO



### 1.1. Importância Médico - Sanitária.

A doença de Chagas é uma parasitose de natureza endêmica com pronunciada participação entre as doenças cardíacas na América do Sul. Segundo a Organização Mundial de Saúde é estimado que por volta de 20 milhões de indivíduos são infectados pelo *Trypanosoma cruzi* nas áreas endêmicas (Kirchhoff, 1993; Dias, 1993; Cardoso et al., 1995; Grijalva et al., 1995; Luquetti, 1995; Guhl & Schofield, 1996; Altclas et al., 1996; Carvalho et al., 1996; Reiche et al., 1996). A moléstia de Chagas é a segunda principal endemia da América Latina, sendo a malária a primeira. Nas áreas endêmicas são estimadas, aproximadamente, 50.000 mortes por ano, resultantes da infecção crônica por *T. cruzi* (Altclas et al., 1996; Galel & Kirchhoff, 1996). Segundo Guhl & Schofield, (1996) os países endêmicos são: México, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Brasil, Bolívia, Chile, Uruguai e os países da América Central.

O agente etiológico do mal de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e os vetores são os heterópteros hematófagos pertencentes à família Reduviidae, mais conhecidos como triatomíneos, provavelmente pela denominação de sua subfamília Triatominae. Os vetores da moléstia de Chagas são popularmente chamados de "barbeiros" ou "chupanças" pelo fato de picar a face descoberta da pessoa adormecida. Porém, o motivo mais relevante para a transmissão da doença é o hábito que estes triatomíneos têm de defecar após a hematofagia, sendo comum o inseto evacuar sobre os olhos, nariz, boca e vizinhanças. Neste momento, as formas infectantes do parasita são transferidas das fezes do artrópode para a circulação do hospedeiro.

É interessante ressaltar que o *Trypanosoma cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*. As formas infectantes, encontradas nas dejeções dos triatomíneos, penetram nas células da pele ou mucosas na região da picada e replicam-se intracelularmente principalmente em macrófagos. Nas células podem escapar do compartimento lisossomal para o citoplasma, onde se multiplicam intensamente. Apresentam um ciclo biológico complexo, envolvendo um hospedeiro intermediário invertebrado (vetor) e um hospedeiro definitivo vertebrado (mamífero). São encontradas três formas distintas no ciclo de vida do *T. cruzi*: tripomastigota, epimastigota e amastigota. O tripomastigota, forma flagelar sangüínea circulante e infectante (Cardoso et al., 1995). Esta forma é móvel, delgada e



alongada, tem em média 17 $\mu$ m de comprimento, possui propriedades de resistência e de penetrabilidade que facilitam sua função biológica de infectante do ciclo evolutivo e é eliminada em grande quantidade pelas dejeções dos insetos (Pessoa & Martins, 1982). O epimastigota é a forma flagelar presente no tubo digestivo do vetor e a amastigota, forma ovóide de replicação intracelular. Durante a fase aguda da infecção observa-se uma profunda supressão na resposta imune humoral e celular frente a antígenos do parasita (Cardoso et al., 1995).

Os triatomíneos evoluem e procriam realizando hematofagia desde sua primeira fase de vida até adulto, cultivando assim um estreito relacionamento com animais reservatórios (reservatórios silvestres do *T. cruzi* : Marsupiais- gambás, marmotas; Desdentados- tatus; Roedores- camundongos; Morcegos- várias espécies; Carnívoros- irara, furão, cachorro-do-mato, raposas; Primates- macacos, micos; Reservatórios domésticos- gato, cachorro, rato, coelho e o homem). É interessante ressaltar que as aves e os vertebrados pecilotérmicos (lagartos, rãs, ofídeos), embora sejam capazes de alimentar os barbeiros, jamais abrigam o *T. cruzi* em seu organismo, não sendo portanto reservatórios (Dias, 1978; Barreto & Ribeiro, 1979).

Os triatomíneos parecem pertencer a um grupo polifilético, com espécies generalistas exibindo alta variação genética e fenética. É também um grupo especialista, mostrando relativamente reduzida variabilidade populacional, provavelmente associada com uma série de gargalos da garrafa (efeito do fundador) seguida por deriva e modesta seleção. As populações tendem a mostrar uma ampla distribuição geográfica, que pode ser detectada por exemplo, por uma consistente morfometria, marcadores isoenzimáticos e citogenéticos. Existem vários resultados de importância operacional, na Colômbia, por exemplo, onde foi calculado, o fluxo gênico entre populações silvestres e domésticas de *Rhodnius prolixus* parece não ser significativo, conduzindo ao otimismo em relação ao controle das populações domésticas, que podem não ser fortemente influenciadas por invasão silvestre. Similarmente, na Bolívia, há um aumento da evidência de isolamento entre *Triatoma infestans* domiciliado e selvagem, novamente permitindo a eliminação das populações domésticas deste vetor (Guhl & Schofield, 1996).

A evolução dos triatomíneos é um processo de especialização. Desta forma, a maioria dos insetos de importância médica são os mais especializados, e os mais vulneráveis ao controle. Por outro lado, as espécies



mais generalistas seguem este rumo de evolução de forma relativamente rápida e podem adaptar-se aos ecótopos mais estáveis enquanto os originais são destruídos. Estes conceitos aplicam-se claramente ao problema do controle de vetores da doença de Chagas, especialmente com relação às perspectivas de erradicação do *Triatoma infestans* e sua progressiva substituição por espécies secundárias como *Triatoma sordida*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus* (Dias et al., 1994).

A domiciliação de triatomíneos é um fenômeno complexo e ainda não completamente elucidado. Em decorrência disso, várias hipóteses foram sugeridas: mutação genética e posterior adaptação ao domicílio, condições ambientais e climáticas e disponibilidade de alimento e abrigo (Steindel et al., 1994).

Estudos entomológicos demonstram que as espécies secundárias vêm aumentando sua densidade nas unidades domiciliares nos últimos anos. Devido ao caráter regional desse fato, a definição do papel primário ou secundário das diferentes espécies de triatomíneos não pode ser um conceito geral, devendo-se considerar o potencial de domiciliação local da espécie e a pressão que as modificações ambientais podem impingir a este processo de domiciliação (Dias et al., 1994).

É importante ressaltar que os triatomíneos nascem sempre livres do *Trypanosoma*, somente contraindo a infecção em qualquer estágio de sua vida, ao sugar o sangue contaminado do homem ou de algum reservatório. Dentre as características biológicas dos triatomíneos podemos citar que são insetos de vida relativamente longa (1 a 2 anos) com evolução de ovo a adulto entre 4 a 7 meses, passando o inseto por 5 estádios ninfais não alados antes de atingir a fase adulta. O barbeiro tem boa *performance* biológica em termos de oviposição (cada fêmea oviposita até 200 ovos em sua vida) e de capacidade de resistência ao jejum (6 a 10 meses). São artrópodes de hematofagismo restrito, mas com ecletismo alimentar que permite sobreviver com qualquer tipo de sangue. Estes insetos têm hábitos noturnos (os adultos alados, que vivem no peridomicílio e domicílio, escondem-se em frestas ou atrás de objetos no interior das casas durante o dia), fotofobia, termotropismo positivo, mimetismo acentuado de certas espécies, presença de substâncias anticoagulantes e anestésicas na saliva e hábito quase que obrigatório de evacuar imediatamente após cada repasto sangüíneo.



Estima-se que no Brasil cerca de oito milhões de pessoas são chagásicas principalmente no meio rural (Neves, 1991) e 10.000 a 20.000 novos casos surgem anualmente (Reiche et al., 1996). A doença de Chagas humana é encontrada em ordem decrescente nos seguintes estados: Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Goiás, Distrito Federal, Sergipe, Bahia, Piauí, Paraná, Paraíba, Pernambuco, Mato Grosso, Alagoas, Mato Grosso do Sul, Acre, Amazonas, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Ceará, Rondônia, Roraima, Espírito Santo, Maranhão (Silveira & Rezende, 1994).

Na Região Amazônica a doença é mais rara em humanos e comum entre animais silvestres, porém com as atuais modificações na ecologia da região é possível que a doença de Chagas venha a transformar-se em um problema de igual proporção às demais regiões (Neves, 1991).

A área originalmente endêmica, ou com risco de transmissão em 1983, correspondia a 36% do território do país, com triatomíneos domiciliados em mais de 2000 municípios. A população sob risco era de aproximadamente 60 milhões, com 4,2% da população rural infectada. É de relevante importância citar que a doença de Chagas é ainda, no grupo das enfermidades infecciosas e parasitárias, a terceira causa de óbito (13,5%). O número absoluto de óbitos na década passada (1980/90) foi de aproximadamente 6000/ano, o que, por si só justifica ainda todo o investimento no controle da doença (Silveira & Rezende, 1994).

A doença de Chagas, primitivamente uma enzootia, passou a constituir um problema de saúde humana a partir da domiciliação dos triatomíneos, provavelmente devido à destruição gradativa dos biótipos naturais, que provocou redução significativa da fauna silvestre com conseqüente escassez de alimentos. Também contribuiu à domiciliação o aparecimento de um tipo rudimentar de habitação rural humana, a cafua ou casa de pau-a-pique, onde os barbeiros encontraram abrigo seguro e alimento abundante representado pelo sangue de animais domésticos e do homem. Algumas espécies de triatomíneos adaptaram-se perfeitamente a esses novos ambientes e os colonizaram. Alterada a biocenose estabeleceu-se um ciclo domiciliar e peridomiciliar independente do ciclo silvestre. Este fato representa um exemplo típico de sinantropia, isto é, adaptação de um animal ao domicílio humano após a alteração do seu ambiente natural.



Na natureza a presença do *Trypanosoma cruzi* parece não afetar significativamente os triatomíneos e mamíferos silvestres naturalmente infectados, o que sugere a existência de um equilíbrio entre as espécies, provavelmente devido ao longo período de adaptação. O aparecimento da doença de Chagas humana é um fato acidental na medida em que o homem entrou em contato com focos naturais e provocou desequilíbrios ecológicos, os quais fizeram com que triatomíneos infectados fossem paulatinamente adaptando-se a habitações rurais humanas de má qualidade.

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

Sob o ponto de vista de controle, os triatomíneos podem ser agrupados da seguinte forma:

Grupo 1- *Triatoma infestans* e *T. rubrofasciata*. 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* e *Triatoma brasiliensis*. 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 de serem nativas e de ocuparem e colonizarem domicílios com muita constância, o fato de invadirem casas mesmo quando não se encontram esgotadas as fontes de alimentação no peridomicílio.

Grupo 3- *Triatoma pseudomaculata* e *T. sordida*. São espécies nativas de diferentes regiões do país. Não são erradicáveis, podendo reinvadir a habitação a partir de seus ecótopos silvestres. Estão aqui reunidas pelo fato de apresentarem marcante ornitofilia, o que as faz vetores, até aqui, menos importantes que *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasilienses*, ainda que



possam colonizar o domicílio, quando uma densidade crítica torna a oferta alimentar no peridomicílio insuficiente.

Grupo 4- *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *R. prolixus*, *Triatoma rubrovaria* e *T. vitticeps*. 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.

Grupo 5- *Triatoma melanocephala*, *T. tibiamaculata*, *T. petrochii*, *T. circummaculata*, *T. lenti*, *T. matogrossensis*, *T. williami*, *Panstrongylus lutzi*, *P. geniculatus*, *P. diasi*, *P. tupynambai*, *P. lignarius*, *Rhodnius pictipes*, *R. domesticus*, *R. robustus*, *R. brethesi*, *Eratyrus mucronatus*, *Psammolestes tertius* e *Microtriatoma trinidadensis*. Todas estas 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 à permanente revisão e atualização, desde que, mudanças no ambiente, sobretudo determinadas por atividades de natureza econômica, podem implicar na instabilidade de focos naturais de espécies ainda não encontradas colonizando ecótopos artificiais (Silveira & Rezende, 1994; Tavares & Azeredo-Oliveira, 1996a).

O processo mais comum da transmissão da doença de Chagas, como já foi citado anteriormente, é o contaminativo pela deposição das fezes do triatomíneo no hospedeiro. Entretanto, existem outros meios de transmissão da moléstia, como por exemplo, o contágio congênito (Brabin, 1992) e por transfusão sangüínea. O *Trypanosoma cruzi* pode também veicular-se nos transplantes de órgãos como o de rins e coração em um processo semelhante ao transfusional (Neves, 1991). Dados epidemiológicos indicam que a transmissão do parasita também pode ocorrer por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados por fezes de triatomíneos, tais como, cana-de-açúcar, banana, milho, feijão. Com relação à carne de animais infectados pode ocorrer infecção após ingestão do alimento cru (Shikanai-Yasuda et al., 1991).

A transmissão congênita, um dos mecanismo de transmissão da moléstia, atinge 1 a 11% das mães chagásicas (Luquetti, 1994). O problema parece estar ligado mais a fetos prematuros e de baixo peso, assim como à natimortalidade. Geralmente podem detectar-se lesões atróficas e granulomatosas nas placentas desses fetos, alí encontrando-se aglomerados



de *Trypanosoma cruzi*. Estudos indicam que o processo de passagem do *Trypanosoma* da mãe ao feto deve ocorrer por volta do quinto mês (Dias, 1978).

Vários inquéritos realizados em bancos de sangue de todo continente americano, na última década, demonstram uma média de prevalência de 3%. Estes dados tornam-se bastante importantes quando se consideram estudos que mostram que 60% dos chagásicos crônicos apresentam *Trypanosoma cruzi* circulando em seu sangue, e que o risco de aquisição de infecção chagásica através de um doador infectado é de 12,5 a 25% para uma única transfusão (Wanderley et al., 1993; Kirchhoff, 1993).

O prevenção da transmissão transfusional do *T. cruzi* é atualmente considerada um importante objetivo do programa de controle das áreas urbanas. Somente cinco países da América Latina (Argentina, Brasil, Honduras, Uruguai e Venezuela) têm adotado leis para realização do *screening* sangüíneo para *Trypanosoma cruzi*. A despeito desta legislação há ainda transfusões de sangue sendo realizadas sem *screening* sorológico prévio, principalmente em pequenas comunidades. Alguns estudos entre doadores de sangue têm confirmado o risco potencial de transmissão transfusional de *Trypanosoma cruzi* e um grande número de infecções provavelmente estão ocorrendo. Em países onde os candidatos a doação não são averiguados para anticorpos anti-*T. cruzi*, como na Bolívia, receptores soro negativos que receberam o *T. cruzi* de sangue infectado mostraram uma incidência de 47% de infecção após 120 dias (Martelli et al., 1992).

Outro problema consiste na migração de indivíduos chagásicos para regiões não endêmicas, pois estes transformam-se em potenciais doadores, acarretando um novo problema em localidades com insuficiente conhecimento para o manejo da doença de Chagas (Luquetti, 1995).

Desde meados de 1970, vários milhões de pessoas têm emigrado para os Estados Unidos de lugares onde o mal de Chagas é endêmico - particularmente a América Central, onde a prevalência de infecção por *Trypanosoma cruzi* é alta (Kirchhoff, 1993). Estimativas sugerem que há no mínimo 100.000 indivíduos infectados nos Estados Unidos principalmente devido a imigrantes de países endêmicos (Reiche et al., 1996), e cada um tem potencial de aproximadamente 20% para transmitir o parasita através de transfusão sangüínea (Dodd, 1995).



Uma incidência de mais de 10.000 pessoas com doença de Chagas adquirida por transfusão sangüínea tem sido estimada no Brasil somente nos últimos anos. Atualmente no Brasil, a transmissão por triatomíneos está quase sob controle, porém, ainda persiste a transmissão por transfusão sangüínea. O principal objetivo para prevenir esta forma de transmissão é um critério sorológico eficiente (Luquetti, 1995).

Desde que milhões de imigrantes de países endêmicos estão agora vivendo nos Estados Unidos e Europa, e estudos epidemiológicos apontam para uma significativa prevalência da doença, tem ocorrido um recente interesse pela doença de Chagas em todo o mundo (Rossi & Bestetti, 1995; Galel & Kirchhoff, 1996).

À medida em que é controlada a transmissão vetorial, crescem, em importância os mecanismos secundários, em especial a transmissão transfusional. 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 seja hoje produzido em maior número os novos casos da doença de Chagas no país (Silveira & Rezende, 1994).

Conforme o exposto, podemos inferir que o mal de Chagas está intimamente relacionado com a situação sócio-econômica da população e a destruição do habitat natural do vetor da doença. Para um controle efetivo da doença de Chagas é necessário melhoria de infra-estrutura nas habitações rurais, bem como, de seus anexos, tais como, galinheiros, pocilgas, currais, pois o peridomicílio contribui para manutenção de grandes populações de triatomíneos próximos as moradias. Deve-se ainda conscientizar a população da necessidade de preservação ambiental. Dentre outras medidas, as mais imediatas referem-se ao controle ao triatomíneo por meio de inseticidas e seleção minuciosa e rigorosa dos doadores de sangue.

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



## 1.2. Aspectos Citogenéticos dos Triatomíneos

A grande maioria dos membros da subfamília Triatominae tem 10 pares de autossomos, um par de cromossomos sexuais ou múltiplos cromossomos sexuais. Somente três deles mostram 9 ou 11 pares de autossomos: *Panstrongylus megistus* (9A), *Triatoma nitida* (9A) e *Triatoma rubrofasciatus* (11A). O número modal de cromossomos em triatomíneos é 22 (20 + XY) (Ueshima, 1966). Os múltiplos cromossomos X são originados pela simples fragmentação do X original (Ueshima, 1979).

O estudo citogenético dos triatomíneos revelou que seus cromossomos possuem cinetócoro difuso, isto é, distribuído ao longo do cromossomo e não localizado na região do centrômero e uma forma não usual de meiose, onde a segregação dos cromossomos sexuais é pós-reducional (De Vaio et al., 1985).

Retrospectivamente, as pesquisas citogenéticas em Triatomíneos iniciaram-se em 1948 com Schreiber & Pellegrino com o estudo cariotípico 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*. Os autores, além dos aspectos cariotípicos, também mencionaram os fenômenos da heteropicnose presentes em certos autossomos de *Triatoma infestans* e fenômenos análogos menos evidentes em *T. platensis*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *T. nitida*. Em *Triatoma infestans* resultou evidente o fato de que três autossomos, de tamanho maior do que os demais, aparecem nitidamente heteropicnóticos e ligados ao grupo X e Y na fase inicial da diacinese, logo após o estágio denominado estágio confuso (estádio da prófase meiótica que precede imediatamente a diacinese). Provavelmente estes 3 cromossomos diferenciados em *T. infestans* indicam que possuem ciclo de duplicação precoce em relação aos demais cromossomos desta espécie e que neste comportamento assemelham-se aos cromossomos sexuais, com os quais aparecem ligados por delgados filamentos.

Em 1951, Schreiber & Pellegrino averiguaram o efeito da colchicina em *Triatoma infestans* sobre o processo da espermatogênese. Descreveram o bloqueio das divisões meióticas com separação total ou parcial dos elementos constituintes, as tétrades. Um estudo citoquantitativo sobre os estádios normais da espermatogênese nesta espécie (gônias, espermátócitos I, espermátócitos II e espermátídes) indicou os padrões cariométricos das fases



haplóide, diplóide, tetraplóide. O estudo cariométrico das espermatídes na fase imediatamente sucessiva à segunda divisão meiótica revelou, nos indivíduos tratados com colchicina, valores cariométricos correspondentes a relação 4:2:1. Este fato foi interpretado como um início de espermiogênese nos meiócitos de várias etapas bloqueadas nas suas divisões.

Barth (1956) estudou a espermatogênese de *T. vitticeps* com objetivo especial de comprovar se o heterocromossomo X é fragmentado, como Schreiber e Pellegrino (1950) observaram em algumas espécies da sub-família Triatominae, que apresentam esse cromossomo X em forma de 2 ou 3 corpúsculos. Em *Triatoma vitticeps*, o heterocromossomo X é representado por 3 cromossomos verdadeiros, que se comportam exatamente da mesma forma que o Y. Em comparação com *T. infestans*, não se encontrou, em *Triatoma vitticeps*, heteropicnose dos três autossomos, porém, os quatro heterocromossomos apresentaram coloração bastante acentuada.

Schreiber et al. (1968) publicaram estudos realizados com técnicas cariométricas e autorradiográficas com timidina tritiada, sobre a síntese do DNA durante o processo da espermatogênese a partir das gônias até espermatócito de primeira ordem. O resultados indicaram que a síntese do DNA realiza-se somente nas espermatogônias em multiplicação e na primeira fase do espermatócito de primeira ordem. Este fenômeno foi interpretado como tendo uma fase funcional do espermatócito, provavelmente de preparação dos materiais ativos no processo morfogênético da formação do espermatozóide.

Em 1969, Penalva da Silva & Schreiber pesquisaram sobre a importância taxonômica do número e tamanho relativo dos túbulos testiculares em 12 espécies de Triatominae pertencentes a quatro gêneros diferentes. Foi verificado que os gêneros possuem características próprias, sendo que no gênero *Panstrongylus* as espécies apresentam 7 túbulos de tamanho aproximadamente iguais, nos gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes* as espécies têm 5 túbulos muito curtos e 2 longos, e no gênero *Triatoma*, 3 túbulos curtos, 2 médios e 2 longos.

Schreiber et al. (1972) determinaram o conteúdo de DNA por núcleo e o volume nuclear em várias espécies de triatomíneos (*Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. vitticeps*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus*, *P. herrei* e *Rhodnius prolixus*). Apesar do número cromossômico ser praticamente constante (excetuando-se *P. megistus* e três espécies com X múltiplo), o



conteúdo de DNA apresenta variabilidade significativa. As espécies estudadas podem ser separadas em 3 grupos: o primeiro, com *Rhodnius prolixus* tem 5 unidades convencionais de DNA; o segundo, com *Triatoma platensis*, *T. pseudomaculata*, *P. megistus*, *P. herreri* tem DNA variável entre 11 e 15 unidades, e o terceiro com *T. infestans* e *T. vitticeps* tem entre 16 e 17 unidades de DNA. Especialmente interessante é a diferença entre o primeiro e os demais grupos, pois o conteúdo de DNA está praticamente duplicado ou triplicado.

Os *Pentatomidae* (Hemiptera) estudados em 1956 por Schrader & Schrader revelaram semelhanças com os resultados obtidos nos triatomíneos, ou seja, espécies com igual número de cromossomos têm diferenças no conteúdo de DNA atribuídas à processos de politenização. Segundo Schreiber et al. (1972), parece evidente que nestes animais existe um mecanismo de especiação por duplicação total ou parcial do genoma sem modificar a distribuição deste genoma nos cromossomos que constituem o cariótipo.

Em 1974, Schreiber et al. analisaram híbridos entre *T. infestans* e *T. pseudomaculata*. A esterilidade dos machos F1 foi verificada pela ausência total ou parcial do pareamento dos cromossomos homólogos e o conseqüente bloqueio de pelo menos parte das divisões meióticas, fato que provavelmente reflete um mecanismo de isolamento reprodutivo entre as espécies.

Solari (1979) mencionou o comportamento dos cromossomos meióticos de *T. infestans* como tendo um padrão definido de segregação na primeira metáfase meiótica: 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, o autor acima citado, fez um importante estudo sobre o complexo sinaptonêmico (CS) nesta espécie, a nível de microscopia eletrônica. Apenas os autossomos formam esse tipo de emparelhamento, o que sugere dois mecanismos diferentes de emparelhamento, um operando nos autossomos e outro nos cromossomos sexuais durante o paquíteno.

De Vaio et al. (1985) estudaram diferenças na meiose de machos em três espécies de triatomíneos. Observaram que os três maiores bivalentes autossômicos de *Triatoma infestans* são heteropicnóticos, enquanto *Triatoma rubrovaria* não mostrou nenhum autossomo heteropicnótico. Em *Rhodnius*





*prolixus* identificaram a presença de dois bivalentes autossômicos com blocos heteropicnóticos. Os autores observaram ainda uma associação dos cromossomos sexuais no início da prófase terminal em *T. rubrovaria*, onde estes cromossomos mantinham-se em estreita associação até antes da diacinese. Uma íntima associação entre os cromossomos X e Y foi observada durante o estágio inicial da prófase em *R. prolixus*, e uma associação mais tênue é mantida pelos cromossomos sexuais no estágio confuso e diplotênico.

Azeredo-Oliveira (1990) estudou as áreas: nuclear, nucleolar e heterocromáticas nas células dos túbulos de Malpighi e glândulas salivares, no decorrer do desenvolvimento de *Triatoma vitticeps*, e os aspectos da atividade organizadora nucleolar, heterocromatina e meiose em testículos de *T. vitticeps*, *T. pallidipennis*, *T. infestans* e *T. maculata*. A partir das análises das áreas nucleares, nucleolares e heterocromáticas, a autora constatou a presença de uma atividade metabólica maior nas fêmeas do que nos machos e correlacionou este fato às características reprodutivas desse sexo, que, aparentemente apresenta um maior consumo energético. No estudo sobre meiose, a marcação dos cromossomos metafásicos pelo nitrato de prata, apontou os cromossomos sexuais como sendo os portadores das regiões organizadoras nucleolares. A pesquisa também revelou uma associação entre nucléolo e regiões heterocromáticas nos três órgãos estudados. Em todos os casos, o nucléolo circundava a massa heterocromática, evidenciando a íntima relação funcional entre estas estruturas.

Panzer et al. (1992) descreveram variações intraespecíficas em populações naturais de *Triatoma infestans* do Uruguai. Foram observadas variações no número, posição e tamanho das bandas-C heterocromáticas nos três maiores pares de autossomos da espécie. As variações foram atribuídas a possíveis adições ou deleções na heterocromatina constitutiva, que provavelmente representam as principais maneiras de alterações cariotípicas do processo evolutivo de *T. infestans*.

Em 1995, Panzer et al. publicaram um novo trabalho, no qual dados sobre padrão de banda-C, conteúdo de DNA e processo meiótico de machos de *Triatoma platensis* e *Triatoma delpontei* foram comparados com os de *Triatoma infestans*. Verificaram que apesar destas espécies apresentarem certas características semelhantes, tais como, mesmo número diplóide de cromossomos, grandes blocos heterocromáticos autossômicos e cromocentros meióticos heteropicnóticos, elas possuem diferenças quanto ao



comportamento cromossomal meiótico, conteúdo de DNA, além de quantidade e localização específica da heterocromatina. A análise dos dados citogenéticos sugere que *T. infestans* e *T. platensis* são mais relacionados uma com a outra do que *T. delpontei*. Entretanto as diferenças na distribuição e quantidade de heterocromatina não possuem um papel direto na especiação deste grupo.

Tavares & Azeredo-Oliveira (1997a) analisaram cinco espécies de triatomíneos, *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* sugeriram que diferenças no conteúdo de DNA são principalmente devido a variações na quantidade de heterocromatina-C, interpretada como perda ou ganho de regiões-C. Os autores acreditam que a presença de cromocentros meióticos e mitóticos facilitam a transferência de material C-positivo. Em *T. brasiliensis*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* foi observado que o núcleo no estágio confuso da prófase meiótica apresentava um simples cromocentro, formado exclusivamente pela heterocromatina associada aos cromossomos sexuais. Em *T. delpontei*, um grande cromocentro possivelmente originou-se por associação heteróloga das regiões heteropicnóticas de todos bivalentes autossômicos e ambos cromossomos sexuais.

Aspectos como atividade nucleolar na intérfase e em células meióticas também foram analisados nessas cinco espécies de triatomíneos (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997b). Vários blocos nucleolares foram observados nos núcleos poliplóides dos túbulos testiculares, enquanto somente um único corpo nucleolar foi evidente no estágio confuso de *T. brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia* e *T. rubrovaria*, e em *T. sordida* foram observadas duas marcações nucleolares. O número de corpúsculos nucleolares presentes nas espermatídes de cada espécie variou dentre e entre as espécies, sugerindo uma adicional provisão de informação para biossíntese de RNAr. É possível que o aumento no número de corpúsculos nucleolares presentes nos núcleos poliplóides esteja relacionado com o aumento na síntese de RNAr nestes núcleos. Além disso, o fato do núcleo espermatogonial possuir um único corpúsculo nucleolar, enquanto os núcleos poliplóides possuem vários blocos nucleolares, parece refletir tanto diferenças funcionais como metabólicas. No caso do núcleo espermatogonial, uma reduzida necessidade metabólica faz com que um único nucléolo seja suficiente.

A partir da análise da literatura constata-se que pouco tem sido feito a respeito de bandamento cromossômico em triatomíneos. A maior parte das



publicações versam sobre investigação cromossômica comparativa através de coloração convencional dos cromossomos. Nesses trabalhos, os critérios de comparação considerados são basicamente o número e morfologia dos cromossomos, bem como a disposição destes na placa metafásica. Os dados provenientes destas investigações fornecem essencial suporte a respeito da evolução cromossômica destes insetos.

Porém, para se obter dados mais detalhados sobre as características cariotípicas dos triatomíneos, a aplicação de outros métodos de coloração incluindo bandamento com emprego de diferentes endonucleases de restrição pode fornecer indicações sobre outros aspectos da estrutura dos cromossomos através de suas seqüências repetidas, bem como, podem permitir uma análise cromossômica comparativa mais detalhada.

### 1.3. Aplicação de Endonucleases de Restrição à Citogenética de Insetos

Endonucleases de restrição (ERs) são enzimas que cortam DNA em seqüências específicas de nucleotídeos, geralmente 4, 5 ou 6 pares de bases. Por sua seqüência específica, as ERs têm se tornado um valioso reagente em biologia molecular.

Endonucleases de restrição são ferramentas importantes para análise de DNA, pois são capazes de cortar o DNA de dupla hélice após reconhecer sítios específicos. Estas enzimas são produzidas pelas bactérias para defenderem-se de infecções de fago DNA ou RNA impedindo o lise celular (Petitpierre, 1996).

Extensivas listas de endonucleases de restrição incluindo sua seqüência específica, têm sido publicadas e para exemplificar podemos citar: as enzimas *Alu* I (reconhece a seqüência AG/CT), *Bam* HI (reconhece a seqüência G/GATCC), *Cfo* I (reconhece a seqüência GCGC), *Hae* III (reconhece as seqüências GG/CC) (Roberts, 1990 apud Sumner, 1990).

Em insetos, as principais enzimas de restrição aplicadas são *Alu* I, *Hae* III, *Hind* III e *Hinf* I. Embora a maior parte das enzimas produza algum padrão de bandamento, a maioria produz padrões semelhantes aos da banda-C, e cada enzima freqüentemente revela um subconjunto característico de bandas.



Em gafanhoto, Gosálvez et al. (1987 apud Sumner, 1990) notaram que a heterocromatina distamicina-DAPI positiva, que acreditava-se ser rica em A+T, foi digerida pela *Hae* III, a qual cliva seqüências GGCC. Obviamente, a ocorrência de seqüências específicas, importantes na determinação de regiões particulares dos cromossomos, são digeridas pela endonuclease de restrição.

Em *Drosophila melanogaster* a especificidade da digestão está relacionada com as propriedades do DNA satélite dos diferentes blocos de heterocromatina (Sumner, 1990). Em *Drosophila melanogaster* e *Drosophila virilis*, enzimas de restrição foram utilizadas em cromossomos politênicos revelando bandas específicas positivamente coradas após digestão. A localização dos genes RNA 5S em cromossomos politênicos de *Drosophila melanogaster* foi possível pela digestão com a enzima *Alu* I, concordando com experimentos realizados com hibridação *in situ*. Em *Drosophila virilis*, a enzima *Hae* III foi capaz de detectar seletivamente os genes para histonas nos cromossomos politênicos (Lópes-Fernández et al., 1991).

Lópes-Fernández et al. (1988) estudaram cromossomos mitóticos e meióticos do gafanhoto *Pyrgomorpha conica*, utilizando as endonucleases de restrição *Alu* I, *Mbo* I e *Hae* III. Dois importantes resultados foram obtidos: primeiro, as ERs atuaram com sucesso produzindo uma diferenciação linear tanto em cromossomos mitóticos como em meióticos; segundo, mudanças de picnoses que ocorrem na cromatina da primeira prófase para primeira metáfase meiótica, como revelado pela orceína e Giemsa, não afetam a capacidade de digestão das ERs. Estes resultados sugerem que a presença de sítios de restrição são críticos para a obtenção de uma diferenciação linear cromossômica.

Iñigo et al. (1993) demonstraram diferenciação heterocromática entre duas espécies do gênero *Dociostaurus* (Orthoptera, Acrididae). As duas espécies exibem diferenças significativas no conteúdo heterocromático e uma delas contém um segmento heterocromático extra. A aplicação de técnicas de bandamento como endonucleases de restrição e coloração com fluorocromos forneceram maiores informações sobre as características das regiões de heterocromatina constitutiva do que aquelas reveladas pelo método de banda-C. Ambas espécies mostraram-se ricas em bandas GC e com diferente localização dos organizadores nucleolares ativos.

É também importante ressaltar que a atividade das endonucleases de restrição pode ser diferente nos componentes homólogos dos pares cromossômicos. A existência de tais polimorfismos revelados pelas ERs (nem sempre identificadas pelas bandas-C convencionais) indica a presença de diferentes seqüências de bases em áreas homólogas dos cromossomos. Dessa forma, as endonucleases de restrição têm capacidade de detectar diferenças entre regiões cromossômicas que supostamente possuíam a mesma estrutura desde que eram homólogas.

Assim, a partir da análise dos dados presentes na literatura, fica claro a importância da aplicação de endonucleases de restrição, pois esta técnica possibilita a detecção de diferentes subclasses específicas de DNAs repetidos, aparentemente homogêneos na heterocromatina, além de contribuir significativamente para o estudo cromossômico e para um melhor entendimento do processo evolutivo entre espécies relacionadas.

#### 1.4. Proposição

No presente trabalho realizou-se um estudo comparativo entre duas espécies do gênero *Panstrongylus* (*P. megistus* e *P. herreni*) com ênfase aos seguintes aspectos:

1. Análise das diversas fases da espermatogênese.
2. Estudo do ciclo nucleolar durante a divisão celular (meiose) e detecção das regiões organizadoras nucleolares (RONs) nos cromossomos.
3. Estudo do padrão de distribuição das regiões heterocromáticas nos cromossomos meióticos (testículos de adultos).
4. Correlação das diferenças e semelhanças encontradas no estudo cromossômico de *P. megistus* e *P. herreni* para corroborar o entendimento da evolução ocorrida no gênero *Panstrongylus*.

2. MATERIAL E  
MÉTODOS



### 2.1. Espécies Analisadas

As espécies analisadas neste trabalho foram *Paratstrongylus megistus* e *Paratstrongylus herrer*, pertencentes a ordem Heteroptera, sub-família Triatominae e família Reduviidae (Lent et al., 1979; Menna 1995). O número de indivíduos analisados foi em média cem insetos de cada espécie.

*Paratstrongylus megistus*  $2n=21$  ( $2n=18+X,X,Y$ ) possui um complemento cromossômico com 18 autossomos e três cromossomos sexuais,  $X,X,Y$  (Barth, 1966). Esta espécie possui acentuada capacidade vetora e ampla distribuição geográfica no território brasileiro, espalhando-se da região nordeste a sudeste do país. É uma das principais espécies transmissoras da doença de Chagas nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Alagoas e Pernambuco. Também já foi encontrada na Argentina, Paraguai e Bolívia (Lent & Wygodzinsky, 1979). O *Paratstrongylus megistus* é um triatomino com características diferenciadas morfológicas e é largamente distribuído no país. Nas regiões nordeste e sudeste a espécie é amplamente domiciliada enquanto que, na região sul, é encontrada predominantemente silvestre (Lucena, 1959; Steindl et al., 1994).

*Paratstrongylus herrer* (macho) apresenta 20 autossomos e três heterocromossomos,  $X_1X_2Y$  (Ueshima, 1966). Esta espécie já foi encontrada associada com *Trypanosoma cruzi*, no norte do Peru colonizando habitações humanas e também já foi vista em galinhas de galináceas e entre porquinhos-da-índia e cobras domésticas. *Paratstrongylus herrer* ocorre em regiões com altitudes acima de 1500 metros (Lent & Wygodzinsky, 1979).

### 2.2. Obtenção e Proveniência

As espécies (machos adultos) foram coletadas 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 Professor Doutor 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 pesquisas científicas.

### 2.3. Manutenção

No Insetário os insetos são mantidos em cristalizadores, à temperatura ambiente, em salas com portais de cristalizadores são fechados na parte superior com lã de vidro.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

## 2.1. Espécies Analisadas

As espécies analisadas neste trabalho foram: *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*, pertencentes a ordem Heteroptera, sub-família Triatominae e família Reduviidae (Lent et al., 1979; Manna, 1995). E o número de indivíduos analisados foi em média cem insetos de cada espécie.

*Panstrongylus megistus*  $2n=21$  ( $2n=18+X_1X_2Y$ ) possui um complemento cromossômico com 18 autossomos e três cromossomos sexuais,  $X_1X_2Y$  (Barth, 1956). Esta espécie possui acentuada capacidade vetora e ampla distribuição geográfica no território brasileiro, espalhando-se da região nordeste a sudeste do país. É uma das principais espécies transmissoras da doença de Chagas nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Alagoas e Pernambuco. Também já foi encontrada na Argentina, Paraguai e Bolívia (Lent & Wygodzinsky, 1979). O *Panstrongylus megistus* é um triatomíneo com acentuadas diferenças comportamentais e é largamente distribuído no país. Nas regiões nordeste e sudeste a espécie é amplamente domiciliada enquanto que, na região sul, é considerada eminentemente silvestre (Lucena, 1959, Steindel et al., 1994).

*Panstrongylus herreri* (macho) apresenta 20 autossomos e três heterocromossomos,  $X_1X_2Y$  (Ueshima, 1966). Esta espécie já foi encontrada infectada com *Trypanosoma cruzi*, no norte do Peru colonizando habitações humanas e também já foi vista em gaiolas de galináceos e entre porquinhos-da Índia e cobaias domésticas. *Panstrongylus herreri* ocorre em regiões com altitudes acima de 1500 metros (Lent & Wygodzinsky, 1979).

## 2.2. Obtenção e Procedência

As espécies (machos adultos) 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 Professor Doutor 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 pesquisas solicitantes.

## 2.3. Manutenção e Alimentação

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



A alimentação dos insetos é feita a cada quinze dias com sangue de pato. Na parte central dos cristalizadores é colocado um cilindro de cartolina, para apoio e acesso dos insetos aos patos, que são imobilizados com abdômen parcialmente exposto aos insetos por quinze minutos. As aves não são reservatórios do *Trypanosoma cruzi*, não infectando portanto, as ninfas, que a partir do primeiro estágio, seis a oito dias depois de nascidas já são hematófagas.

Devemos ressaltar que estes insetos resistem até sete meses ao jejum e que os insetos que foram utilizados no presente trabalho eram recém alimentados ou com jejum de até quinze dias, para evitar o risco de possíveis alterações fisiológicas. Em nosso laboratório os insetos foram mantidos em câmara de temperatura constante ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

#### 2.4. Órgãos e Estádios Analisados.

Para desenvolvimento deste trabalho, o órgão escolhido para análise foi o testículo. As gônadas analisadas foram provenientes de indivíduos machos adultos jovens.

#### 2.5. Dissecção dos Insetos

Os insetos foram eterizados e depositados sobre uma placa de Petri contendo parafina sólida e fixados com alfinete espetado na região posterior do cefalotorax, em seguida, patas e asas foram seccionadas. Utilizando uma tesoura pequena e pontiaguda, as laterais do abdômen (região quitinosa) foram cortadas, quando então foi gotejada solução fisiológica (Demerec). Sob o microscópio estereoscópio fez-se um corte transversal na região antero-dorsal no exoesqueleto abdominal, que foi então rebatido para trás e preso com alfinete expondo internamente todo o abdome.

Os testículos estão localizados na porção anterior do hemocelo, um de cada lado, e são envoltos por uma membrana clara e leitosa. A membrana foi retirada e os túbulos seminíferos colocados sobre uma lâmina onde foram separados.

## **2.6. Preparações Citológicas**

### **2.6.1. Esmagamento Celular**

#### **2.6.1.1. Coloração Padrão: Orceína Lacto-Acética (De Vaio et al., 1985, com modificações)**

- a. Dissecar o inseto adulto em solução fisiológica de Demerec;
- b. Depositar o órgão em solução aquosa de ácido acético a 45%, por um minuto;
- c. Transportar o material para uma gota de orceína lacto-acética 2%, por 10 minutos;
- d. Cobrir o material com uma lamínula e efetuar o esmagamento.

### **2.6.2. Tratamentos e Colorações Específicas**

#### **2.6.2.1. Preparações Citológicas para Coloração**

- a. Dissecar o inseto em solução fisiológica Demerec;
- b. Transportar o órgão para uma solução aquosa de ácido acético a 45%, por um minuto;
- c. Transportar o órgão para solução aquosa de ácido láctico a 50%, por 5 minutos;
- d. Cobrir o material com uma lamínula e esmagar em ácido acético a 45%;
- e. Depositar as lâminas em câmara úmida por aproximadamente 10 minutos;
- f. Retirar a lamínula com auxílio de nitrogênio líquido. As lâminas secas podem ser guardadas no freezer por vários dias e a coloração específica processada posteriormente;

##### **2.6.2.1.1. Impregnação com Nitrato de Prata (Howell & Black, 1980, com modificações)**

- a. Tratar a lâmina com o material a ser analisado, com uma gota de solução reveladora (solução de gelatina a 2% acrescida de 0,5 ml ácido fórmico);
- b. Adicionar sobre esta, duas gotas de solução de Nitrato de Prata a 50% e misturá-las;



- c. Cobrir com lamínula;
- d. Colocar as lâminas em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água deionizada, e incubar em estufa a  $58^{\circ}\text{C} \pm 2$ , até a mistura das soluções tornar-se marrom dourada, cerca 12 minutos;
- e. Lavar a lâmina em água deionizada até que a lamínula desprenda-se, deixar secar ao ar e montar com verniz cristal para observação ao microscópio.

#### 2.6.2.1.2. Bandamento-C (Sumner, 1972, com algumas modificações)

- a. Tratar a preparação citológica com HCl 0,1N a temperatura ambiente (aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$ ), 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 a 5% (recém-preparado), filtrado, por 6 minutos à temperatura de  $45^{\circ}\text{C} \pm 2$ ;
- f. Lavar várias vezes em água deionizada;
- g. Incubar em 2XSSC, pH 7.0, por uma hora, a  $45^{\circ}\text{C} \pm 2$ ;
- h. Dar um banho rápido em água deionizada, contendo 3 a 4 gotas de ácido acético;
- i. Dar 3 banhos rápidos em água deionizada e secar ao ar;
- j. Corar com Giemsa a 2% em tampão fosfato, pH 6.8, por 20 minutos, secar novamente ao ar e montar em verniz cristal para observação ao microscópio.

#### 2.6.2.1.3. Bandamento com Endonucleases de Restrição (*Hae* III e *Alu* I)

- a. Incubar cada lâmina com 10 unidades de enzima de restrição perfazendo o volume de  $100\mu\text{l}$  com tampão de incubação (10mM de Tris/HCl, pH 7,5; 50 mM de NaCl; 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; e 1 mM de ditiotretitol) e cobrir com 1 lamínula. As preparações colocadas em câmara úmida foram incubadas por 16 horas, à temperatura  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ;

- b. Foram efetuados os experimentos controles, nos quais os cromossomos fixados foram tratados somente com o tampão de incubação (empregando os mesmos tempos e temperatura).
- c. Corar com Giemsa 2% em tampão fosfato, pH 6.8.

## 2.7. Procedimento para Análise das Lâminas

Nas lâminas coradas com orceína lacto-acética foram observados o número de corpúsculos heteropicnóticos, bem como, a disposição dos cromossomos meióticos na placa metafásica.

Nas preparações citológicas coradas com nitrato de prata, foi observado o número de corpúsculos nucleolares e quando possível, a localização das regiões organizadoras nucleolares nos cromossomos.

No caso do bandamento-C, o objetivo foi de analisar as regiões heterocromáticas nas várias fases do ciclo de divisão celular, bem como, observar o número e a disposição dos corpúsculos heterocromáticos.

As lâminas submetidas ao tratamento com endonucleases de restrição foram analisadas quanto as bandas cromossômicas de heterocromatina constitutiva reveladas pela digestão enzimática. A endonuclease de restrição *Alu I* digere seqüências ricas em AG/CT, enquanto a *Hae III* digere seqüências ricas em GG/CC.

## 2.8. Fotomicrografias

As fotomicrografias foram obtidas em Microscópio Zeiss-Jeneval com Sistema Fotográfico automático, utilizando-se filme Kodak Plus X-Plan 125 ASA e papel 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, de acordo com as técnicas rotineiras empregadas neste processo.

# 3. RESULTADOS





No presente trabalho estudamos a espermatogênese de duas espécies de Triatomíneos: *Panstrongylus megistus* (Figura 1 a) e *Panstrongylus herreri* (Figura 1 b). Os órgãos estudados foram os túbulos testiculares de machos adultos jovens. As técnicas empregadas foram coloração com orceína lacto-acética, impregnação com nitrato de prata, bandamento-C e bandamento com as endonucleases de restrição Hae III e Alu I.

### 3.1. Sistema Reprodutor Masculino de Triatomíneos

O aparelho reprodutor masculino de espécimes adultos de *Panstrongylus*, como nos demais triatomíneos, é constituído pelas seguintes estruturas: um par de testículos, um par de vasos deferentes, um par de vesículas seminais (reservatório de esperma), epididímo (extensão do vaso deferente irregularmente enovelada), quatro pares de glândulas acessórias sob forma de bolsas e um canal ejaculador. A abertura externa do aparelho reprodutor, também denominada gonóporo masculino, está geralmente situada sobre ou dentro de um órgão mediano, o pênis (Schuëtz, 1989; Azeredo-Oliveira, 1990), (Esquema 1 a, Figura 2 a, Figura 3 a).

As gônadas são situadas dorso-lateralmente, do segundo ao quinto segmento abdominal e são mantidas em sua posição por meio de ramificações dos troncos das traquéias dos respectivos segmentos. O seu contorno é irregular, mostrando porém uma forma elipsoidal, cujo eixo maior está situado paralelamente ao eixo principal do corpo. São sempre esbranquiçadas e opacas, com ligeiro brilho vítreo. O tamanho varia de acordo com a idade, com o estado nutricional e com a fase de atividade sexual (Barth, 1956), (Figura 2 a, Figura 3 a).

Os testículos são formados por sete túbulos testiculares, cada túbulo está ligado ao vaso deferente por um pequeno canalículo chamado vaso eferente. O túbulo testicular é revestido por uma camada celular, formando uma bainha epitelial, que algumas vezes apresenta-se subdividida em duas camadas. No interior de cada túbulo espermático, encontram-se as células germinais masculinas, nos seus diferentes estádios de desenvolvimento, bem como outras células que lhes são associadas. Correspondem os túbulos testiculares, quanto a sua origem e desenvolvimento, aos túbulos dos ovários, sendo por isso comumente chamados folículos testiculares (Maranhão, 1978 apud Azeredo-Oliveira, 1990), (Figura 2 b; Figura 3 b).





### 3.2. Morfologia Interna do Túbulo Testicular

O túbulo testicular (Esquema 1 b) é constituído por quatro regiões: germário, zona de crescimento, zona de maturação, zona de transformação. O germário está situado na porção apical do túbulo e é responsável pela formação das espermatogônias; na sua porção superior, possui uma célula germinativa, com função trófica, denominada célula apical. A partir do germário as espermatogônias são gradualmente deslocadas para região proximal (região adjacente ao canal eferente) do túbulo, originando uma sucessão de zonas de acordo com o grau de desenvolvimento. A zona de crescimento caracteriza-se pelo encistamento, multiplicação e aumento de tamanho das espermatogônias que se transformam em espermatócitos de primeira ordem. Na zona de maturação os espermatócitos primários sofrem duas divisões meióticas para transformarem-se em espermátides. Finalmente, na zona de transformação ocorre a espermiogênese, isto é, a diferenciação das espermátides em espermatozóides (Schuetz, 1989; Azeredo-Oliveira, 1990).

As espermatogônias transformam-se em espermatozóides através de uma série de divisões das quais resultam células espermáticas primárias, comumente ligadas umas as outras centralmente por pontes protoplasmáticas. Essa ligação das células assume uma disposição radial, com aspecto característico rosáceo, quando o conjunto de células é visto em corte transversal. Na maioria dos casos, cada grupo de espermatogônias apresenta-se incluído em um invólucro celular, conhecido como cisto espermático. As espermatogônias, dentro de cada cisto, continuam a se multiplicar até a fase de espermatozóide. Posteriormente, os cistos se degeneram e são dissolvidos, ficando os espermatozóides reunidos em feixes localizados geralmente na parte inferior do túbulo testicular, nas proximidades do canal da saída (Azeredo-Oliveira, 1990).

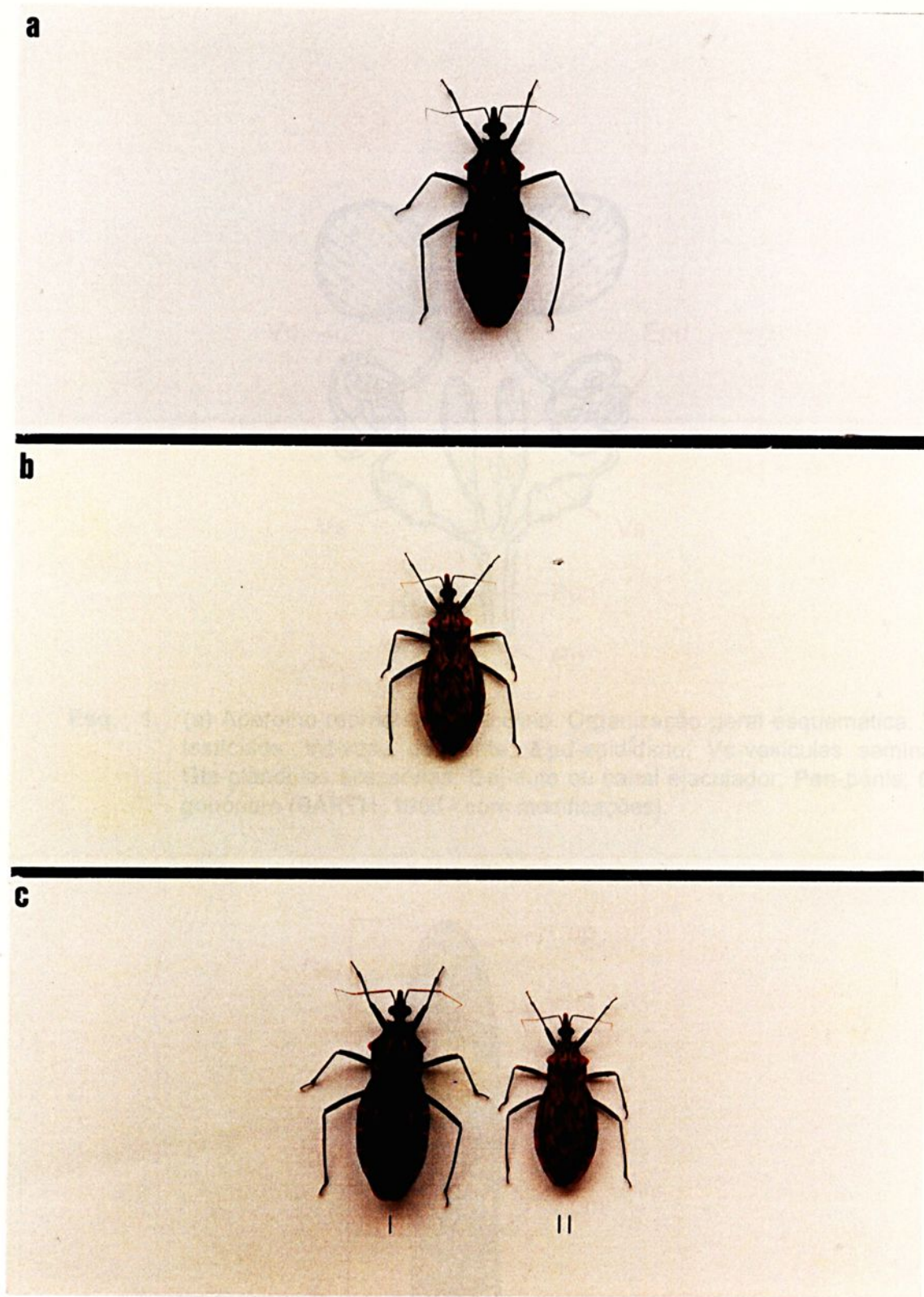
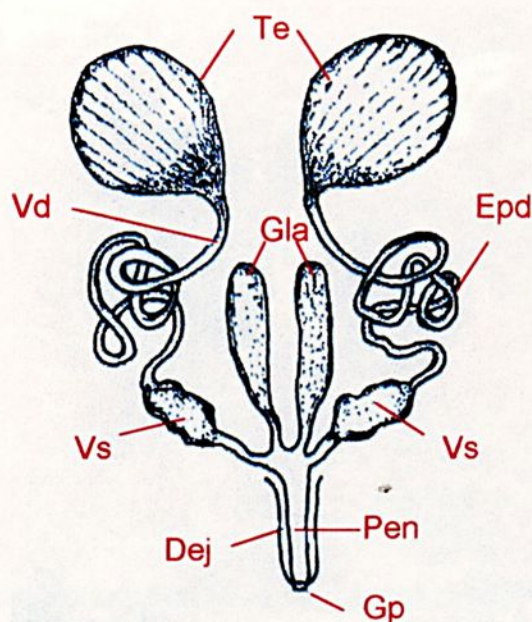
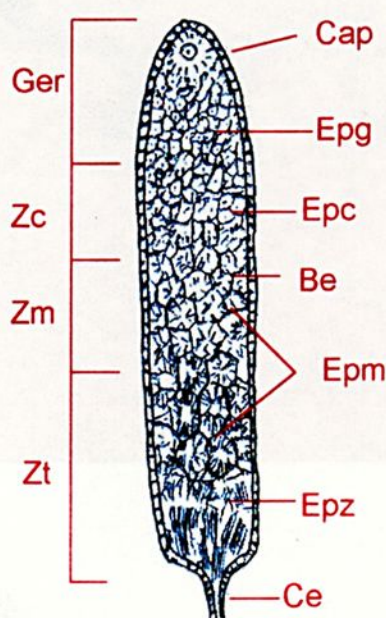


Fig. 1. a) *Panstrongylus megistus*, macho. b) *Panstrongylus herreni*, macho. c) *Panstrongylus megistus*, macho (I), *Panstrongylus herreni*, macho (II) (Aumento= 1,3x).





**Esq. 1. (a)** Aparelho reprodutor masculino. Organização geral esquemática: **Te**-testículos; **Vd**-vaso deferente; **Epd**-epidídimo; **Vs**-vesículas seminais; **Gla**-glândulas acessórias; **Dej**-duto ou canal ejaculador; **Pen**-pênis; **Gp**-gonópodo (BARTH, 1956 - com modificações).



**Esq. 1. (b)** Aparelho reprodutor masculino. Túbulo testicular: **Ger**-germário; **Zc**-zona de crescimento; **Zm**-zona de maturação; **Zt**-zona de transformação; **Cap**-célula apical ou de Verson; **Epg**-espermatogônias; **Epc**-espermatócitos; **Epm**-espermátides; **Epz**-espermatozóides; **Ce**-canal eferente; **Be**-bainha epitelial (BARTH, 1956 - com modificações).



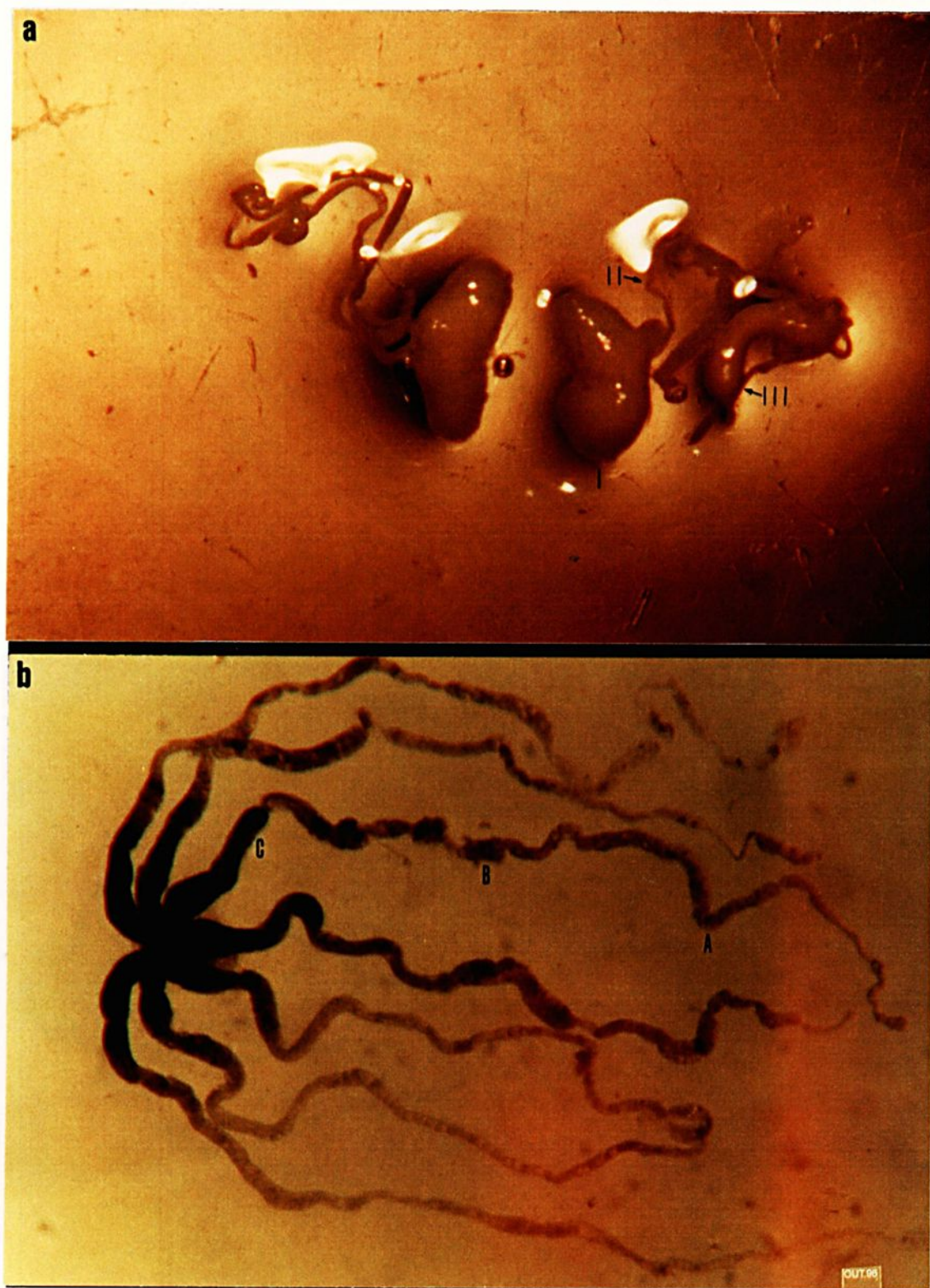
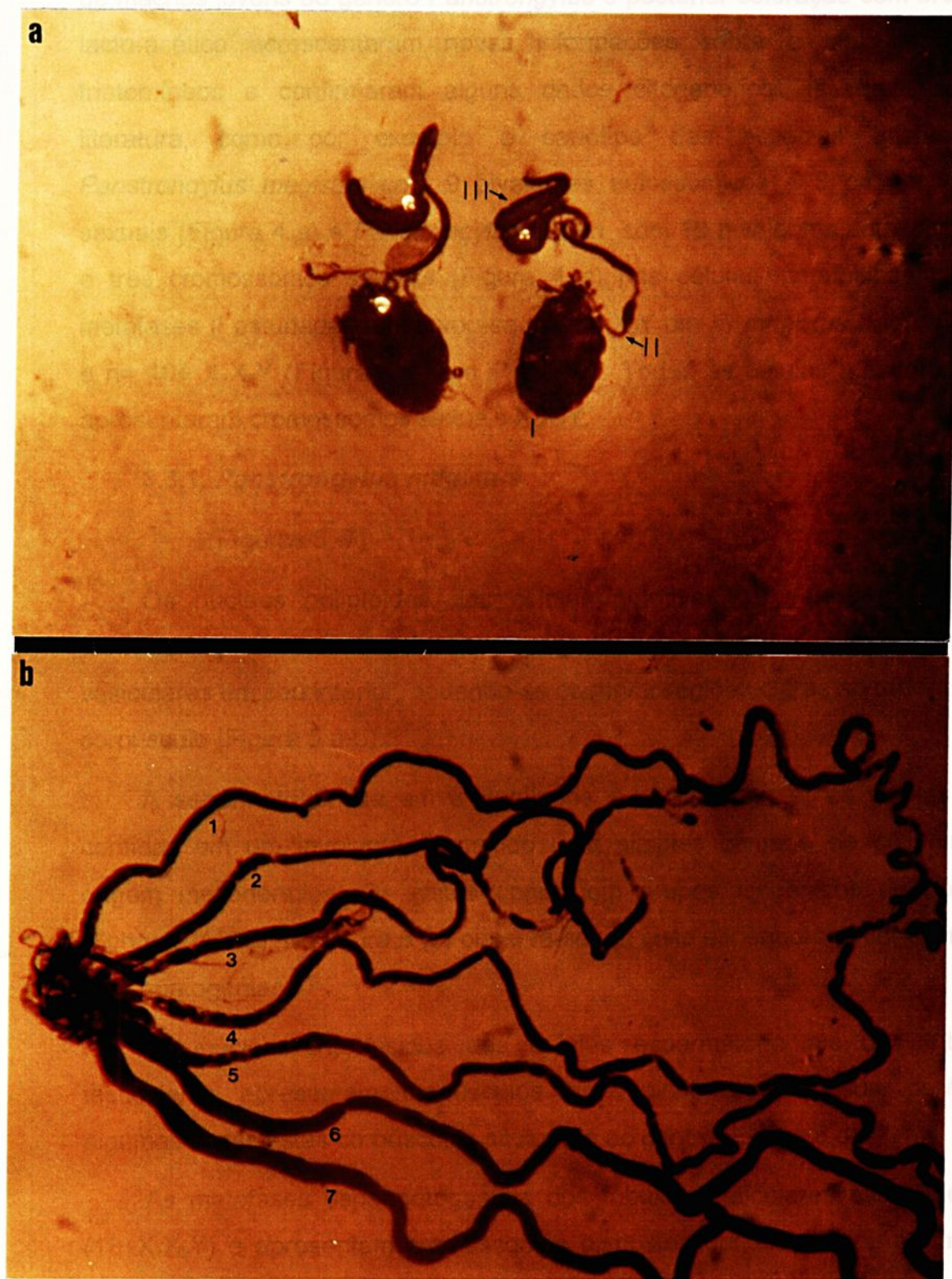


Fig. 2. *Panstrongylus megistus*. a) Visão geral do aparelho reprodutor masculino. I) testículo, II) vaso deferente, III) glândula acessória (Aumento=8,4x). b) Disposição dos túbulos seminíferos após dissecção. As regiões A, B, C do túbulo seminífero contém respectivamente: células espermatogoniais; células meióticas e espermátides e espermatozóides (Aumento= 12,6 x).



### 3.3. Coloração com Orceína Lacto-Ácética.

Os resultados obtidos utilizando a técnica de esmagamento dos testículos de machos jovens do gênero *Panstrongylus* e posterior coloração com orceína



**Fig. 3.** *Panstrongylus herreri*. a) Visão geral do aparelho reprodutor masculino: I) testículo, II) vaso deferente, III) glândula acessória (Aumento=8,4 x). b) Disposição dos túbulos seminíferos após dissecção. Os túbulos indicados pelos números 6 e 7 são maiores e mais espessos que os demais (Aumento=12,6 x).



### 3.3. Coloração com Orceína Lacto-Acética.

Os resultados obtidos utilizando a técnica de esmagamento dos testículos de machos jovens do gênero *Panstrongylus* e posterior coloração com orceína lacto-acética acrescentaram novas informações sobre a meiose destes triatomíneos e confirmaram alguns dados citogenéticos já relatados na literatura, como por exemplo o cariótipo das espécies analisadas: *Panstrongylus megistus* com 9 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais (Figura 4 a) e *Panstrongylus herreri*, com 10 bivalentes autossômicos e três cromossomos sexuais (Figura 4 c) nas células metafásicas I. Nas metáfases II estudadas, observou-se  $n=9+X_1X_2Y$  em *P. megistus* (Figura 4 b), e  $n= 10+ X_1X_2Y$  (Figura 4 d) em *P. herreri*. Todas as células metafásicas II apresentaram cromossomos sexuais  $X_1X_2Y$ .

#### 3.3.1. *Panstrongylus megistus*

(Figuras 5 -7)

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo testicular apresentam um único corpúsculo heteropicnótico com estruturas vesiculares em seu interior, podendo-se observar regiões claras ao redor deste corpúsculo (Figura 5 a-b).

A espermatogênese em triatomíneos é cística, isto é, as células são contidas em um invólucro, formando uma simples camada de células, de origem mesodérmica. Os cistos constituem grupos isogênicos de células (Schuetz, 1989). Na figura 5 (c) observa-se um cisto espermatogonial com seis espermatogonias.

Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais dos túbulos testiculares apresentam corpúsculos heteropicnóticos em sua periferia, algumas vezes estes corpúsculos situam-se ao centro (Figura 5 d).

As metáfases espermatogoniais dos túbulos testiculares são diplóides ( $18+X_1X_2Y$ ) e apresentam cromossomos dispostos por toda placa equatorial unidos por filamentos cromatínicos (Figura 5 e-g).

Os núcleos de estágio confuso da prófase I exibem corpúsculos heteropicnóticos provavelmente formados pelos cromossomos sexuais. Estes corpúsculos são observados nas formas bi e tripartidas (Figura 6 a-c). As fases mais adiantadas do estágio confuso tornam mais evidente a heteropicnose dos cromossomos sexuais (Figura 6 d-f). No diplóteno da prófase I pode-se



observar um maior grau de condensação dos cromossomos sexuais em relação aos autossomos (Figura 6 f-h).

A metáfase I da meiose sob vista lateral apresenta cromossomos justapostos formando uma espécie de "fileira cromossômica" (Figura 6 i). Na visão frontal da placa metafásica os cromossomos não se dispõem em uma mesma orientação e os heterocromossomos ora situam-se ao centro, ora na periferia da placa (Figura 6 j-l).

Na metáfase II da meiose a visão sob ângulo lateral é semelhante àquela da metáfase I, exceto pelo fato dos autossomos estarem mais delgados devido a divisão reducional (Figura 6 m). À vista frontal, geralmente, os autossomos apresentam disposição anelar com os cromossomos sexuais ao centro (Figura 6 m-n).

Na anáfase meiótica há uma migração progressiva dos cromossomos para os pólos celulares (Figura 7 a-e), atingindo então o estágio telofásico (Figura 7 f).

No início da espermiogênese as espermatídes são arredondadas e apresentam grandes corpúsculos condensados ao centro (Figura 7 g-h). Conforme se processa a diferenciação os corpúsculos adquirem aspecto diminuto enquanto as espermatídes iniciam um processo gradual de alongamento celular (Figura 7 i-o).

Nas fases mais adiantadas da espermiogênese o alongamento celular é nitidamente percebido (Figura 7 p-q) e no final do processo é possível observar feixes de espermatozóides (Figura 7 r).

### 3.3.2. *Panstrongylus herrei*

(Figuras 8-10)

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo testicular apresentam um corpúsculo heteropicnótico único e bipartido. É comum a observação de vesículas claras no interior destes corpúsculos e na maioria das vezes um halo claro circundando-os (Figura 8 a-b).

Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais possuem pequenos blocos condensados em sua periferia (Figura 8 c-d).

As prometáfases e metáfases espermatogoniais ( $20+X_1X_2Y$ ) apresentam os cromossomos unidos por pontes cromatínicas (Figura 8 e-h) e não há um

arranjo ordenado dos cromossomos, sendo que estes ocupam toda a placa equatorial.

Os núcleos do início da prófase I da meiose (estádio confuso) evidenciam um único bloco heteropicnótico formado provavelmente pelos cromossomos sexuais (Figura 9 a-c). Com o avançar dessa fase, pode-se notar que os blocos heteropicnóticos dos núcleos do estágio confuso tornam-se mais evidentes (Figura 9 d-h). No diplóteno estes blocos heteropicnóticos representam caracteristicamente os cromossomos sexuais (Figura 9 i-l).

As metáfases da primeira divisão meiótica não seguem uma mesma orientação sendo que os cromossomos sexuais aparecem ora no centro, ora na periferia (Figura 9 m-n). Já as metáfases da segunda divisão apresentam uma disposição anelar dos autossomos com os cromossomos sexuais ao centro unidos por filamentos cromatínicos (Figura 9 o-q).

Nas anáfases meióticas são observados cromossomos com migração tardia (Figura 10 a-g). Há sugestões de trabalhos anteriores indicando que esses cromossomos observados em outros triatomíneos sejam os cromossomos sexuais (Azeredo-Oliveira, 1990).

Na espermiogênese nota-se que as espermatídes iniciais possuem forma arredondada e apresentam diminutos corpúsculos condensados (Figura 10 h-i). Com o avançar da espermiogênese as células alongam-se (Figura 10 j-o) até originarem os espermatozóides que apresentam-se em feixes (Figura 10 p-q).

A tabela 1 resume e compara os principais resultados obtidos através da técnica de esmagamento e posterior coloração com orceína lacto-acética, nos túbulos testiculares dos machos das duas espécies do gênero.

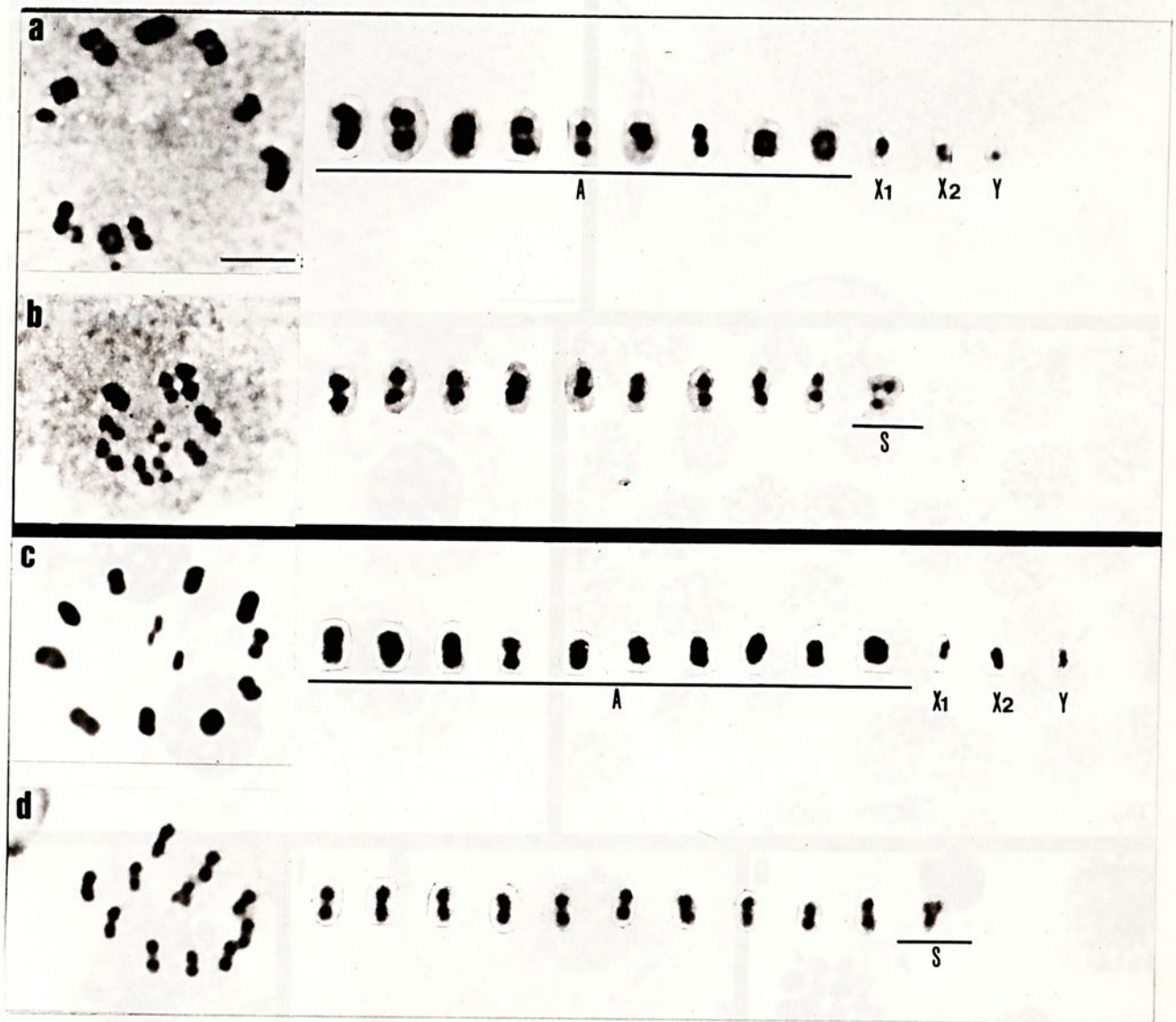


TABELA 1

Comparação dos principais resultados obtidos através da técnica de orceína lacto-acética, em testículos de machos adultos jovens das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*:

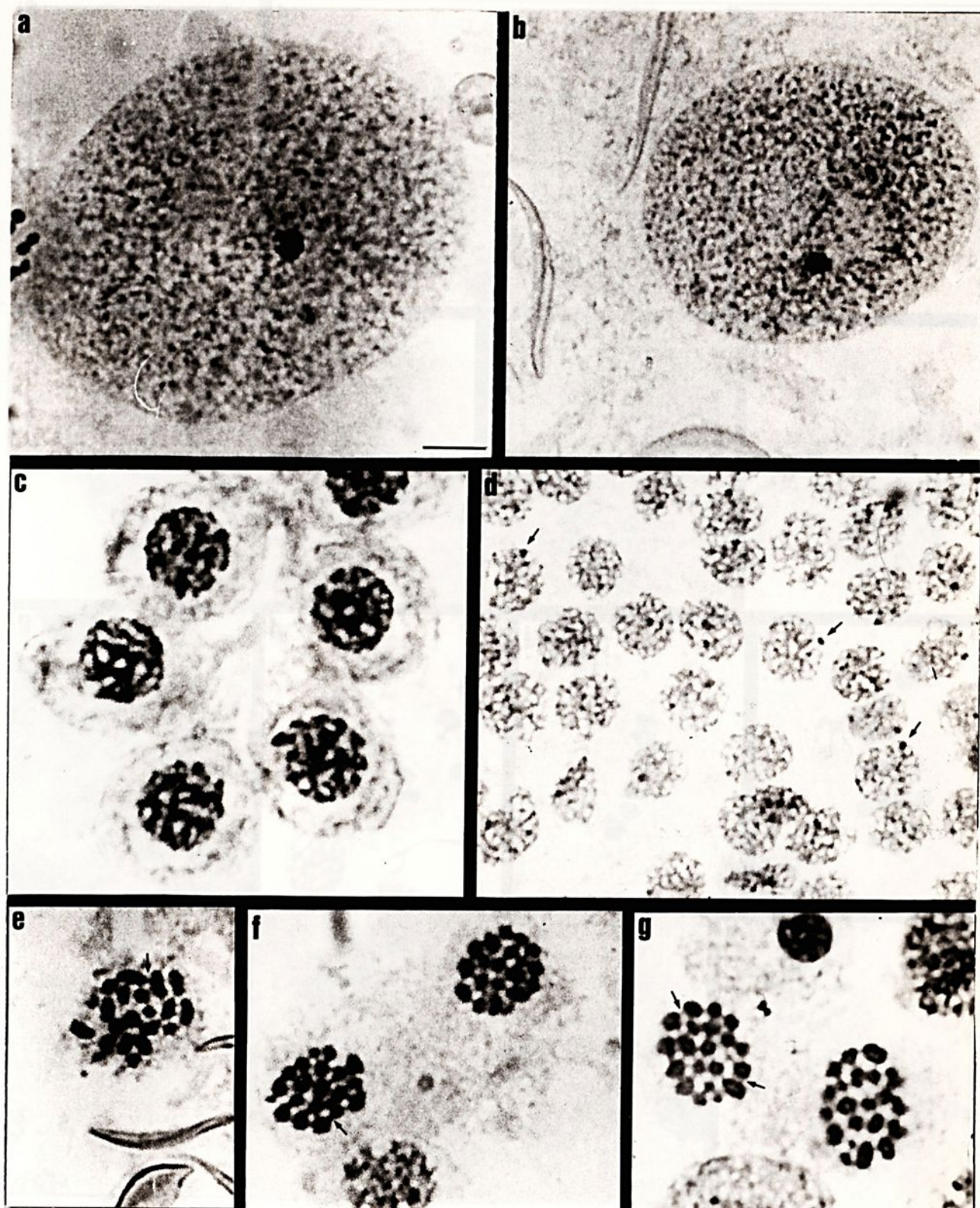
| ESTRUTURAS<br>CELULARES DO TÚBULO<br>TESTICULAR         | <i>P. megistus</i>                                                                                                                                                                                                                                                | <i>P. herreri</i>                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Núcleos poliplóides da parede do túbulo testicular   | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ Um único corpúsculo heteropicnótico com halo claro ao redor.</li> <li>↳ Vesículas no interior do corpúsculo.</li> </ul>                                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ Um único corpúsculo heteropicnótico com halo claro ao redor.</li> <li>↳ Vesículas no interior do corpúsculo.</li> </ul>                                                                                                   |
| 2) Núcleos interfásicos das células espermatogoniais    | ↳ Corpúsculos heteropicnóticos na periferia do núcleo e espalhados em seu interior.                                                                                                                                                                               | ↳ Corpúsculos heteropicnóticos na periferia do núcleo e espalhados em seu interior.                                                                                                                                                                                |
| 3) Metáfases espermatogoniais                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ <math>18+X_1X_2Y</math>.</li> <li>↳ Com pontes cromatínicas unindo os cromossomos.</li> </ul>                                                                                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ <math>20+X_1X_2Y</math>.</li> <li>↳ Com pontes cromatínicas unindo os cromossomos.</li> </ul>                                                                                                                             |
| 4) Núcleos da prófase I da meiose (estádio confuso)     | ↳ Os cromossomos sexuais formam corpúsculo heteropicnótico único, bi e tripartido.                                                                                                                                                                                | ↳ Cromossomos sexuais formando corpúsculos heteropicnótico único, bi e tripartido.                                                                                                                                                                                 |
| 5) Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno-diacinese) | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ Figuras quiasmáticas são observadas.</li> <li>↳ Os cromossomos sexuais apresentam-se heteropicnóticos</li> </ul>                                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ Figuras quiasmáticas são observadas.</li> <li>↳ Os cromossomos sexuais apresentam-se heteropicnóticos.</li> </ul>                                                                                                         |
| 6) Metáfases da primeira divisão meiótica               | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ 9 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais <math>X_1X_2Y</math>.</li> <li>↳ Não há ordenação na disposição dos cromossomos sexuais às vezes na periferia, às vezes no centro.</li> </ul>                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ 10 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais <math>X_1X_2Y</math>.</li> <li>↳ cromossomos sexuais aparecem no centro unidos por pontes cromatínicas.</li> </ul>                                                     |
| 7) Metáfases da segunda divisão meiótica                | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ 9 autossomos e <math>X_1X_2Y</math> (sexuais).</li> <li>↳ Autossomos dispostos radialmente na periferia da placa, enquanto os cromossomos sexuais situam-se ao centro do anel unidos por pontes cromatínicas.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ 10 autossomos e <math>X_1X_2Y</math> (sexuais).</li> <li>↳ Autossomos dispostos radialmente na periferia da placa, enquanto os cromossomos sexuais situam-se ao centro do anel unidos por pontes cromatínicas.</li> </ul> |
| 8) Anáfases meióticas                                   | ↳ Não foi observada a presença de cromossomos com migração tardia.                                                                                                                                                                                                | ↳ Presença de cromossomos com migração tardia, possivelmente sendo estes os sexuais.                                                                                                                                                                               |
| 09) Espermátides                                        | ↳ Presença de um corpúsculo condensado no início da espermiogênese.                                                                                                                                                                                               | ↳ Presença de um corpúsculo condensado no início da espermiogênese.                                                                                                                                                                                                |

Fig. 4. Cariótipos meióticos das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*. (a) Metáfase da primeira divisão meiótica e respectivo cariótipo com 9 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais ( $X_1X_2Y$ ). (b) Metáfase da segunda divisão meiótica e seu cariótipo ( $9A+X_1X_2Y$ ). (c) Metáfase da primeira divisão meiótica e seu cariótipo com 10 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais ( $X_1X_2Y$ ). (d) Metáfase da segunda divisão meiótica e correspondente cariótipo ( $10A+X_1X_2Y$ ). A-autossomos, C=cromossomos sexuais. Escala=5µm.



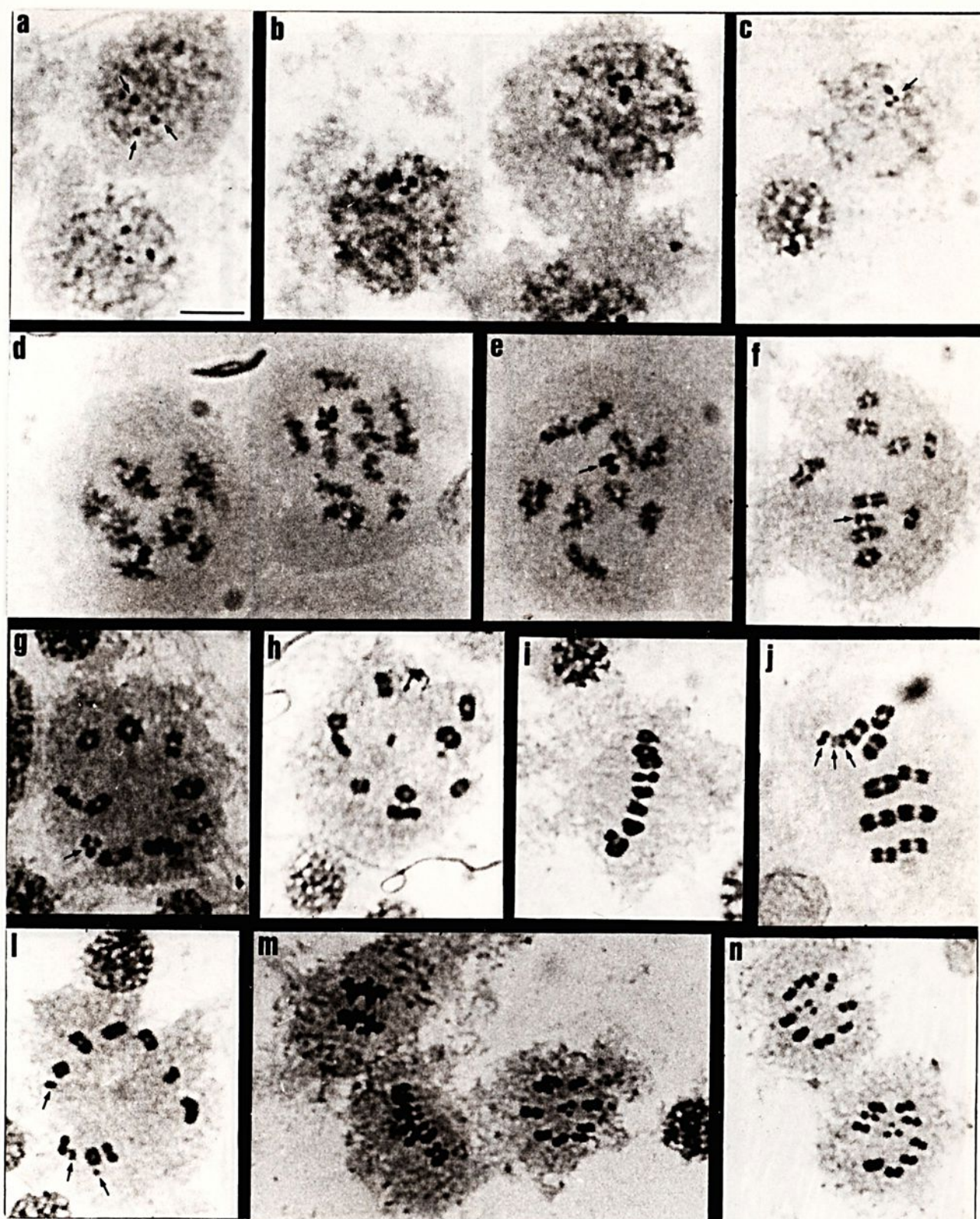
**Fig. 4.** Cariótipos meióticos das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herrei*. *P. megistus*: (a) Metáfase da primeira divisão meiótica e respectivo cariótipo com 9 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais ( $X_1X_2Y$ ). (b) Metáfase da segunda divisão meiótica e seu cariótipo ( $9A+X_1X_2Y$ ). *P. herrei*: (c) Metáfase da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais ( $X_1X_2Y$ ). (d) Metáfase da segunda divisão meiótica e correspondente cariótipo ( $10A+X_1X_2Y$ ). A=autossomos, S=cromossomos sexuais. Escala=5 $\mu$ m.





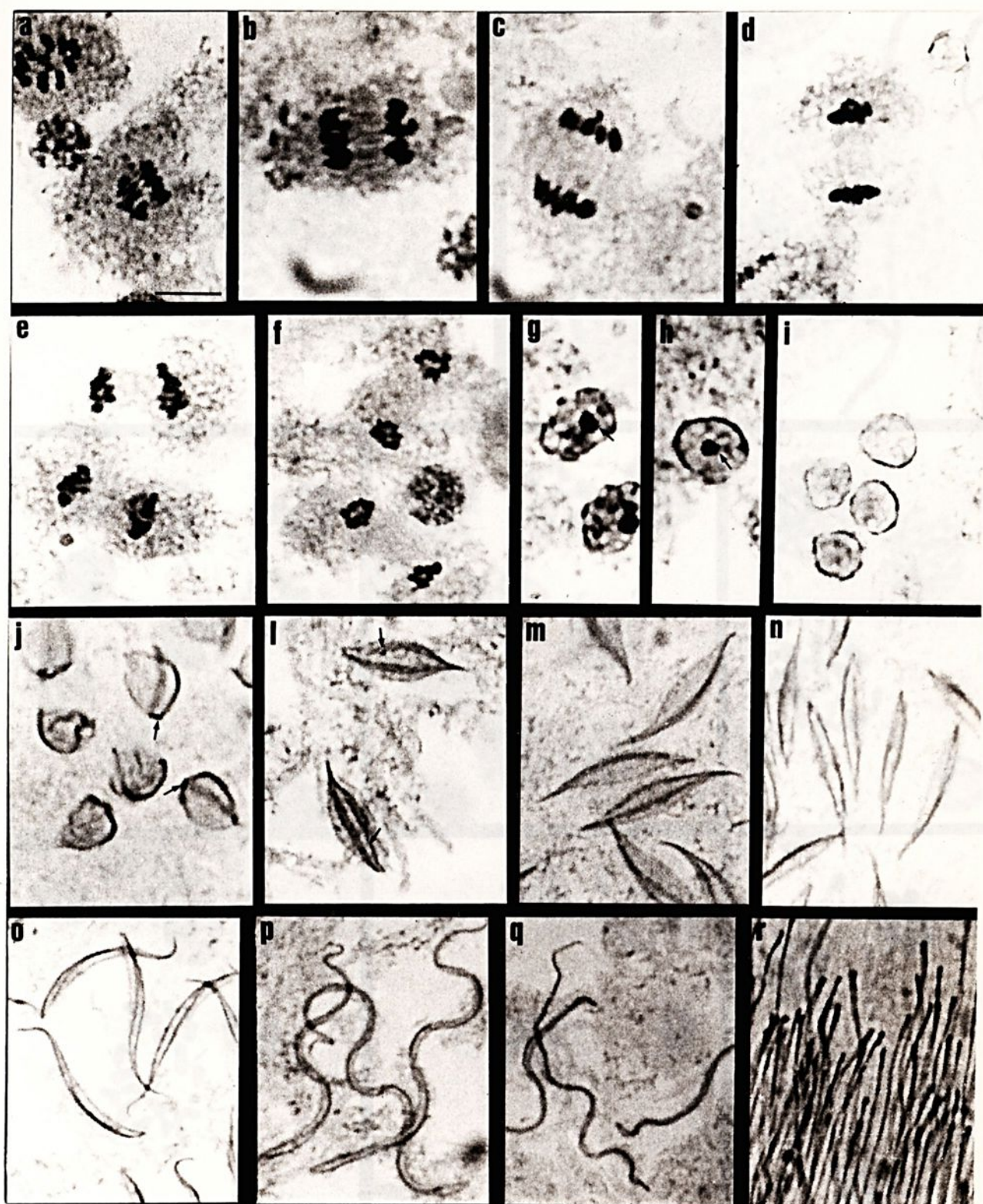
**Fig. 5.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a-b) Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com único corpúsculo heteropicnótico. Observa-se também vesículas no interior do corpúsculo e a presença de regiões menos coradas ao redor deste. (c) Cisto espermatogonial. (d) Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. Observar os corpúsculos heterocromáticos espalhados no interior do núcleo. As setas indicam corpúsculos heteropicnóticos na periferia do núcleo. (e-g) Metáfases espermatogoniais. As setas indicam filamentos cromatinicos unindo os cromossomos. Escala=10 $\mu$ m.





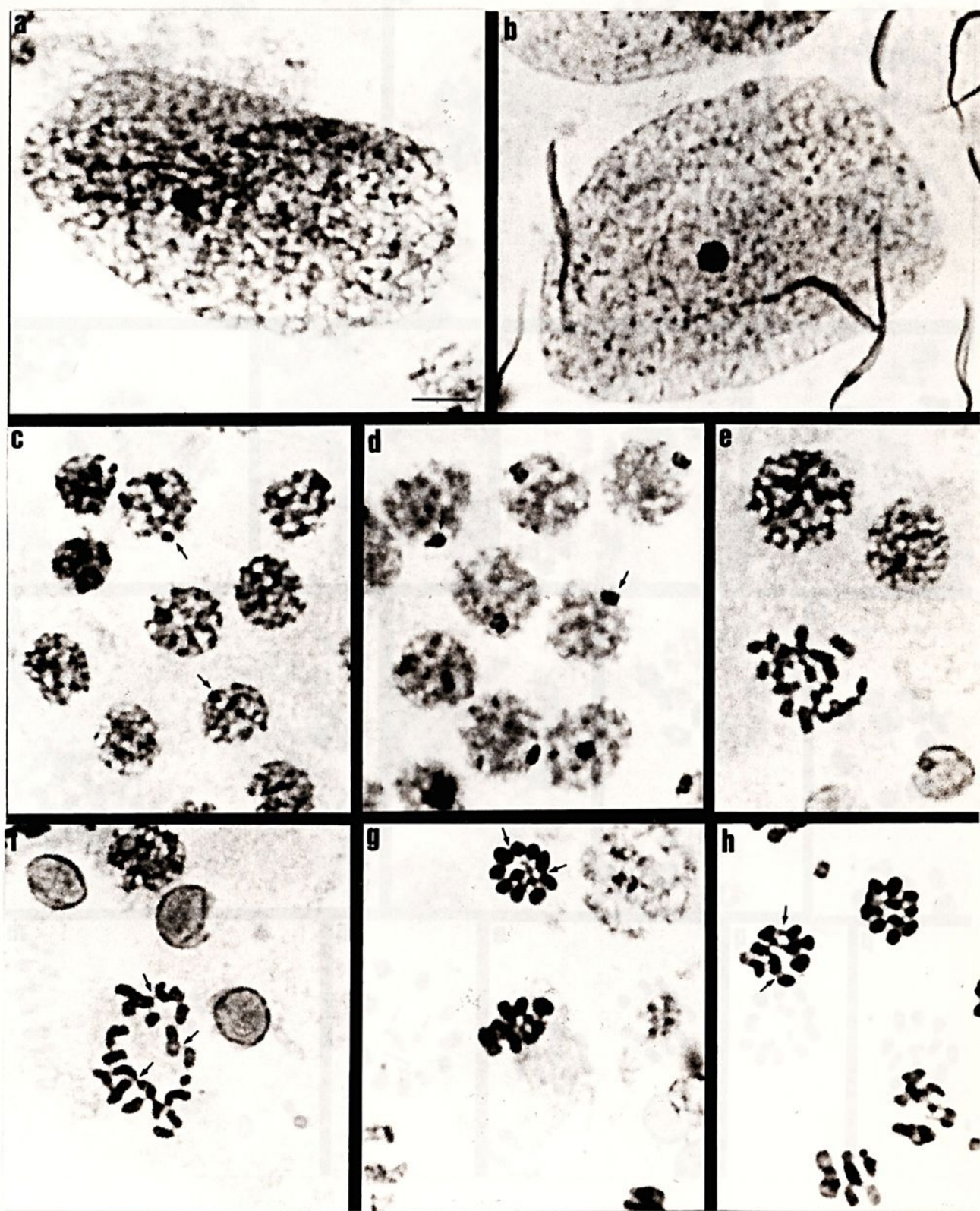
**Fig. 6.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a-c) Núcleos no início da prófase I meiótica (estádio confuso) com três corpúsculos heteropicnóticos formados pelos cromossomos sexuais. (d-e) Núcleos em estágio mais adiantado da prófase I. A seta indica os cromossomos sexuais. (f-h) Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). As setas indicam os cromossomos sexuais. (i-l) Metáfases da primeira divisão meiótica com 9 bivalentes autossômicos e três cromossomos sexuais indicados pelas setas. (m-n) Metáfases da segunda divisão meiótica com 9 autossomos e três cromossomos sexuais. Notar que os autossomos são dispostos em anel e os cromossomos sexuais situam-se no centro deste. Escala=10µm.





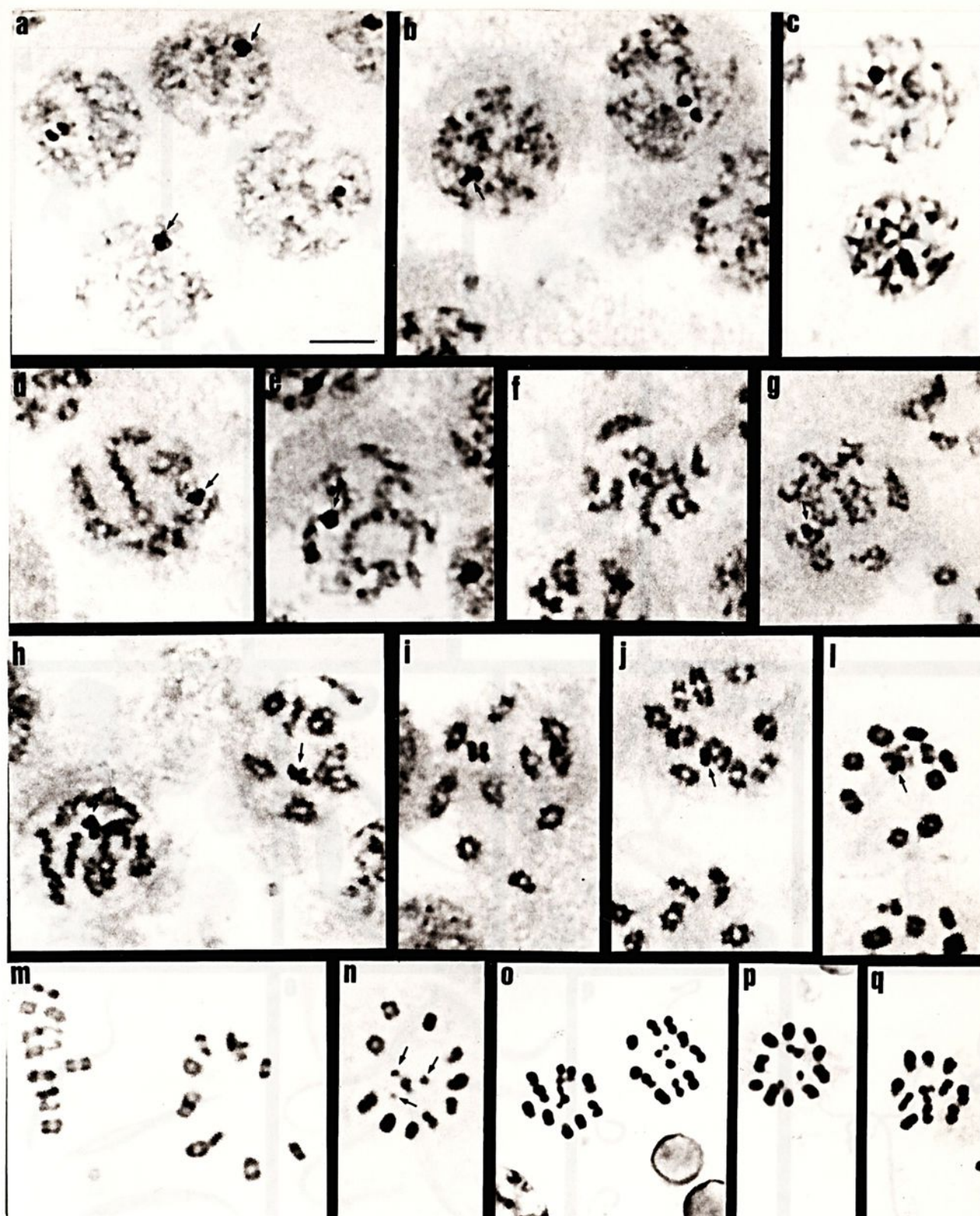
**Fig. 7.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a-e) Anáfases meióticas com ausência de cromossomos de migração tardia. (f) Telófases meióticas. (g-h) Espermátides no início da espermiogênese. As setas indicam a presença de corpúsculos no início da diferenciação celular. Observar a forma arredondada das células. (i-n) Espermátides nos estádios mais adiantados da espermiogênese. Notar que as células tomam-se progressivamente alongadas. As setas indicam diminutos corpúsculos heteropicnóticos. (o-q) Espermátides na fase final da espermiogênese. (r) Feixes de espermatozóides. Escala=10 $\mu$ m.





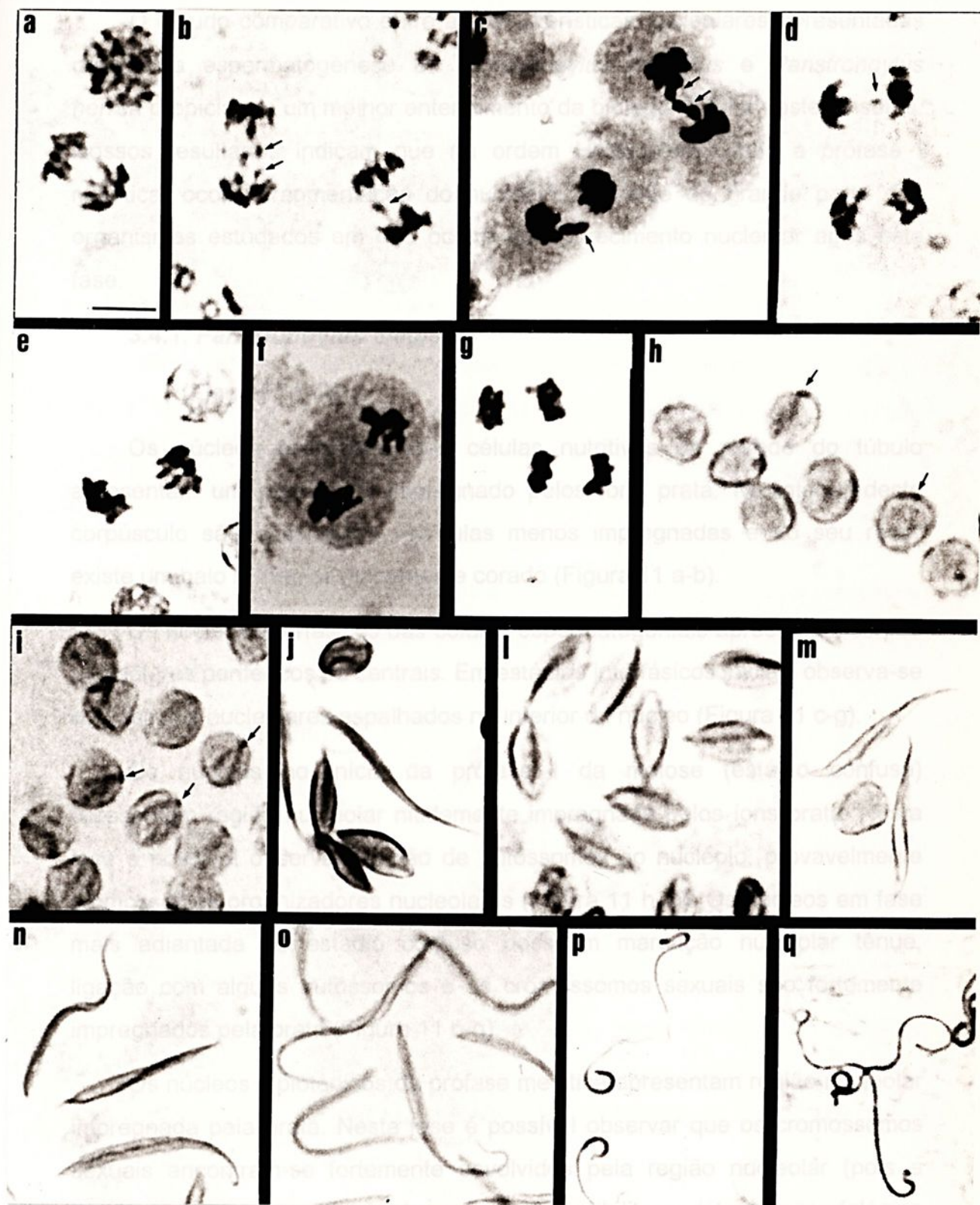
**Fig. 8.** Túbulos testiculares de *P. herreri* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a-b) Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com único corpúsculo heteropicnótico. Notar presença de vesículas no interior do corpúsculo. (c-d) Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. Observar os corpúsculos heteropicnóticos espalhados no interior do núcleo. As setas indicam corpúsculos heteropicnóticos na periferia do núcleo. (e-h) Metáfases espermatogoniais. As setas indicam filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. Escala=10 $\mu$ m.





**Fig. 9.** Túbulos testiculares de *P. herreni* submetidos à técnica de orceína-lacto acética. (a-c) Núcleos no início da prófase I meiótica (estádio confuso). As setas indicam os corpúsculos heteropicnóticos formados pelos cromossomos sexuais. (d-h) Núcleos em estágio mais adiantado da prófase I. As setas indicam os cromossomos sexuais heteropicnóticos. (i-l) Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). As setas indicam os cromossomos sexuais. (m-n) Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e três cromossomos sexuais indicados pelas setas. (o-q) Metáfases da segunda divisão meiótica com 10 autossomos e três cromossomos sexuais. Notar que os autossomos são dispostos em anel e os cromossomos sexuais situam-se no centro deste. Escala=10 $\mu$ m.





**Fig. 10.** Túbulos testiculares de *P. herreni* submetidos à técnica de orceína-lacto acética. (a-g) Anáfases meióticas. As setas indicam cromossomos com migração tardia. (h-i) Espermátides no início da diferenciação celular. As setas indicam a presença de corpúsculos heteropicnóticos na periferia da célula. Observar a forma arredondada das células. (j-o) Espermátides nos estádios mais adiantados da espermiogênese. Notar o alongamento progressivo das células. (p-q) Espermátides na fase final da espermiogênese. Escala = 10µm.



### 3.4. Impregnação com Nitrato de Prata

O estudo comparativo entre as características nucleolares apresentadas durante a espermatogênese de *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri* propiciaram um melhor entendimento da biologia celular destes insetos. Nossos resultados indicam que na ordem Heteroptera, após a prófase I meiótica, ocorre fragmentação do nucléolo, diferente de grande parte dos organismos estudados em que ocorre desaparecimento nucleolar após esta fase.

#### 3.4.1. *Panstrongylus megistus*

(Figuras 11-18)

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo apresentam um corpúsculo impregnado pelos íons prata. No interior deste corpúsculo são observadas vesículas menos impregnadas e ao seu redor existe um halo nucleolar tenuemente corado (Figura 11 a-b).

Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentam corpos nucleolares periféricos ou centrais. Em estádios interfásicos iniciais observa-se corpúsculos nucleolares espalhados no interior do núcleo (Figura 11 c-g).

Os núcleos no início da prófase I da meiose (estádio confuso) apresentam região nucleolar nitidamente impregnada pelos íons prata. Nesta fase é possível observar ligação de autossomos ao nucléolo, provavelmente cromossomos organizadores nucleolares (Figura 11 h-m). Os núcleos em fase mais adiantada do estágio confuso possuem marcação nucleolar tênue, ligação com alguns autossomos e os cromossomos sexuais são fortemente impregnados pela prata (Figura 11 n-q).

Os núcleos diplotênicos da prófase meiótica apresentam região nucleolar impregnada pela prata. Nesta fase é possível observar que os cromossomos sexuais encontram-se fortemente envolvidos pela região nucleolar (pois a região torna-se mais levemente corada e possibilita a detecção morfológica dos heterocromossomos). Esta característica indica que estes cromossomos possuem RON, também é evidente a ligação de autossomos ao nucléolo (Figura 12 a-l).

Na diacinese a região nucleolar é levemente impregnada. Nesta fase é possível observar a ligação dos cromossomos sexuais e de pelo menos um autossomo ao nucléolo (Figura 12 m-p).



Nas metáfases da primeira divisão meiótica alguns dos autossomos apresentam impregnação pela prata e os cromossomos sexuais estão individualizados. Nesta fase é possível observar um dos autossomos ligado a corpúsculos impregnados pelos íons prata. É importante ressaltar que na metáfase da primeira divisão meiótica começam a aparecer fragmentos e corpúsculos nucleolares dispersos no interior do núcleo (Figura 13 b-o, Figura 14 a-b). A metáfase da segunda divisão meiótica também apresenta corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata no interior do núcleo (Figura 14 c-i).

Na anáfase meiótica os cromossomos migram progressivamente para os pólos celulares e o núcleo apresenta vários fragmentos e corpúsculos nucleolares. Nesta fase cada pólo celular exhibe vários corpos nucleolares (Figura 14 j-m). Na telófase meiótica o núcleo celular reaparece gradualmente e é possível verificar fragmentos impregnados pelos íons prata (Figura 14 n-o).

No início da espermiogênese as espermátides apresentam um corpúsculo nucleolar na periferia nuclear (Figura 14 p-q). No decorrer da diferenciação as marcações desaparecem (Figura 14 r).

#### 3.4.2. *Panstrongylus herreri*

(Figuras 15-18)

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo apresentam um corpúsculo impregnado pelos íons prata com vesículas no seu interior. Estes núcleos também apresentam halo nucleolar levemente corado ao redor do corpúsculo e em certas partes da cromatina (Figura 15 a-b).

Os núcleos interfásicos das células spermatogoniais possuem corpúsculos nucleolares na periferia ou centro nuclear. No início da intérfase os corpúsculos nucleolares estão espalhados no interior do núcleo (Figura 15 c-g).

Os núcleos em início de prófase (estádio confuso) apresentam vários corpúsculos nucleolares em seu interior e uma região de nucléolo mais fortemente impregnada pelos íons prata (Figura 15 h-m). Em estádios mais adiantados da prófase I meiótica os cromossomos sexuais são fortemente impregnados pela prata e observa-se a ligação de autossomos a região nucleolar (Figura 15 n-p e Figura 16 a-c).



O diplóteno da prófase meiótica apresenta cromossomos sexuais fortemente impregnados pelos íons prata; isto fica evidente pelo fato da região nucleolar coincidir com a localização dos heterocromossomos. Adicionalmente nesta fase pode-se observar a ligação de um ou dois autossomos à região nucleolar (Figura 16 d-m).

Na diacinese o corpúsculo nucleolar, com formato arredondado, não é mais observado, sendo que em seu lugar estão os cromossomos sexuais fortemente impregnados pela prata. Nesta fase ocorre a ligação cromatínica de um ou dois autossomos aos cromossomos sexuais (Figura 16 n-q, Figura 17 a-b).

Na metáfase da primeira divisão meiótica os cromossomos sexuais apresentam-se individualizados e os bivalentes autossômicos estão bastante condensados. Neste estágio aparecem corpúsculos e fragmentos nucleolares ao lado do material nuclear, provavelmente originários da desorganização nucleolar (figura 17 c-j).

A metáfase da segunda divisão meiótica apresenta cromossomos sexuais ligados entre si e posicionados no centro do anel formado pelos autossomos. Nestas células também são observados corpúsculos e fragmentos nucleolares (figura 17 l-n, figura 18 a-c).

A anáfase meiótica apresenta cromossomos de migração tardia. Nesta fase são observados corpúsculos e fragmentos nucleolares espalhados no interior da célula em divisão (figura 18 d-l).

As espermatídes no início da espermiogênese apresentam corpúsculos nucleolares periféricos (figura 18 m-o) e com a diferenciação, estas marcações pelo nitrato de prata desaparecem (figura 18 q-s)

A tabela 2 contém uma comparação dos principais resultados observados através da coloração com nitrato de prata.

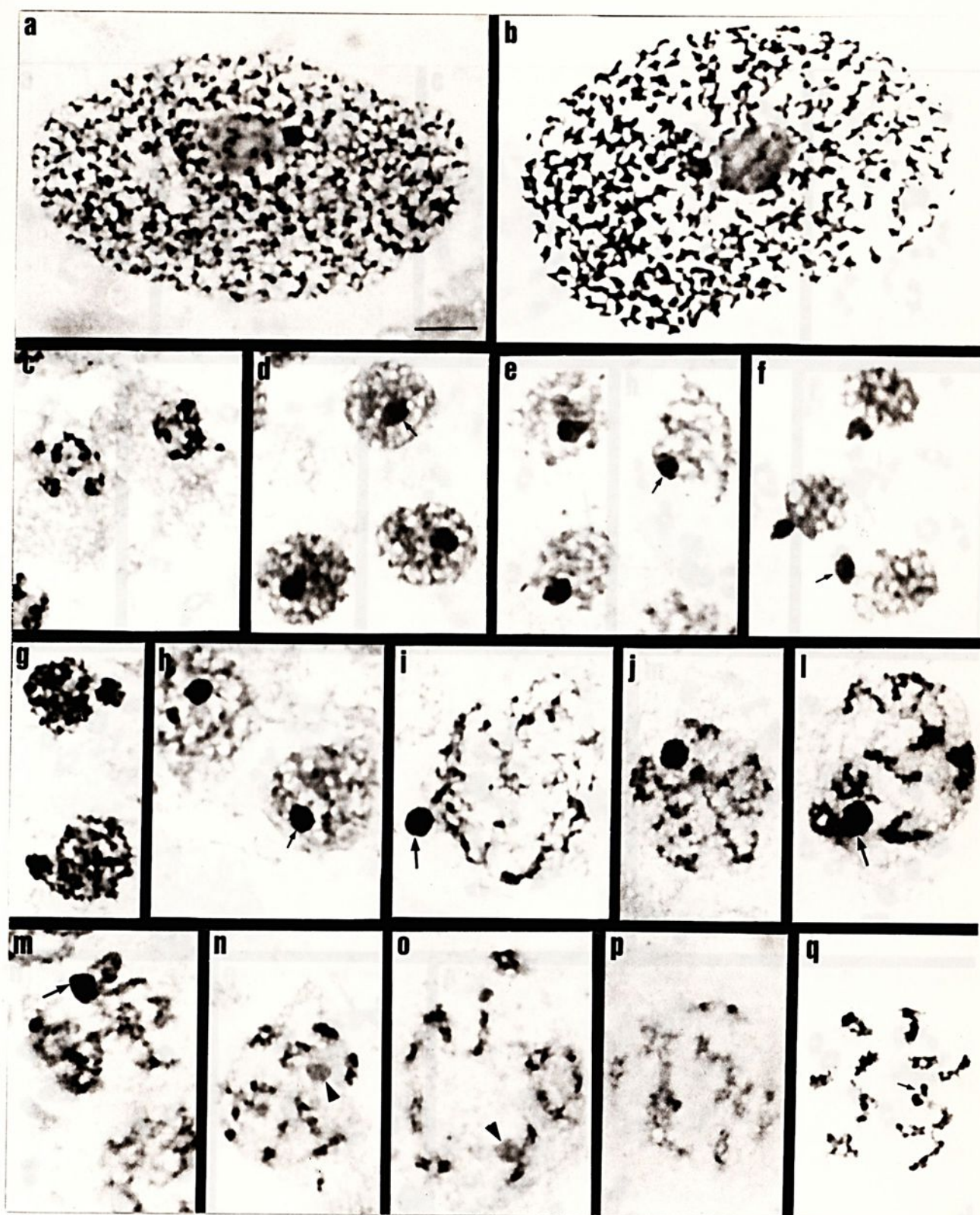


TABELA 2

Comparação dos principais resultados obtidos através da impregnação com nitrato de prata, em testículos de machos adultos jovens das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herrei*:

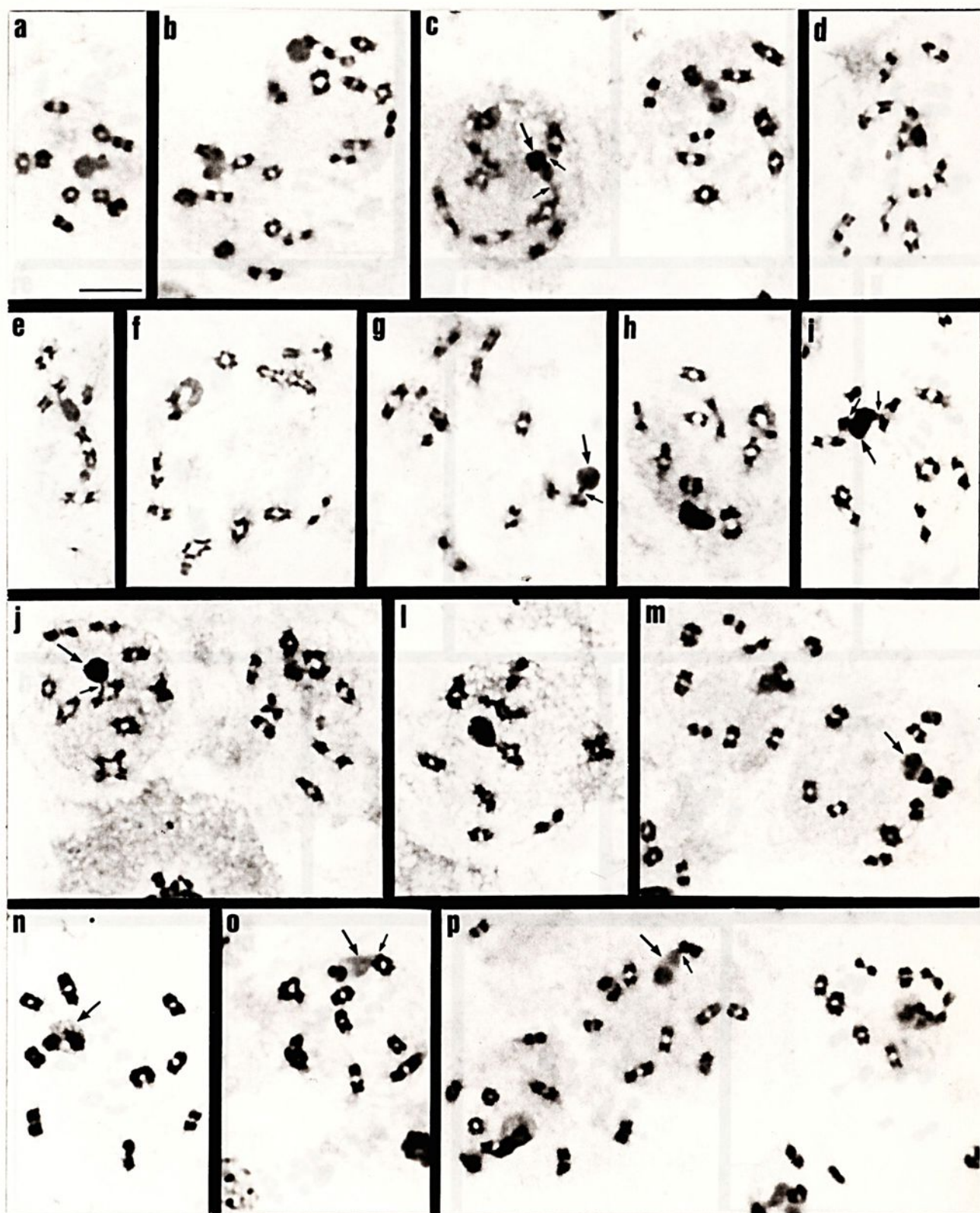
| <u>ESTRUTURAS<br/>CELULARES DO<br/>TÚBULO TESTICULAR</u>                | <i>P. megistus</i>                                                                                                                                                                                                                      | <i>P. herrei</i>                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Núcleos poliplóides da parede do túbulo testicular                   | ↪ Presença de corpúsculo nucleolar com vesículas e de halo nucleolar ao redor deste.                                                                                                                                                    | ↪ Presença de corpúsculo nucleolar com vesículas e halo nucleolar ao redor deste e em certas partes da cromatina.                                                                  |
| 2) Núcleos interfásicos das células espermatogoniais                    | ↪ Presença de corpúsculos nucleolares centrais ou periféricos. Também são observados corpúsculos nucleolares espalhados no interior do núcleo em estádios mais iniciais.                                                                | ↪ Presença de corpúsculos nucleolares centrais ou periféricos. Também são observados corpúsculos nucleolares espalhados no interior do núcleo em estádios mais iniciais.           |
| 3) Núcleos da prófase I da meiose (estádio confuso)                     | ↪ Presença de corpúsculo nucleolar fortemente impregnado pela prata.<br>↪ Cromossomos ligados à região nucleolar.                                                                                                                       | ↪ Presença de vários pontos nucleolares no interior do núcleo e de um corpúsculo nucleolar fortemente impregnado.                                                                  |
| 4) Núcleos da prófase meiótica (estádio confuso) em fase mais adiantada | ↪ Presença de marcação nucleolar tênue e cromossomos sexuais fortemente impregnados pelos íons prata.<br>↪ Ligação de autossomos à região nucleolar.                                                                                    | ↪ Não se observa o formato característico do nucléolo e os cromossomos sexuais são fortemente impregnados pela prata.<br>↪ Ligação de autossomos aos cromossomos sexuais.          |
| 5) Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno)                           | ↪ Presença de região nucleolar impregnada por íons prata, com cromossomos sexuais envolvidos nesta região.<br>↪ Ligação de um ou dois autossomos à região nucleolar                                                                     | ↪ Presença de cromossomos sexuais fortemente impregnados pelos íons prata.<br>↪ Ligação de um ou dois autossomos à região nucleolar.                                               |
| 6) Núcleos da prófase I da meiose (diacinese)                           | ↪ Cromossomos sexuais fortemente impregnados pela prata e região nucleolar tenuemente corada.<br>↪ Ligação de pelo menos um autossomo à região nucleolar.                                                                               | ↪ Cromossomos sexuais fortemente impregnados pelos íons prata e desaparecimento da região nucleolar característica.<br>↪ Ligação de um ou dois autossomos aos cromossomos sexuais. |
| 7) Metáfases da primeira divisão meiótica                               | ↪ Alguns bivalentes autossômicos apresentam impregnação pelos íons prata.<br>↪ Presença de um autossomo ligado a corpúsculos impregnados pelos íons prata.<br>↪ Presença de fragmentos e corpúsculos nucleolares no interior da célula. | ↪ Bivalentes autossômicos bastante condensados.<br>↪ Presença de fragmentos e corpúsculos nucleolares no interior da célula.                                                       |
| 8) Metáfases da segunda divisão meiótica                                | ↪ Presença de corpúsculos e fragmentos nucleolares no interior da célula.                                                                                                                                                               | ↪ Presença de corpúsculos e fragmentos nucleolares no interior da célula.                                                                                                          |
| 9) Anáfases meióticas                                                   | ↪ Presença de corpúsculos e fragmentos nucleolares em cada pólo da célula em divisão.                                                                                                                                                   | ↪ Presença de corpúsculos e fragmentos nucleolares em cada pólo da célula em divisão.<br>↪ Presença de cromossomo com migração tardia                                              |
| 10) Espermátides                                                        | ↪ Presença de corpúsculo nucleolar na periferia nuclear.<br>↪ Desaparecimento do corpúsculo após diferenciação.                                                                                                                         | ↪ Presença de corpúsculo nucleolar na periferia nuclear.<br>↪ Desaparecimento do corpúsculo após diferenciação.                                                                    |





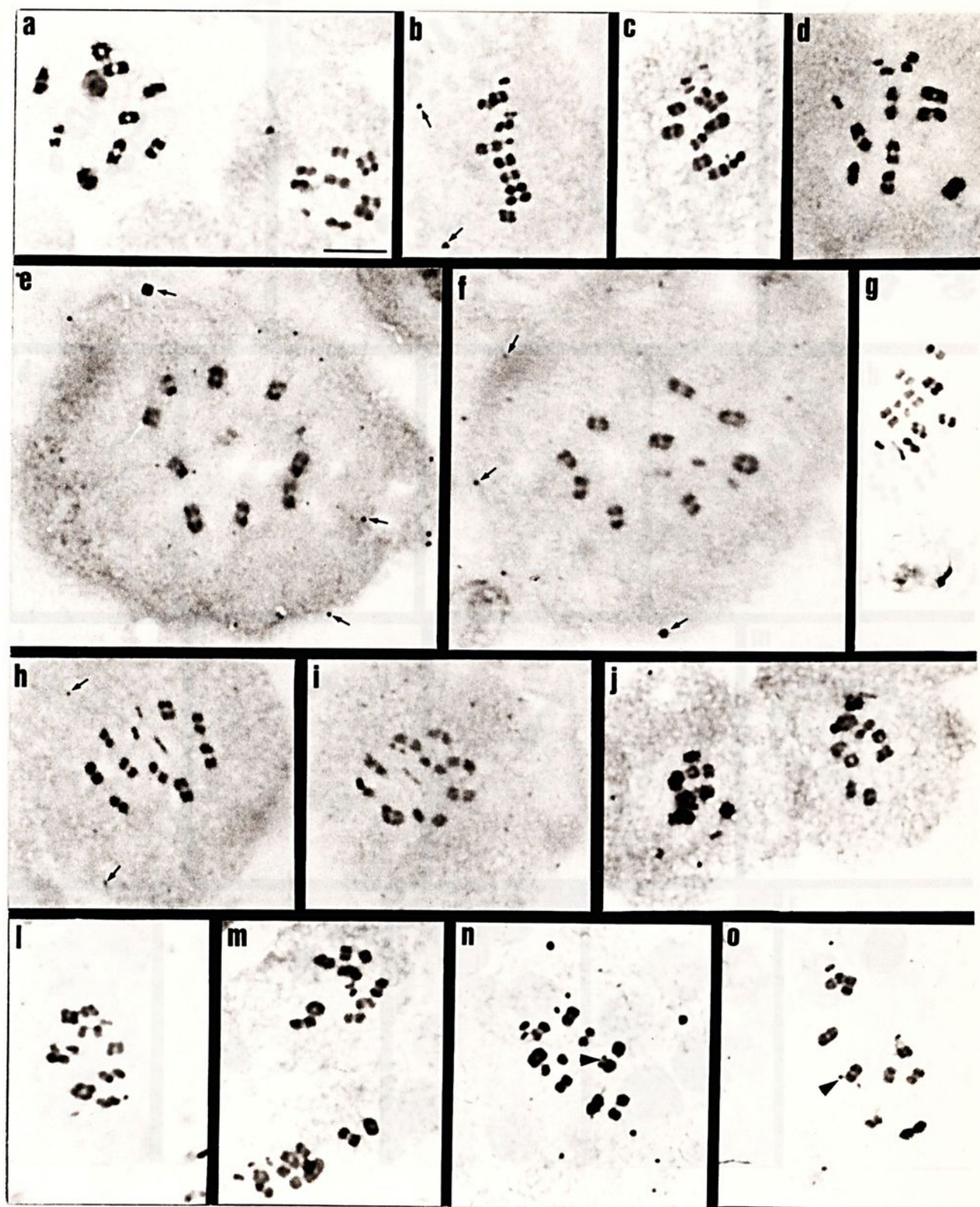
**Fig. 11.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a-b) Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com corpúsculo impregnado pela prata. Notar vesículas no interior do corpúsculo e o halo nucleolar ao redor deste. (c-h) Núcleos interfásicos das células espermatogoniais dos túbulos. Observar corpúsculos nucleolares dispersos em (c). As setas indicam corpos nucleolares que ora estão no centro, ora na periferia do núcleo. (i-q) Núcleos em prófase I da meiose (estádio confuso). As setas maiores indicam a região nucleolar. Notar a tênue ligação dos autossomos ao nucléolo. A seta menor indica os cromossomos sexuais fortemente marcados. Em (n-o) pode ser observada uma menor marcação na região nucleolar (pontas de seta). Escala=10μm.





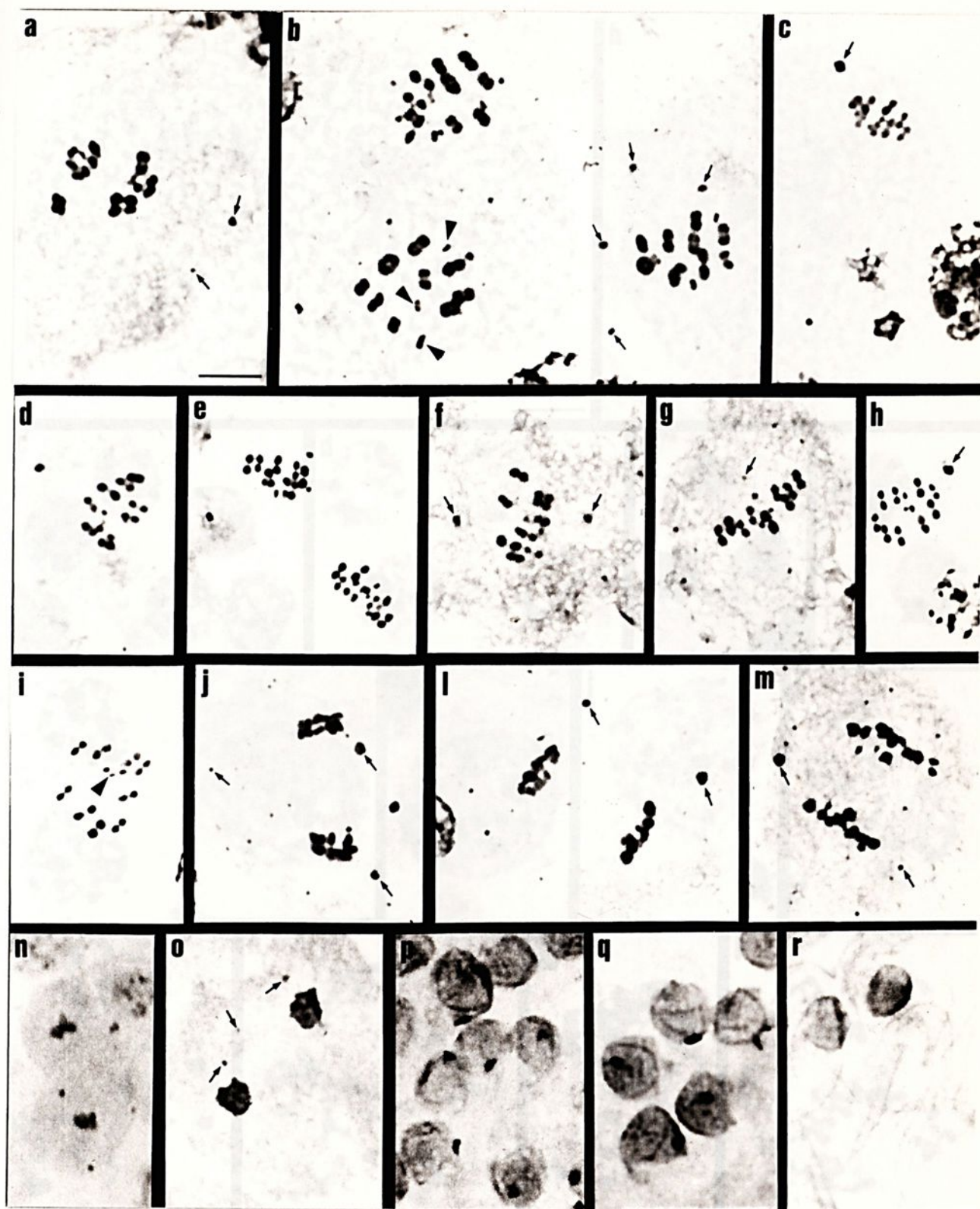
**Fig. 12.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a-l) Núcleos em prófase I da meiose (diplóteno). As setas maiores indicam a região nucleolar e as menores indicam a ligação de autossomos ao nucléolo. (m-p) Núcleos em prófase I da meiose (diacinese). As setas maiores indicam a região nucleolar e as menores a ligação de autossomos à essa região. Observar que nesta fase houve uma tênue impregnação pelos íons prata. Escala=10 $\mu$ m.





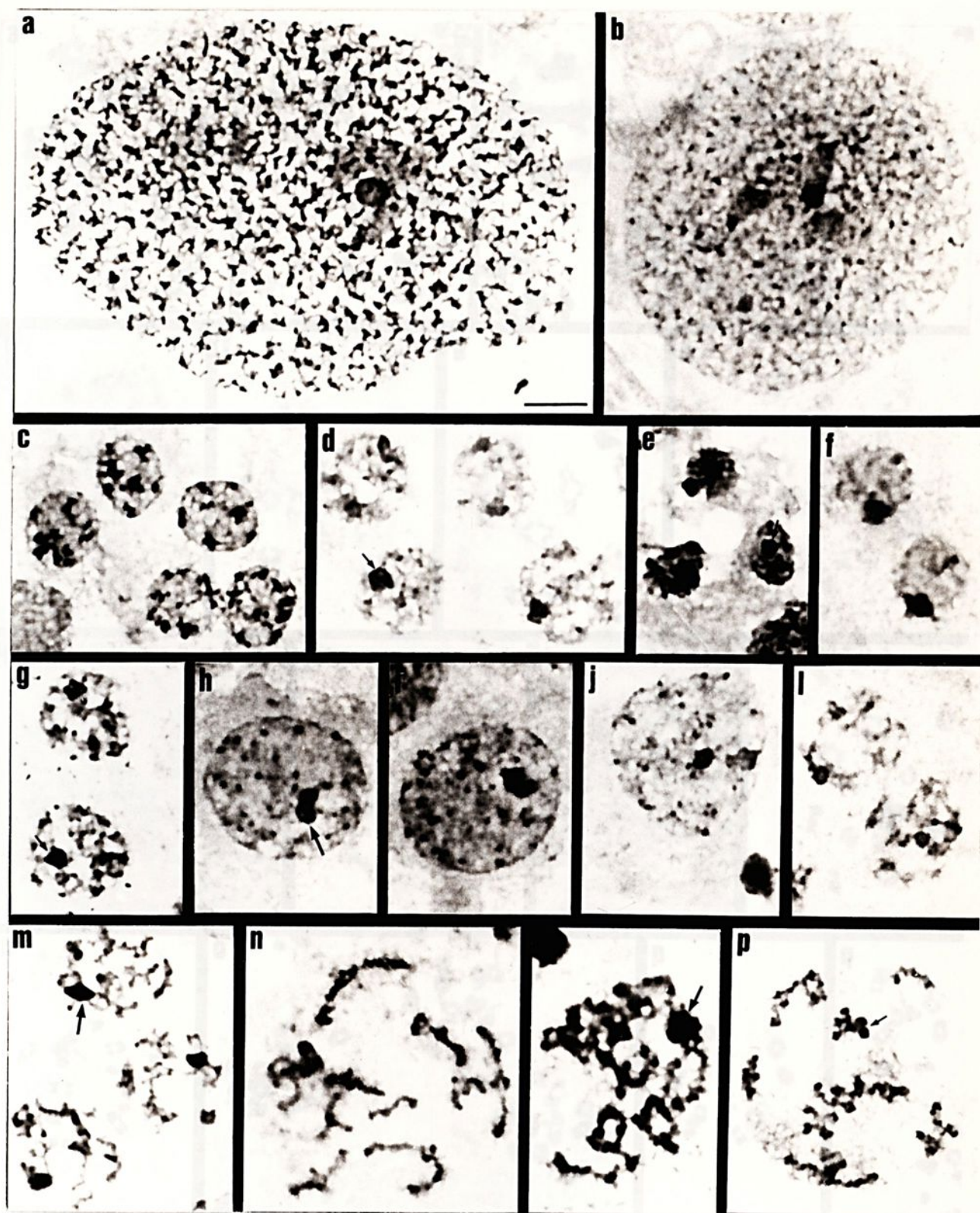
**Fig. 13.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a) Núcleo em prófase I da meiose (diacinese). Notar a leve impregnação pelos íons prata na região nucleolar e a ligação de um autossomo a esta região. (b-o) Metáfases da primeira divisão meiótica. As pontas de seta indicam corpúsculos impregnados pelos íons prata ligados a autossomos. As setas assinalam corpúsculos e fragmentos nucleolares dispersamente localizados. Escala=10μm.





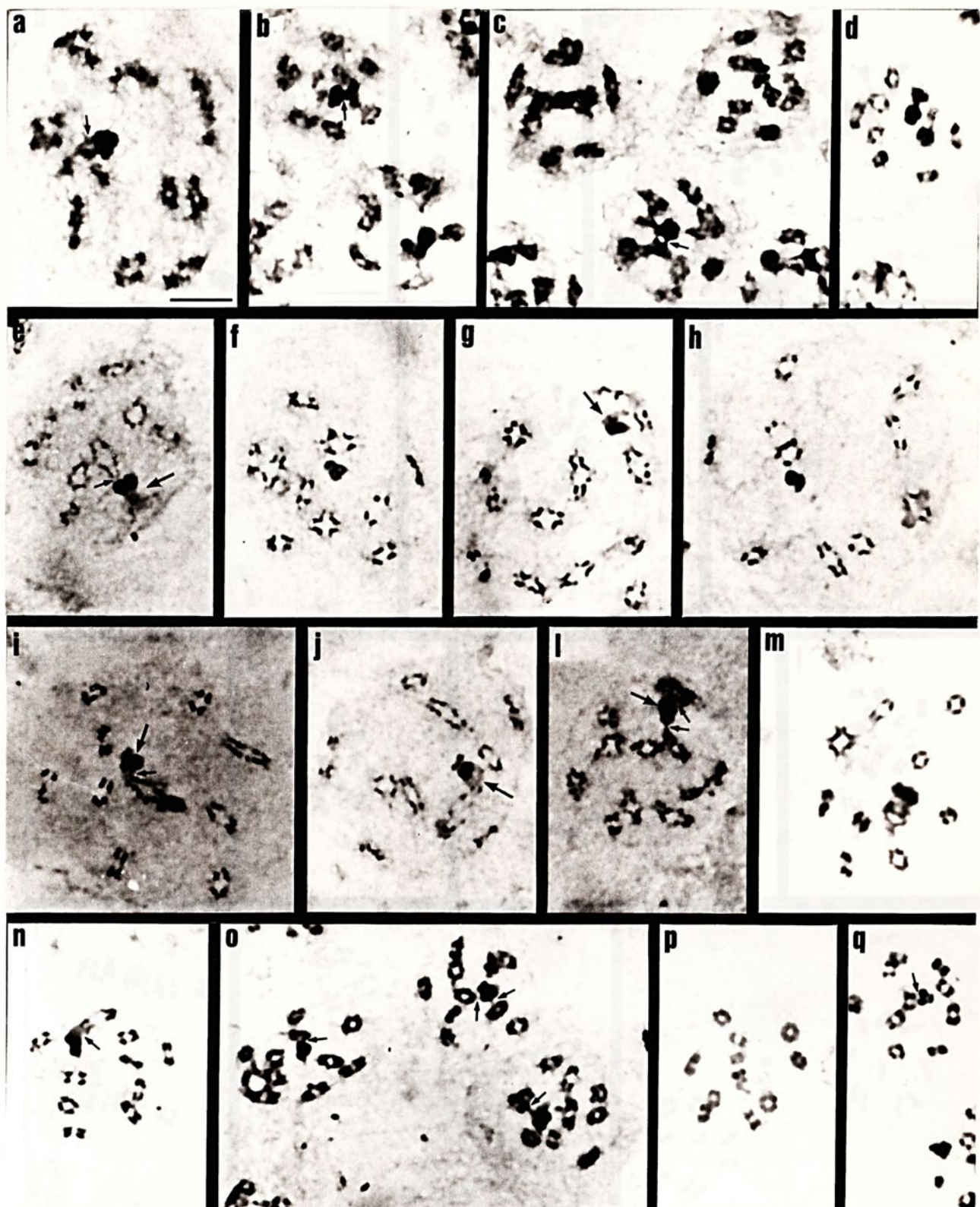
**Fig.14.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a-b) Metáfases da primeira divisão meiótica. As pontas de seta indicam os cromossomos sexuais e as setas fragmentos e corpúsculos nucleolares dispersos na célula. (c-i) Metáfases da segunda divisão meiótica. A ponta de seta assinala os cromossomos sexuais e as setas indicam corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata. (j-m) Anáfases meióticas. As setas indicam corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata. (n-o) Telófases meióticas com setas indicando fragmentos nucleolares. (p-q) Espermatídes no início da espermiogênese com presença de corpúsculos nucleolares. (r) Espermatídes em estágio mais adiantado da espermiogênese com ausência de marcação pelos íons prata. Escala=10µm.





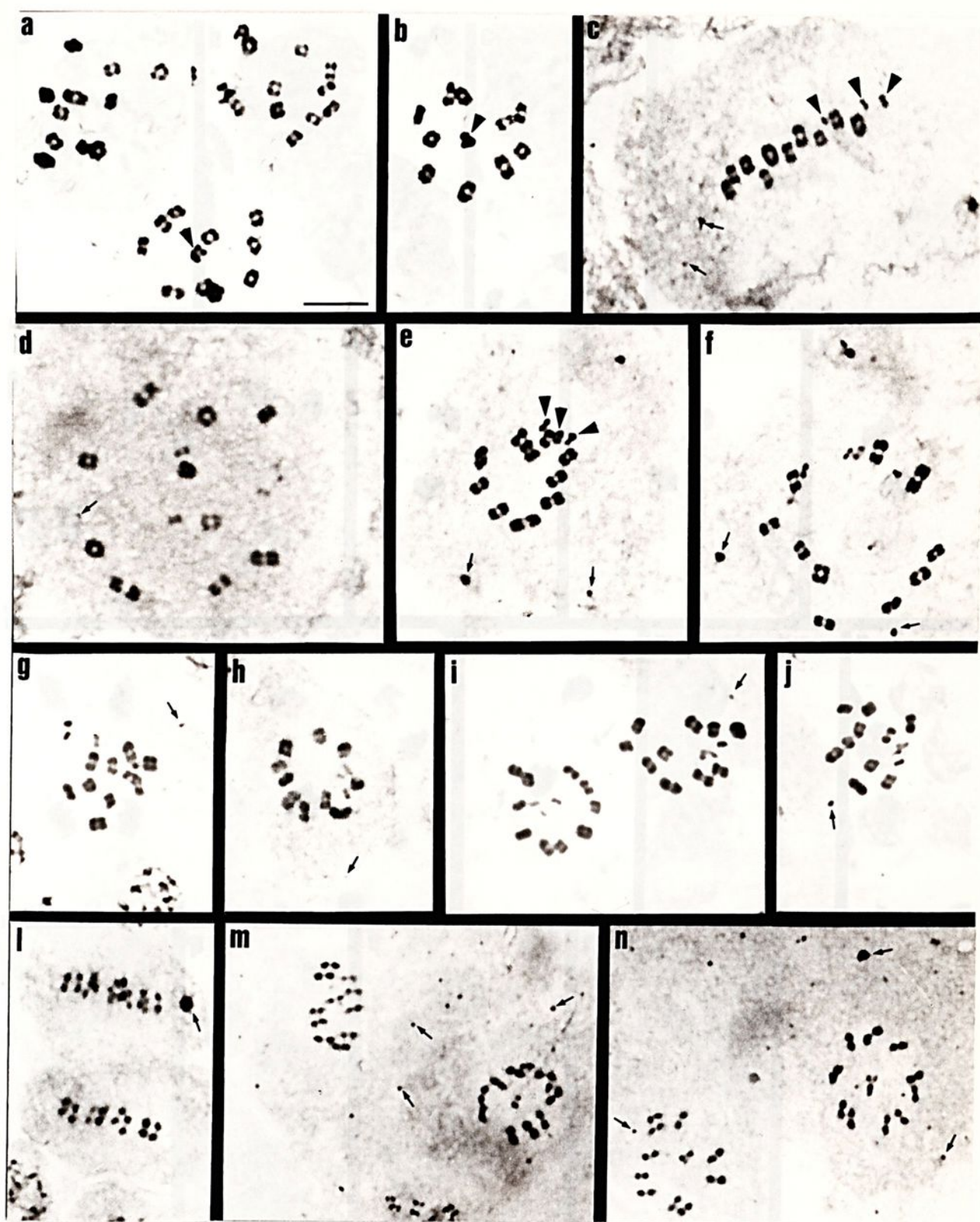
**Fig. 15.** Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a-b) Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com corpúsculo impregnado pelos íons prata. Notar a presença de vesículas no interior deste corpúsculo e o halo nucleolar levemente marcado ao redor deste e em certas partes da cromatina. (c-g) Núcleos interfásicos das células espermatogoniais dos túbulos. Notar a presença de corpúsculos nucleolares dispersos em (c). As setas assinalam regiões nucleolares centrais e periféricas ao núcleo. (h-p) Núcleos em prófase I da meiose (estádio confuso). Notar a ligação de autossomos ao nucléolo. As setas maiores indicam corpúsculos nucleolares e a menor indica os cromossomos sexuais fortemente impregnados em (p). Escala=10 $\mu$ m.





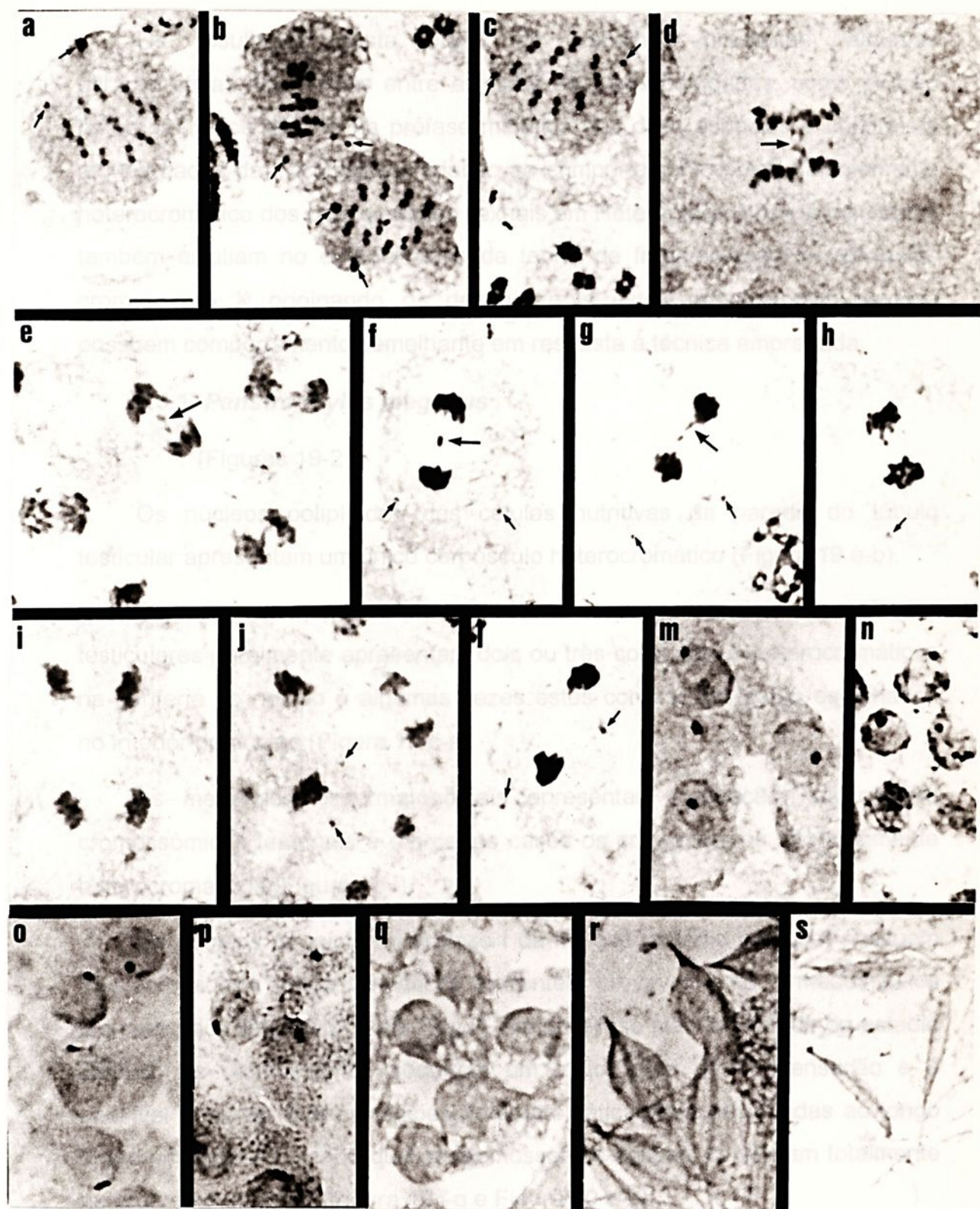
**Fig. 16.** Túbulos testiculares de *P. herreri* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a-c) Núcleos da prófase I da meiose (estádio confuso). As setas indicam autossomos ligados ao corpúsculo nucleolar. (d-m) Núcleos diplotênicos. As setas maiores indicam corpúsculos nucleolares, provavelmente envolvendo os cromossomos sexuais e as menores assinalam a ligação de autossomos à região nucleolar. (n-q) Núcleos da prófase I da meiose (diacinese). Notar os cromossomos sexuais fortemente impregnados pelos íons prata. As setas indicam ligações cromatínicas entre alguns autossomos e os cromossomos sexuais. Escala=10μm.





**Fig. 17.** Túbulos testiculares de *P. herrerii* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a-b) Núcleos da prófase I da meiose (diacinese). Observar os cromossomos sexuais fortemente corados pelo nitrato de prata (pontas de seta). (c-j) Metáfases da primeira divisão meiótica. As pontas de seta assinalam os cromossomos sexuais e as setas indicam corpúsculos e fragmentos nucleolares dispersos na célula. (l-n) Metáfases da segunda divisão meiótica. Notar o bloco formado pelos cromossomos sexuais no centro do anel de autossomos. As setas indicam corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata. Escala=10 $\mu$ m.





**Fig. 18.** Túbulos testiculares de *P. herreri* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a-c) Metáfases da segunda divisão meiótica. Observar a disposição anelar dos autossomos com os cromossomos sexuais ao centro. As setas indicam corpúsculos e fragmentos nucleolares. (d-l) Anáfases meióticas. As setas maiores indicam cromossomos de migração tardia e as menores assinalam corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata. (m-p) Espermátides na fase inicial da espermiogênese. Observar a presença de um corpúsculo nucleolar em cada célula. (q-s) Espermátides em estágio de diferenciação mais adiantado com ausência de impregnação pelos íons prata. Escala=10µm.



### 3.5. Bandamento-C

Os resultados desta etapa do trabalho apresentam algumas características diferenciais entre as duas espécies estudadas, como padrão heterocromático distinto na prófase meiótica das duas espécies e confirmam alguns dados da literatura em relação ao comportamento predominantemente heterocromático dos cromossomos sexuais em Heteroptera. Nossos resultados também auxiliam no entendimento da teoria de fragmentação de um único cromossomo X originando os demais, pois estes cromossomos sexuais possuem comportamento semelhante em resposta à técnica empregada.

#### 3.5.1. *Panstrongylus megistus*

(Figuras 19-21)

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo testicular apresentam um único corpúsculo heterocromático (Figura 19 a-b).

Os núcleos interfásicos das células espermatozoniais dos túbulos testiculares geralmente apresentam dois ou três corpúsculos heterocromáticos na periferia do núcleo e algumas vezes estes corpúsculos estão espalhados no interior do núcleo (Figura 19 c-e).

As metáfases espermatozoniais apresentam marcação nas regiões cromossômicas terminais e em certos casos os cromossomos são totalmente heterocromáticos (Figura 19 f).

Os núcleos no início da prófase I da meiose (estádio confuso) possuem três corpúsculos heterocromáticos evidentes, provavelmente formados pelos cromossomos sexuais (Figura 19 g-i). Em uma fase mais adiantada do estágio confuso os cromossomos adquirem um maior grau de condensação e é possível observar que as regiões heterocromáticas são espalhadas ao longo dos cromossomos, sendo que os cromossomos sexuais continuam totalmente heterocromatinizados (Figura 19 j-q e Figura 20 a-b).

No diplóteno-diacinese da prófase I meiótica as cromátides apresentam um aspecto de cruz ou anel (quiasmas) que refletem a ocorrência de *crossing-over*. Nesta fase alguns bivalentes autossômicos exibem regiões heterocromáticas e outros são totalmente heterocromáticos (Figura 20 c-t). É importante ressaltar o comportamento dos cromossomos sexuais nesta fase. Os cromossomos X ora apresentam-se heterocromáticos (Figura 20 j, o, q), ora eucromáticos (Figura 20 f, g, l) e o Y sempre está heterocromático como



sugere a literatura (Figura 20 c-t). A resposta dos cromossomos X à técnica de bandamento-C indica que estes cromossomos possuem um considerável grau de semelhança entre si, e possivelmente a origem dos vários cromossomos X em Heteroptera é a fragmentação de um único X.

Nas metáfases da primeira e segunda divisões meióticas é característico em Heteroptera os cromossomos estarem bastante condensados, dificultando o bandamento cromossômico, que é melhor evidenciado nos estádios profásicos. Na metáfase I os heterocromossomos geralmente apresentam-se individualizados (Figura 21 a-c). Na metáfase II da meiose estes cromossomos estão posicionados ao centro do arranjo anelar dos autossomos e apresentam-se unidos, formando um pseudo-trivalente, pelo fato de possuírem segregação pós-reducional (Figura 21 d-f).

Na anáfase meiótica os cromossomos migram gradualmente para os pólos da célula e não foi observada ocorrência de cromossomos com migração tardia (Figura 21 g-m). Na telófase ocorre reconstituição nuclear sendo que as células inicialmente permanecem unidas por pontes cromatínicas (Figura 21 n-o). Nestas fases não é possível a observação de regiões heterocromáticas.

Nas espermatídes, no início da espermiogênese, existem pontos heterocromáticos na periferia do núcleo (Figura 21 p-q). Estes pontos desaparecem conforme a diferenciação celular avança (Figura 21 r-t).

### 3.5.2. *Panstrongylus herreri*

(Figuras 22-24)

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo testicular apresentam único corpúsculo heterocromático (Figura 22 a-b).

Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais dos túbulos testiculares apresentam dois ou três corpúsculos heterocromáticos na periferia nuclear (Figura 22 c).

Os núcleos no início da prófase I da meiose (estádio confuso) apresentam vários pontos heterocromáticos espalhados por todo o interior nuclear; também é possível observar os corpúsculos heterocromáticos formados pelos cromossomos sexuais (Figura 22 d-e).

Em estádios de maior condensação cromossômica, na prófase I meiótica, os autossomos apresentam marcações heterocromáticas nas regiões teloméricas e os cromossomos sexuais continuam totalmente heterocromáticos



como no início da prófase (Figura 22 f-i). Em fases mais adiantadas do estágio confuso, além das marcações terminais, alguns autossomos possuem regiões banda-C positivas em suas regiões centrais (Figura 23 a-g).

Na prófase I (diplóteno-diacinese) alguns bivalentes autossômicos possuem regiões heterocromáticas e outros são totalmente heterocromáticos. Os cromossomos sexuais permanecem heterocromáticos por todo estágio (Figura 23 h-r).

Nas metáfases da primeira divisão meiótica os autossomos estão bastante condensados e os cromossomos sexuais apresentam-se individualizados (Figura 24 a-c). Na metáfase II os autossomos dispõem-se de forma anelar e os heterocromossomos formam um bloco comportando-se como um pseudo-trivalente (Figura 24 d-e). Nestas fases, devido a condensação cromossômica, não é possível observar bandamento cromossômico.

Na anáfase meiótica ocorre migração gradual dos cromossomos para os pólos celulares e um cromossomo apresenta migração tardia (Figura 24 f-h). Na telófase ocorre reorganização nuclear e é observada a presença de pontes cromatínicas entre as células filhas (Figura 24 i-j).

Nas espermatídes iniciais são observados pequenos pontos heterocromáticos na periferia da célula (Figura 24 l-m), no decorrer da diferenciação celular estas marcações desaparecem (Figura 24 n-p).

Os principais resultados comparativos obtidos, através da técnica de bandamento-C, encontram-se sumarizados na tabela 3.

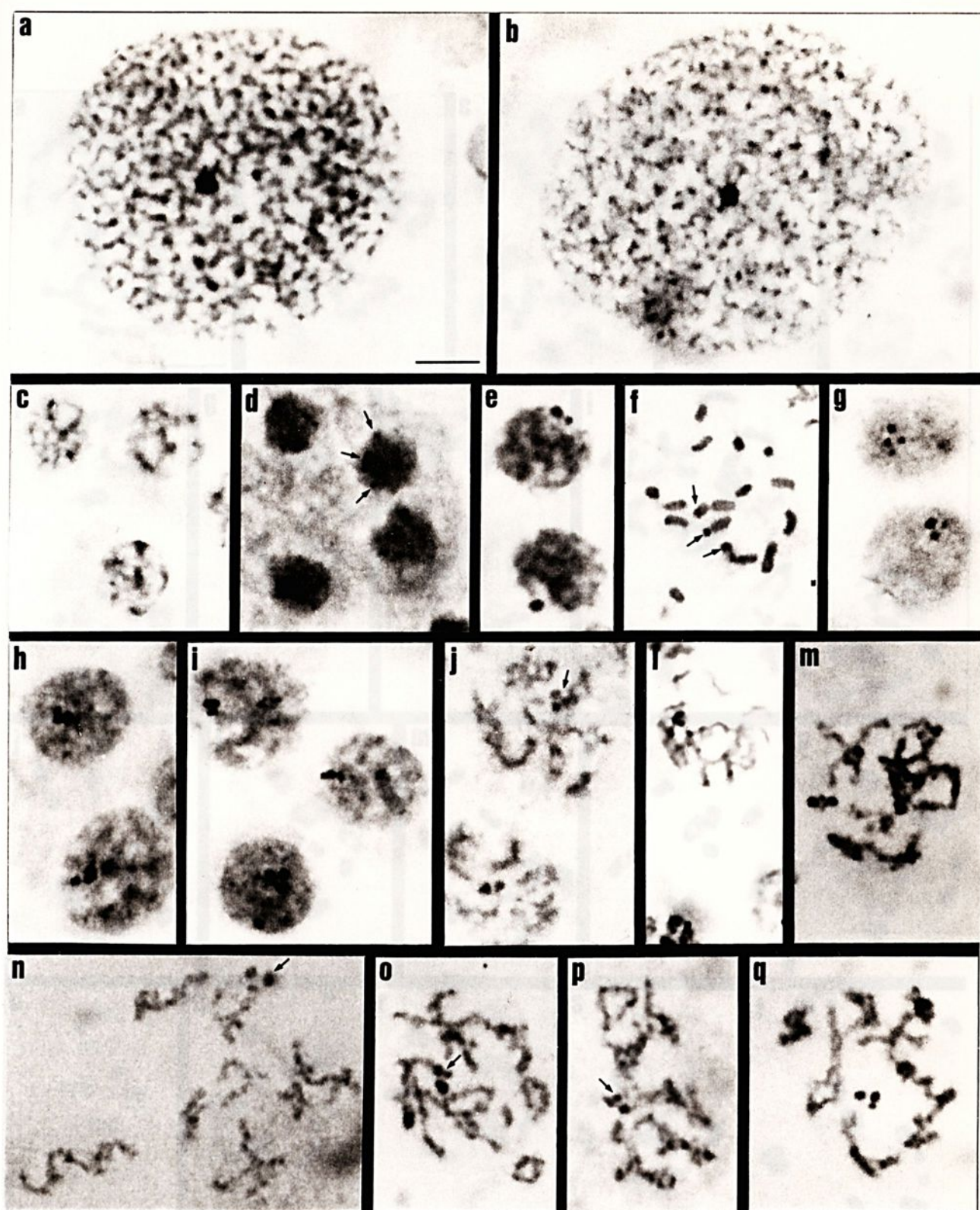


TABELA 3

Comparação dos principais resultados obtidos através da técnica de bandamento-C, em testículos de machos adultos jovens das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*:

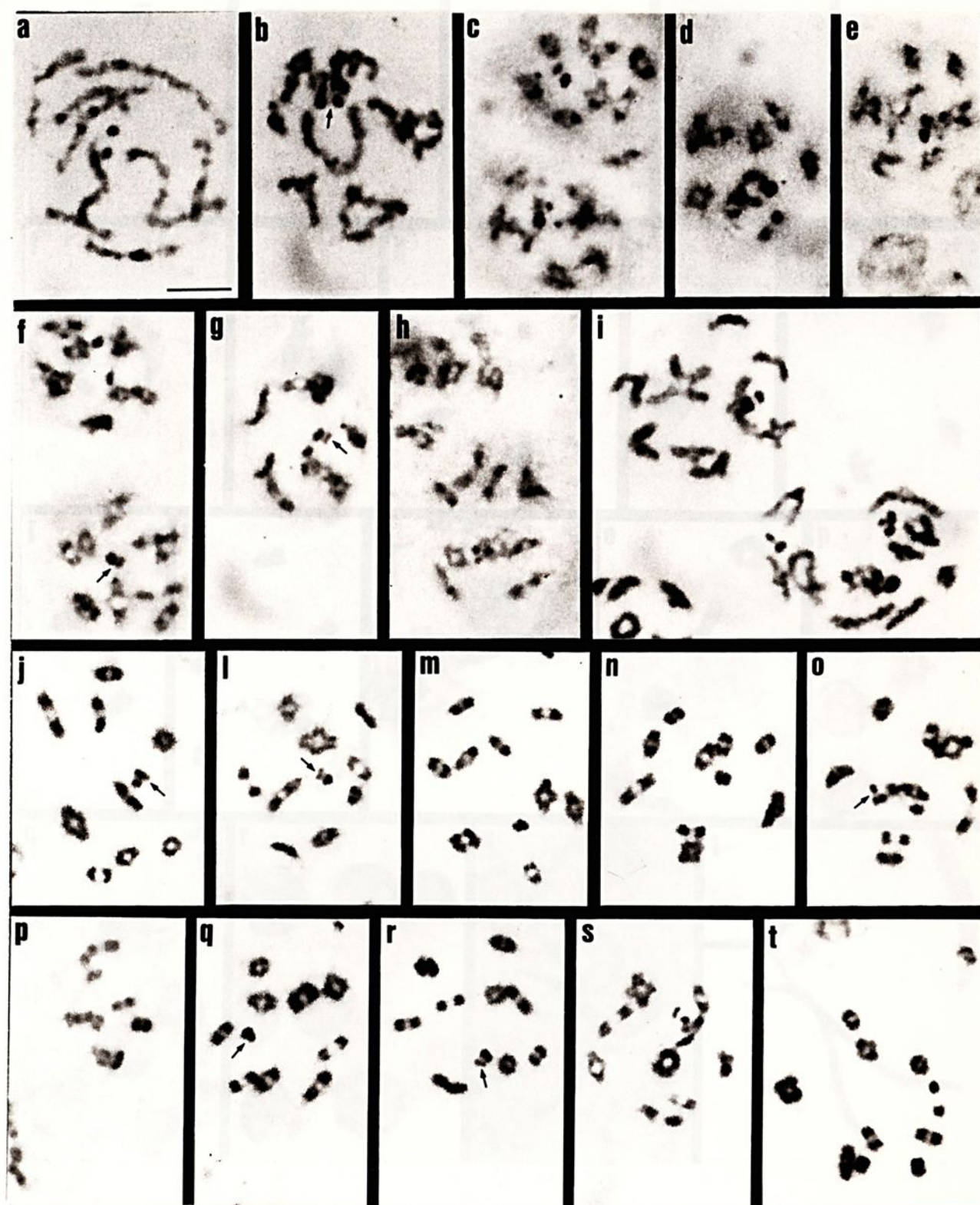
| <b>ESTRUTURAS CELULARES DO TÚBULO TESTICULAR</b>                        | <b><i>P. megistus</i></b>                                                                                                                                                                           | <b><i>P. herreri</i></b>                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Núcleos poliplóides da parede do túbulo testicular                   | ↪ Único corpúsculo heterocromático.                                                                                                                                                                 | ↪ Único corpúsculo heterocromático.                                                                                                                                                           |
| 2) Núcleos interfásicos das células espermatogoniais                    | ↪ Núcleos com 3 corpúsculos heterocromáticos próximos à periferia.<br>↪ Às vezes os corpúsculos heterocromáticos são espalhados no interior do núcleo.                                              | ↪ Núcleos geralmente com 3 corpúsculos heterocromáticos próximos à periferia.                                                                                                                 |
| 3) Metáfases espermatogoniais                                           | ↪ Marcação na região telomérica de alguns cromossomos.<br>↪ Alguns cromossomos totalmente heterocromáticos.                                                                                         | ↪ Não observada.                                                                                                                                                                              |
| 4) Núcleos da prófase I da meiose (estádio confuso)                     | ↪ Presença de 3 corpúsculos heterocromáticos, provavelmente os cromossomos sexuais.                                                                                                                 | ↪ Presença de vários corpúsculos heterocromáticos no interior do núcleo.<br>↪ Cromossomos sexuais formam um corpúsculo heterocromático.                                                       |
| 5) Núcleos da prófase meiótica (estádio confuso) em fase mais adiantada | ↪ As regiões heterocromáticas são dispersas ao longo dos cromossomos.<br>↪ Os cromossomos sexuais apresentam-se como corpúsculos heterocromáticos.                                                  | ↪ Presença de marcações heterocromáticas nas regiões terminais e centrais dos cromossomos.<br>↪ Heterocromossomos observados na forma de corpúsculos heterocromáticos.                        |
| 6) Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno-diacinese)                 | ↪ Alguns bivalentes autossômicos apresentam-se totalmente heterocromáticos e outros apenas com regiões heterocromáticas.<br>↪ Os cromossomos sexuais X, ora são eucromáticos, ora heterocromáticos. | ↪ Bivalentes autossômicos com regiões heterocromáticas ou totalmente heterocromáticos.<br>↪ Cromossomos sexuais heterocromáticos.                                                             |
| 7) Metáfases da primeira divisão meiótica                               | ↪ 9 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais heterocromáticos.                                                                                                                               | ↪ 10 bivalentes autossômicos e 3 cromossomos sexuais heterocromáticos.                                                                                                                        |
| 8) Metáfases da segunda divisão meiótica                                | ↪ 9 autossomos e 3 cromossomos sexuais heterocromáticos unidos por pontes cromatínicas.                                                                                                             | ↪ 10 autossomos e 3 cromossomos sexuais heterocromáticos unidos por pontes cromatínicas.                                                                                                      |
| 9) Anáfases meióticas                                                   | ↪ Não foi observada a presença de cromossomo com migração tardia.                                                                                                                                   | ↪ Presença de cromossomo com migração tardia.                                                                                                                                                 |
| 10) Espermátides                                                        | ↪ Nos estádios iniciais da espermiogênese observa-se corpúsculos heterocromáticos na periferia da célula.<br>↪ Desaparecimento dos corpúsculos heterocromáticos no decorrer da diferenciação.       | ↪ Nos estádios iniciais da espermiogênese observa-se corpúsculos heterocromáticos na periferia da célula.<br>↪ Desaparecimento dos corpúsculos heterocromáticos no decorrer da diferenciação. |





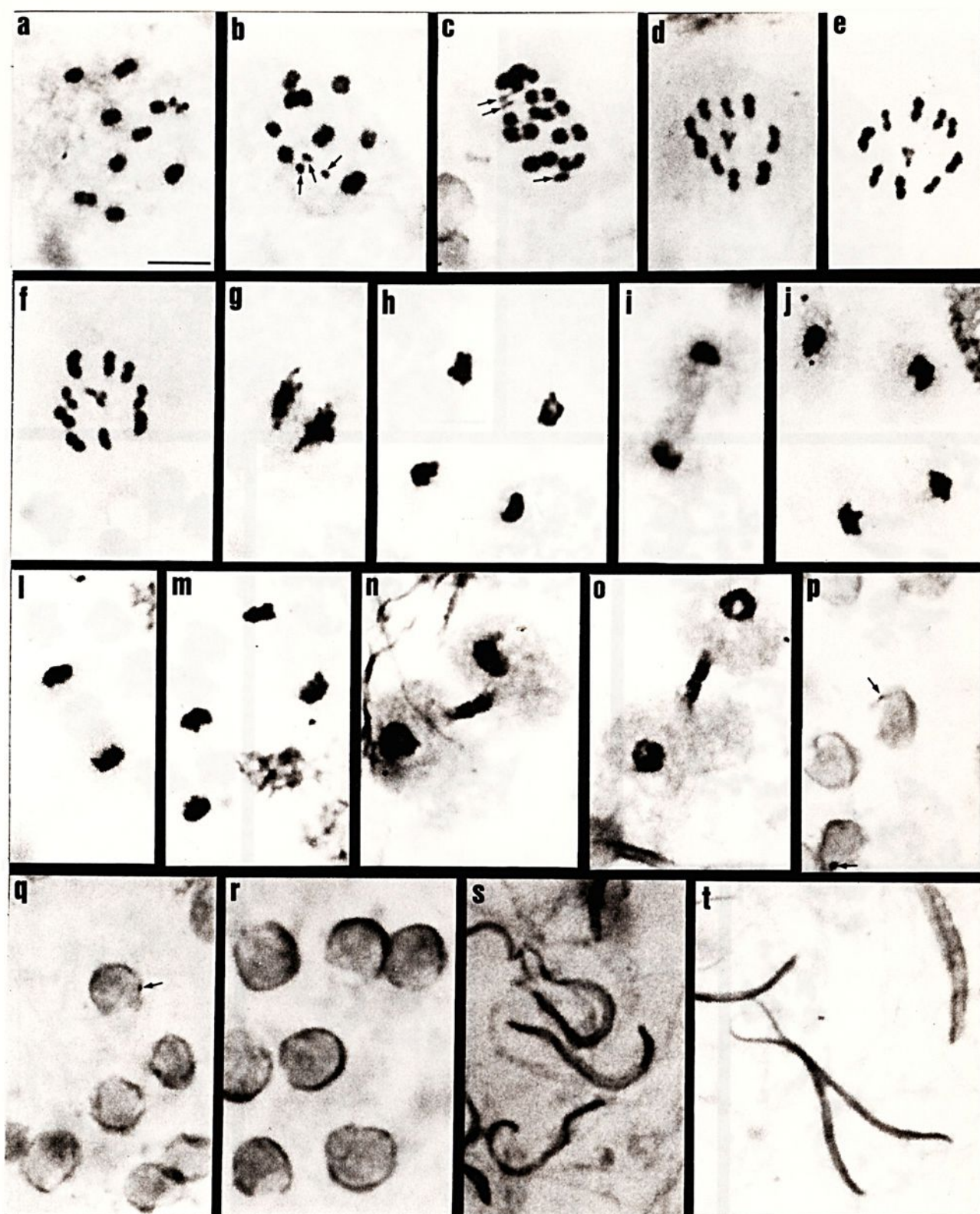
**Fig. 19.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de bandamento-C. (a-b) Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com único corpúsculo heterocromático. (c-e) Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. Observar os corpúsculos heterocromáticos espalhados no interior do núcleo em (c). As setas indicam dois ou três corpúsculos heterocromáticos na periferia do núcleo. (f) Metáfase espermatogonial. As setas indicam regiões cromossômicas banda-C positivas. (g-i) Núcleos no início da prófase I meiótica (estádio confuso) com três corpúsculos heterocromáticos, provavelmente os cromossomos sexuais. (j-q) Núcleos em fase mais avançada da prófase I meiótica (estádio confuso). Notar que as regiões heterocromáticas são bastante espalhadas ao longo dos cromossomos. As setas indicam o bloco heterocromático formado pelos cromossomos sexuais. Escala=10μm.





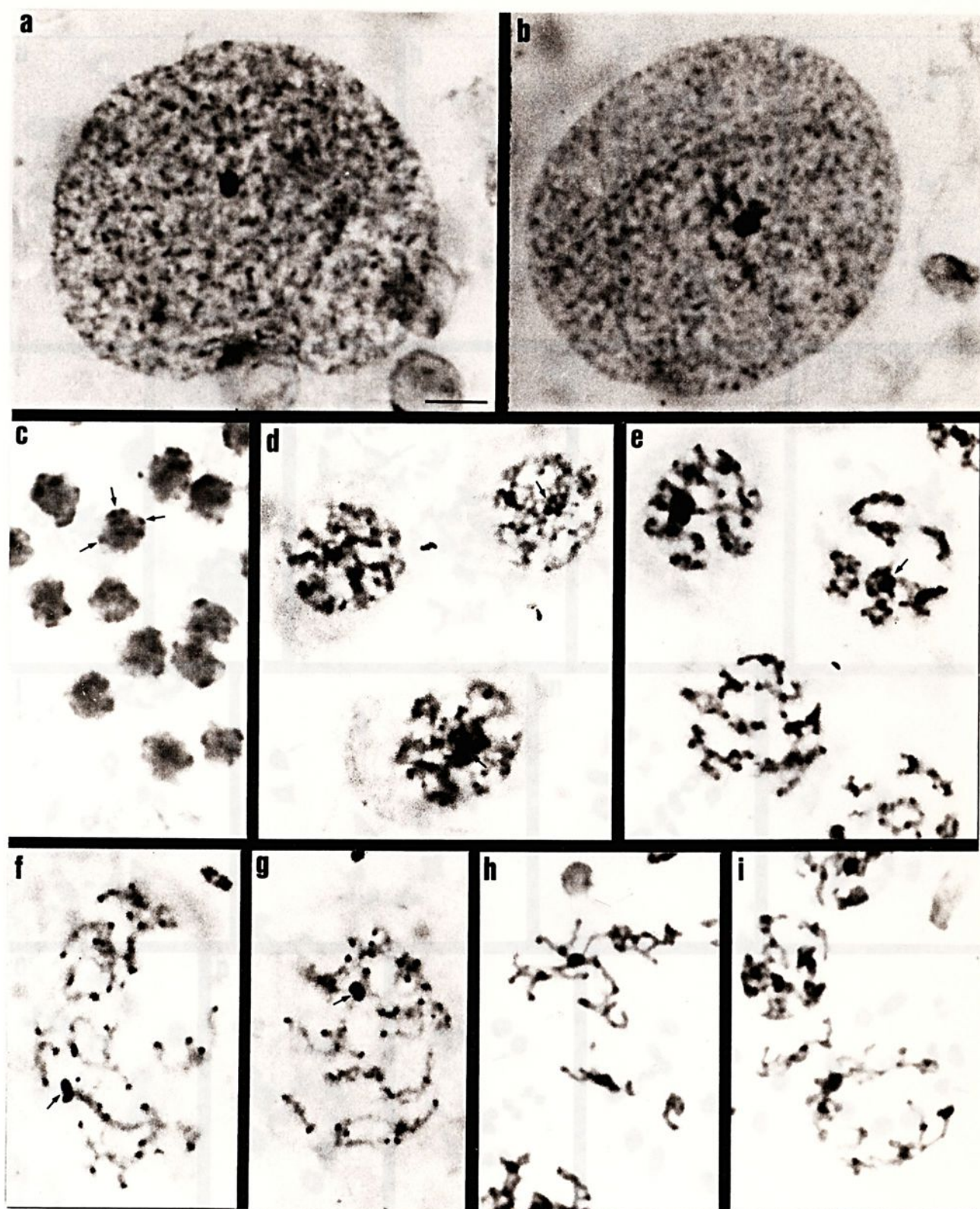
**Fig. 20.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de bandamento-C. (a-b) Núcleos no estágio confuso da prófase I meiótica com regiões heterocromáticas dispersas ao longo dos cromossomos. Notar o bloco heterocromático formado pelos cromossomos sexuais (seta). (c-t) Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). As setas indicam os cromossomos sexuais. Notar que ora os cromossomos X apresentam-se heterocromáticos (j, o, q) e ora eucromáticos (f, g, l). Escala = 10  $\mu$ m.





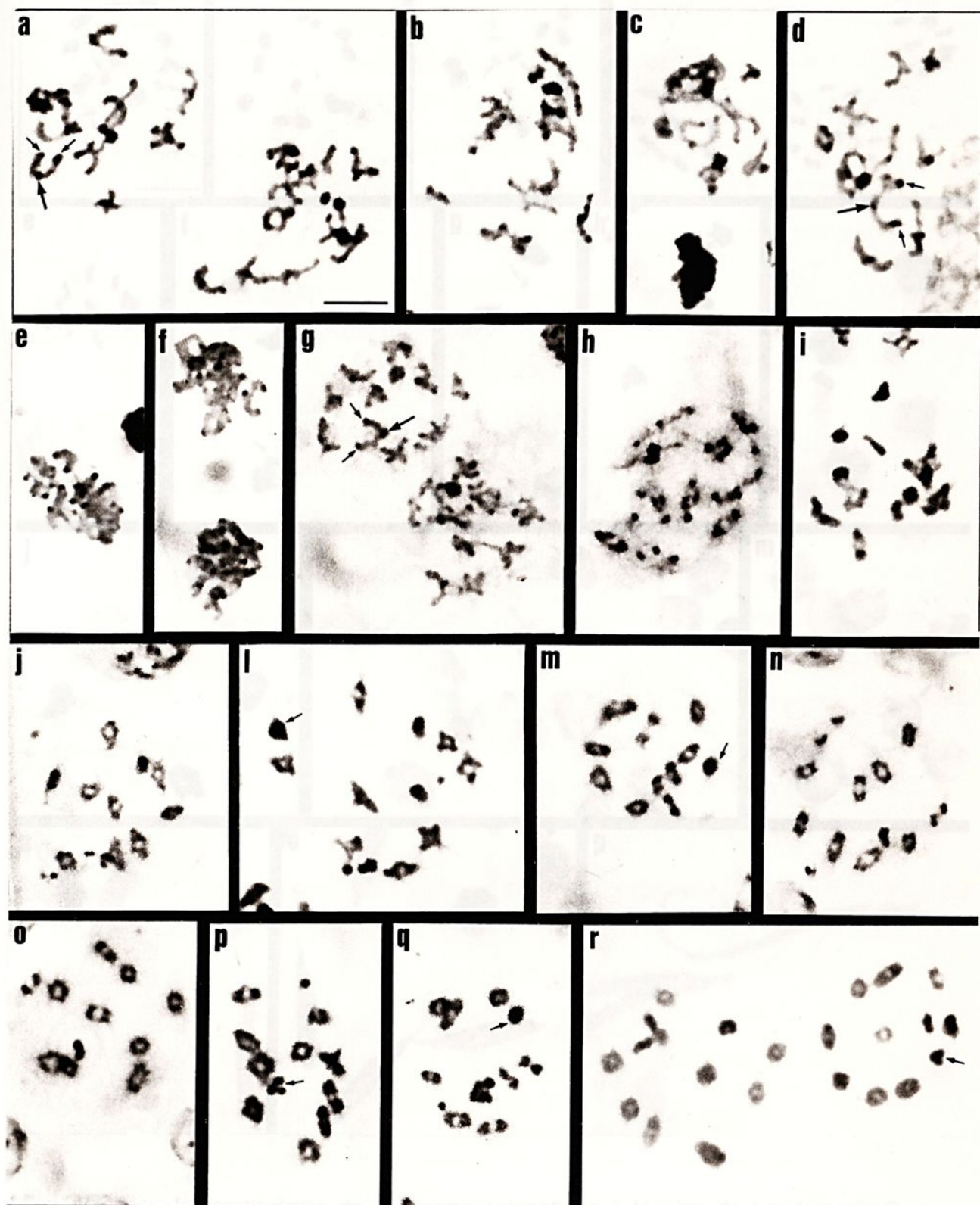
**Fig. 21.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos à técnica de bandamento-C. (a-c) Metáfases da primeira divisão meiótica com 9 bivalentes autossômicos e três cromossomos sexuais indicados pelas setas. (d-f) Metáfases da segunda divisão meiótica com 9 autossomos e três cromossomos sexuais unidos por pontes eucromáticas. Notar a posição dos heterocromossomos no centro do anel formado pelos autossomos. (g-m) Anáfases meióticas com ausência de cromossomos de migração tardia. (n-o) Telófases meióticas com citocinese. (p-q) Espermátides no início da espermiogênese. As setas indicam a presença de corpúsculos heterocromáticos que desaparecem durante a diferenciação celular (r). (s-t) Feixes de espermatozóides desprovidos de heterocromatina. Escala=10 $\mu$ m.





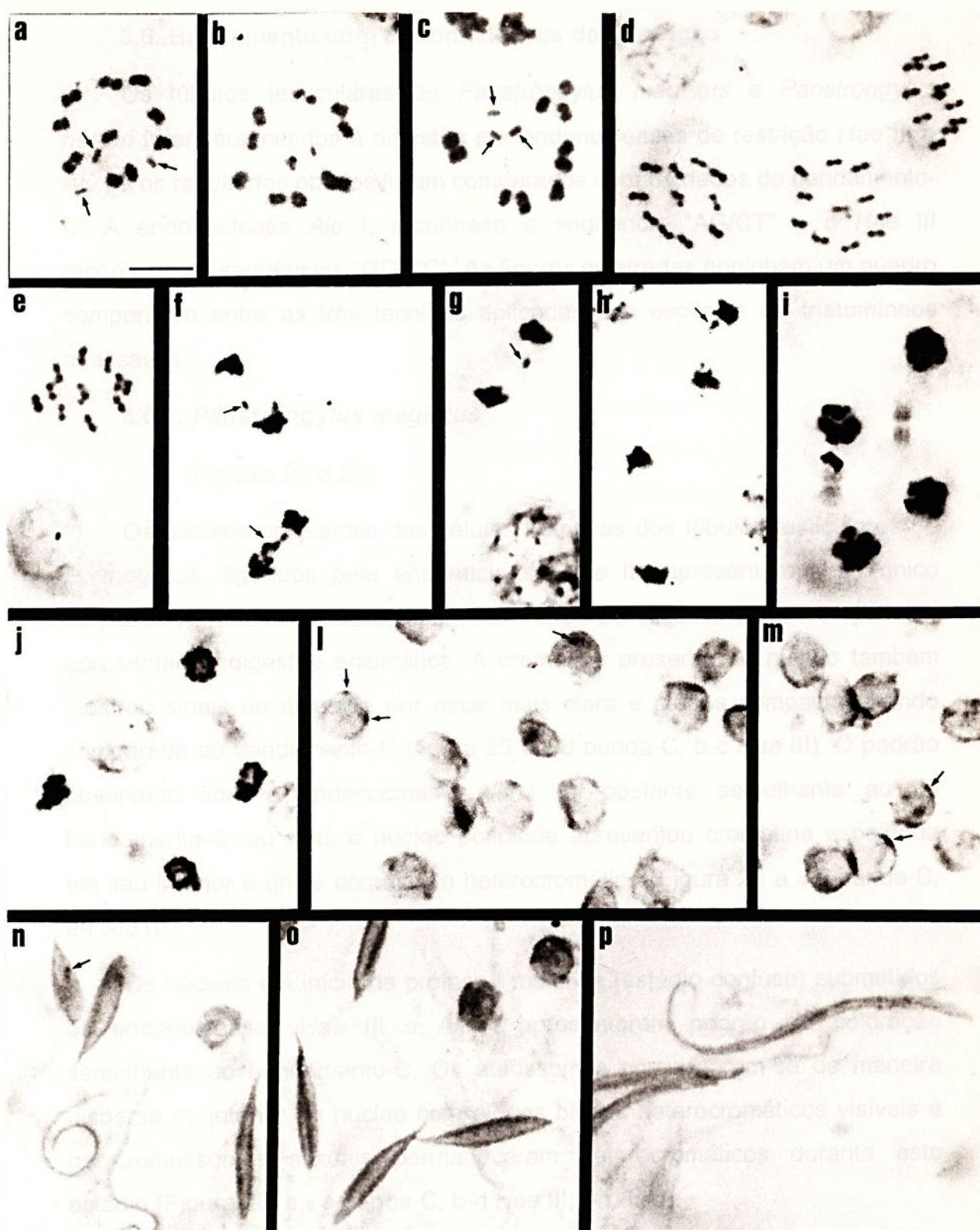
**Fig. 22.** Túbulos testiculares de *P. herreni* submetidos à técnica de bandamento-C. (a-b) Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo com único corpúsculo heterocromático. (c) Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. As setas indicam dois ou três corpúsculos heterocromáticos na periferia do núcleo. (d-e) Núcleos em início de prófase I meiótica com vários pontos heterocromáticos. As setas indicam os corpos heterocromáticos formados pelos cromossomos sexuais. (f-i) Estádio mais adiantado da prófase (estádio confuso) com marcações heterocromáticas geralmente nas regiões teloméricas. As setas indicam o bloco heterocromático formados pelos cromossomos sexuais. Escala=10µm.





**Fig. 23.** Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos à técnica de bandamento-C. (a-h) Núcleos em estágio confuso da prófase I meiótica com corpúsculos heterocromáticos nas regiões cromossômicas centrais (setas maiores) e terminais (setas menores). Notar o bloco heterocromático formado pelos cromossomos sexuais. (i-r) Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno-diachinese). As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. Escala = 10  $\mu$ m.





**Fig. 24.** Túbulos testiculares de *P. herrerii* submetidos à técnica de bandamento-C. (a-c) Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e três cromossomos sexuais indicados pelas setas. (d-e) Metáfases da segunda divisão meiótica com 10 autossomos e três cromossomos sexuais heterocromáticos dispostos no centro do anel dos autossomos. Observar que os cromossomos sexuais apresentam-se unidos por pontes eucromáticas. (f-h) Anáfases meióticas, as setas indicam cromossomo com migração tardia. (i-j) Telófases meióticas com citocinese. (l-m) Espermatídes no início da espermiogênese. As setas indicam a presença de corpúsculos heterocromáticos que desaparecem no decorrer da diferenciação celular. (n-o) Espermatídes em um estágio mais adiantado da espermiogênese. A seta indica pequeno corpúsculo heterocromático. (p) Feixes de espermatozoides. Escala= 10 $\mu$ m.



### 3.6. Bandamento com Endonucleases de Restrição

Os túbulos testiculares de *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri* foram submetidos à digestão por endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I e os resultados obtidos foram comparados com os dados do bandamento-C. A endonuclease *Alu* I, reconhece a seqüência "AG/CT" e a *Hae* III reconhece as seqüências "GG/CC". As figuras mostradas englobam um quadro comparativo entre as três técnicas aplicadas nas espécies de triatomíneos analisadas.

#### 3.6.1. *Panstrongylus megistus*

(Figuras 25 a 27)

Os núcleos poliplóides das células nutritivas dos túbulos testiculares de *P. megistus* digeridos pela endonuclease *Hae* III, apresentaram um único corpúsculo heterocromático, com o halo ao redor deste corpúsculo apresentando digestão enzimática. A cromatina presente no núcleo também mostrou sinais de digestão por estar mais clara e menos compacta quando comparada ao bandamento-C (figura 25 a e d banda-C, b-c *Hae* III). O padrão observado com a endonuclease *Alu* I foi bastante semelhante ao do bandamento-C, ou seja, o núcleo poliplóide apresentou cromatina espalhada em seu interior e único corpúsculo heterocromático (Figura 25 a e d banda-C, e-f *Alu* I).

Os núcleos em início de prófase I meiótica (estádio confuso) submetidos as endonucleases *Hae* III e *Alu* I apresentaram padrão de coloração semelhante ao bandamento-C. Os autossomos comportaram-se de maneira dispersa no interior do núcleo com alguns blocos heterocromáticos visíveis e os cromossomos sexuais permaneceram heterocromáticos durante este estágio (Figura 26, a e e banda-C, b-d *Hae* III, f-h *Alu* I).

Em um estágio mais adiantado da prófase I meiótica, no paquíteno, alguns autossomos submetidos a endonuclease *Hae* III apresentaram padrão de digestão enzimática que alternava entre bandas claras e escuras; os heterocromossomos permaneceram unidos e heterocromáticos (Figura 26 i e n banda-C, j-m *Hae* III). Com a endonuclease *Alu* I o padrão dos autossomos e cromossomos sexuais foi semelhante ao bandamento-C com a exceção de alguns autossomos que apresentaram heterocromatina nas porções cromossômicas terminais. No bandamento-C a heterocromatina apresentou-se espalhada ao longo dos autossomos e os cromossomos sexuais mostraram-se



heterocromáticos, como é típico neste estágio (Figura 26 i e n banda-C, o-q *Alu* I).

No diplóteno o bandamento pela endonuclease de restrição *Hae* III apresentou cromossomos sexuais totalmente resistentes a ação enzimática, indicando que a heterocromatina presente nestes heterocromossomos é de certa forma diferente daquela detectada no bandamento-C, pois na banda-C os cromossomos sexuais, provavelmente os Xs, apresentaram-se ora eucromático, ora heterocromático (Figura 27 a e e banda-C, b-d *Hae* III). O padrão de coloração apresentado pela endonuclease *Alu* I foi similar ao encontrado pela *Hae* III, ou seja, os heterocromossomos também mostraram-se resistentes à ação enzimática (Figura 27 a e e banda-C, f-h *Alu* I).

Nas metáfases meióticas os cromossomos apresentaram-se bastante condensados e o padrão de bandamento-C e das endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I foi semelhante, com todos os cromossomos exibindo um alto grau de condensação e desta maneira dificultando a observação de quaisquer bandas (Figura 27 i e o banda-C, j-n *Hae* III, p-s *Alu* I).

### 3.6.2. *Panstrongylus herreri*

(Figuras 28-31)

Os núcleos poliplóides das células nutritivas dos túbulos testiculares tratados pelas endonucleases *Hae* III e *Alu* I exibiram o mesmo padrão do bandamento-C, isto é, os núcleos poliplóides apresentaram cromatina dispersa em seu interior e único corpúsculo heterocromático (Figura 28 a e d banda-C, b-c *Hae* III, e-f *Alu* I).

No início da prófase I (estádio confuso) o padrão observado com endonuclease *Hae* III é distinto do encontrado no bandamento-C. Na banda-C é possível observar pontos heterocromáticos nas porções terminais dos autossomos, no entanto, com *Hae* III a heterocromatina comporta-se de maneira dispersa não sendo evidenciada nas extremidades cromossômicas. Os cromossomos sexuais mostraram-se heterocromáticos exibindo um padrão semelhante ao do bandamento-C (Figura 29 a e e banda-C; b-d *Hae* III). Analisando o padrão da endonuclease *Alu* I verifica-se coincidência com as regiões banda-C positivas nas porções terminais dos autossomos e os cromossomos sexuais mostraram-se heterocromáticos, desta forma as observações realizadas com a endonuclease *Alu* I indicam significativa semelhança com a heterocromatina-C+ (Figura 29 a e e banda-C, f-h *Alu* I).



Em um estágio mais adiantado da prófase I meiótica pode-se verificar que os cromossomos sexuais, provavelmente os Xs, tratados com a endonuclease *Hae* III apresentam-se digeridos, exibindo um padrão diferente do observado no bandamento-C, em que os cromossomos sexuais comportaram-se de forma heterocromática (Figura 29 i e n banda-C, j-m *Hae* III). Este fato indica que a heterocromatina presente nos cromossomos Xs é distinta daquela observada na banda-C. Com relação a endonuclease *Alu* I os heterocromossomos apresentaram-se totalmente heterocromáticos exibindo um padrão idêntico ao do bandamento-C (Figura 29 i e n banda-C, o-q *Alu* I).

No paquíteno, com a endonuclease *Hae* III, é possível observar uma alternância de bandas escuras e claras ao longo de alguns autossomos, indicando regiões que apresentaram certo padrão de digestão enzimática. É interessante ressaltar que o tratamento pelo bandamento-C extraiu bem mais a cromatina da região intermediária dos autossomos se comparado com a ação da endonuclease de restrição *Hae* III (Figura 30 a e e banda-C; b-d *Hae* III). A endonuclease *Alu* I apresentou regiões heterocromáticas nas porções terminais dos cromossomos coincidindo assim com o padrão apresentado pelo bandamento-C (Figura 30 a e e banda-C, f-h *Alu* I).

No diplóteno, no padrão apresentado pela enzima *Hae* III, é possível novamente observar a digestão na região dos cromossomos sexuais (Figura 30 i e n banda-C; j-m *Hae* III, Figura 31 a e f banda-C, b-e *Hae* III). A endonuclease *Alu* I exibe um comportamento semelhante ao do bandamento-C com cromossomos sexuais heterocromáticos (Figura 30 i e n banda-C, o-q *Alu* I, Figura 31 a e f banda-C, g-i *Alu* I).

Na metáfase I pode-se observar digestão nos cromossomos sexuais no padrão apresentado pela endonuclease *Hae* III (Figura 31 j e o banda-C; l-n *Hae* III). A endonuclease *Alu* I apresenta as mesmas características observadas no bandamento-C em que cromossomos sexuais mostraram-se heterocromáticos nas metáfases I e II (Figura 31 j e o banda-C, p-r *Alu* I).

Os dados comparativos dos principais resultados das duas espécies de *Panstrongylus* analisadas através das endonucleases *Hae* III e *Alu* I e bandamento-C encontram-se nas tabelas 4 e 5.



TABELA 4

Comparação dos principais resultados obtidos através das técnicas de endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I e bandamento-C, em testículos de machos adultos jovens da espécie *Panstrongylus megistus*:

| ESTRUTURAS<br>CELULARES DO TÚBULO<br>TESTICULAR       | <i>P. megistus Hae</i> III                                                                                                                                                                                              | <i>P. megistus Alu</i> I                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Núcleos poliplóides da parede do túbulo testicular | ↳ Único corpúsculo heterocromático com halo ao redor deste apresentando sinais de digestão.<br>↳ Cromatina presente no núcleo com sinais de digestão apresentando-se mais clara e menos compacta que a do bandamento-C. | ↳ Padrão semelhante ao do bandamento-C, apresentando cromatina espalhada no interior do núcleo e único corpúsculo heterocromático.                                                                      |
| 2) Núcleos da prófase I da meiose (estádio confuso)   | ↳ Comportamento semelhante ao da banda-C; autossomos apresentaram-se de forma dispersa no interior do núcleo e os cromossomos sexuais permaneceram heterocromáticos.                                                    | ↳ Comportamento semelhante ao do bandamento-C; autossomos comportaram-se de maneira dispersa no interior nuclear e os cromossomos sexuais permaneceram heterocromáticos.                                |
| 3) Núcleos da prófase I da meiose (paquíteno)         | ↳ Alguns autossomos apresentaram padrão de digestão enzimática com bandas claras e escuras.<br>↳ Os heterocromossomos permaneceram unidos e heterocromáticos.                                                           | ↳ Padrão semelhante ao bandamento-C com heterocromatina espalhada ao longo dos autossomos e cromossomos sexuais heterocromáticos;<br>↳ Alguns autossomos apresentaram heterocromatina nas extremidades. |
| 4) Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno)         | ↳ Cromossomos sexuais totalmente heterocromáticos diferente do bandamento-C em que os cromossomos Xs apresentaram-se ora eucromáticos ora heterocromáticos.                                                             | ↳ Padrão similar ao observado com a endonuclease <i>Hae</i> III com cromossomos sexuais também resistentes à ação enzimática.                                                                           |
| 5) Metáfases da segunda divisão meiótica              | ↳ Padrão semelhante ao bandamento-C com cromossomos bastante condensados, não sendo observadas bandas.                                                                                                                  | ↳ Padrão também semelhante ao da banda-C com cromossomos condensados não sendo possível a detecção de bandas.                                                                                           |

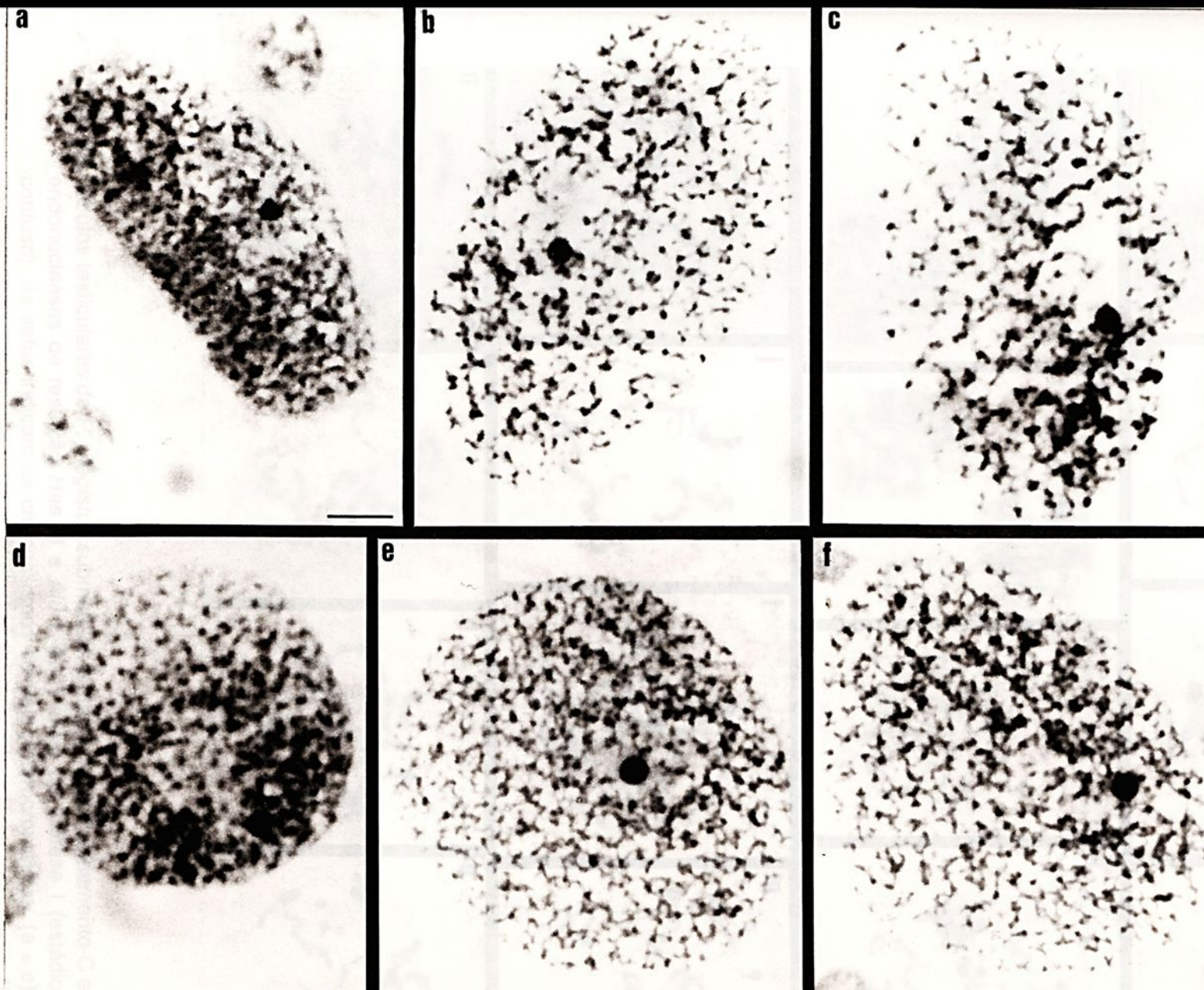


TABELA 5

Comparação dos principais resultados obtidos através das técnicas de endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I e bandamento-C, em testículos de machos adultos jovens da espécie *Panstrongylus herreri*:

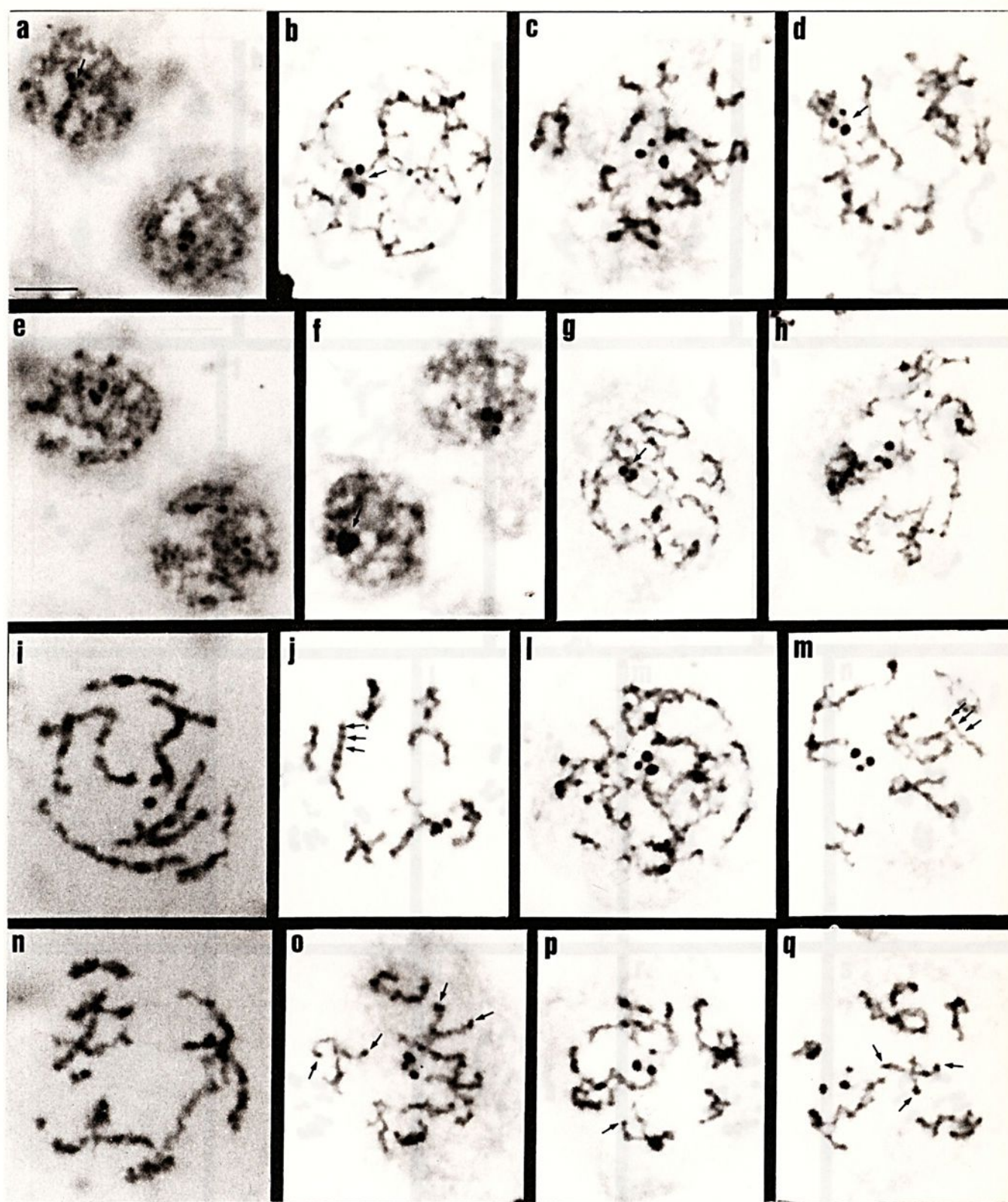
| <u>ESTRUTURAS<br/>CELULARES DO TÚBULO<br/>TESTICULAR</u>   | <i>P. herreri Hae</i> III                                                                                                                                                                                                                                                                 | <i>P. herreri Alu</i> I                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Núcleos poliplóides da parede do túbulo testicular      | ↪ Padrão semelhante ao bandamento-C com cromatina dispersa no interior nuclear e único corpúsculo heterocromático.                                                                                                                                                                        | ↪ Padrão também semelhante ao da banda-C com cromatina dispersa no interior do núcleo e único corpúsculo heterocromático.                                                                                          |
| 2) Núcleos da prófase I da meiose (estádio confuso)        | ↪ Cromossomos sexuais heterocromáticos com padrão semelhante ao do bandamento-C.<br>↪ Autossomos com padrão diferente do bandamento-C, com heterocromatina dispersa ao longo dos autossomos enquanto na banda-C os pontos heterocromáticos encontraram-se nas extremidades cromossômicas. | ↪ Coincidência com as regiões bandas-C+ nas porções terminais dos autossomos e cromossomos sexuais heterocromáticos, indicando semelhança entre os tipos de heterocromatinas detectadas pelas diferentes técnicas. |
| 3) Núcleos da prófase I da meiose (estádio mais adiantado) | ↪ Cromossomos sexuais, provavelmente os Xs, apresentam-se digeridos, exibindo padrão distinto do observado no bandamento-C em que os cromossomos sexuais eram heterocromáticos.                                                                                                           | ↪ Padrão dos heterocromossomos idêntico ao do bandamento-C, isto é, totalmente heterocromáticos.                                                                                                                   |
| 4) Núcleos da prófase I da meiose (paquíteno)              | ↪ Alguns autossomos apresentando alternância de bandas claras e escuras, indicando regiões de digestão enzimática.                                                                                                                                                                        | ↪ Padrão coincidente com bandamento-C, com regiões heterocromáticas predominantemente nas extremidades cromossômicas.                                                                                              |
| 5) Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno)              | ↪ Cromossomos sexuais apresentando digestão.                                                                                                                                                                                                                                              | ↪ Heterocromossomos com padrão semelhante ao do bandamento-C, ou seja, exibindo comportamento heterocromático.                                                                                                     |
| 6) Metáfases meióticas                                     | ↪ Na metáfase I é possível observar digestão dos cromossomos sexuais.                                                                                                                                                                                                                     | ↪ Características semelhantes as do bandamento-C com cromossomos sexuais heterocromáticos nas metáfases I e II.                                                                                                    |





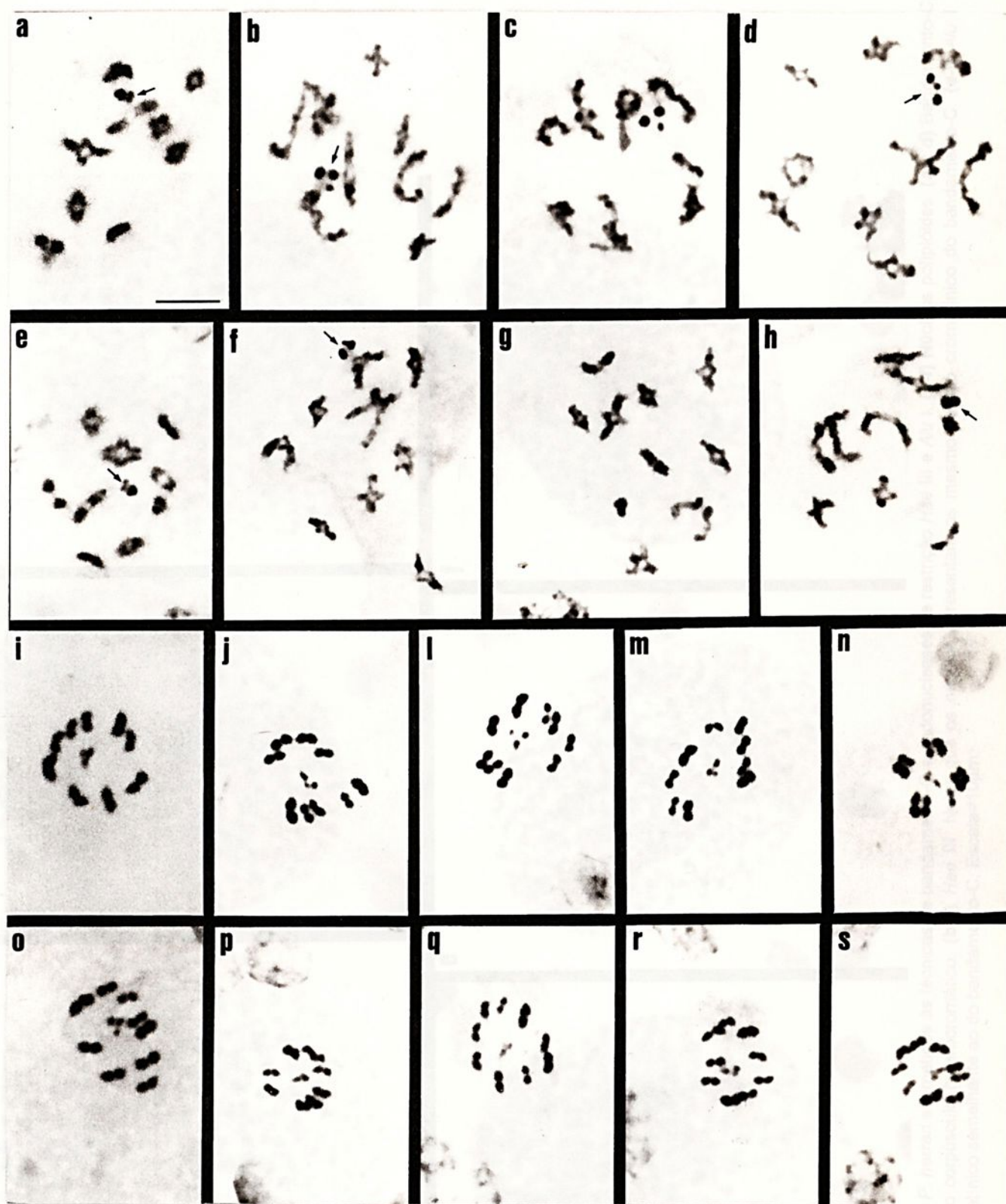
**Fig. 25.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. (a-f) Núcleos poliplóides. (a e d) Bandamento-C, com único corpúsculo heterocromático. (b-c) *Hae* III. Notar que o halo ao redor do corpúsculo está digerido pela endonuclease e que a cromatina nuclear também apresenta evidências de digestão. (e-f) *Alu* I. Notar que a cromatina nuclear e halo ao redor do corpúsculo heterocromático não foram digeridos. Escala=10µm.





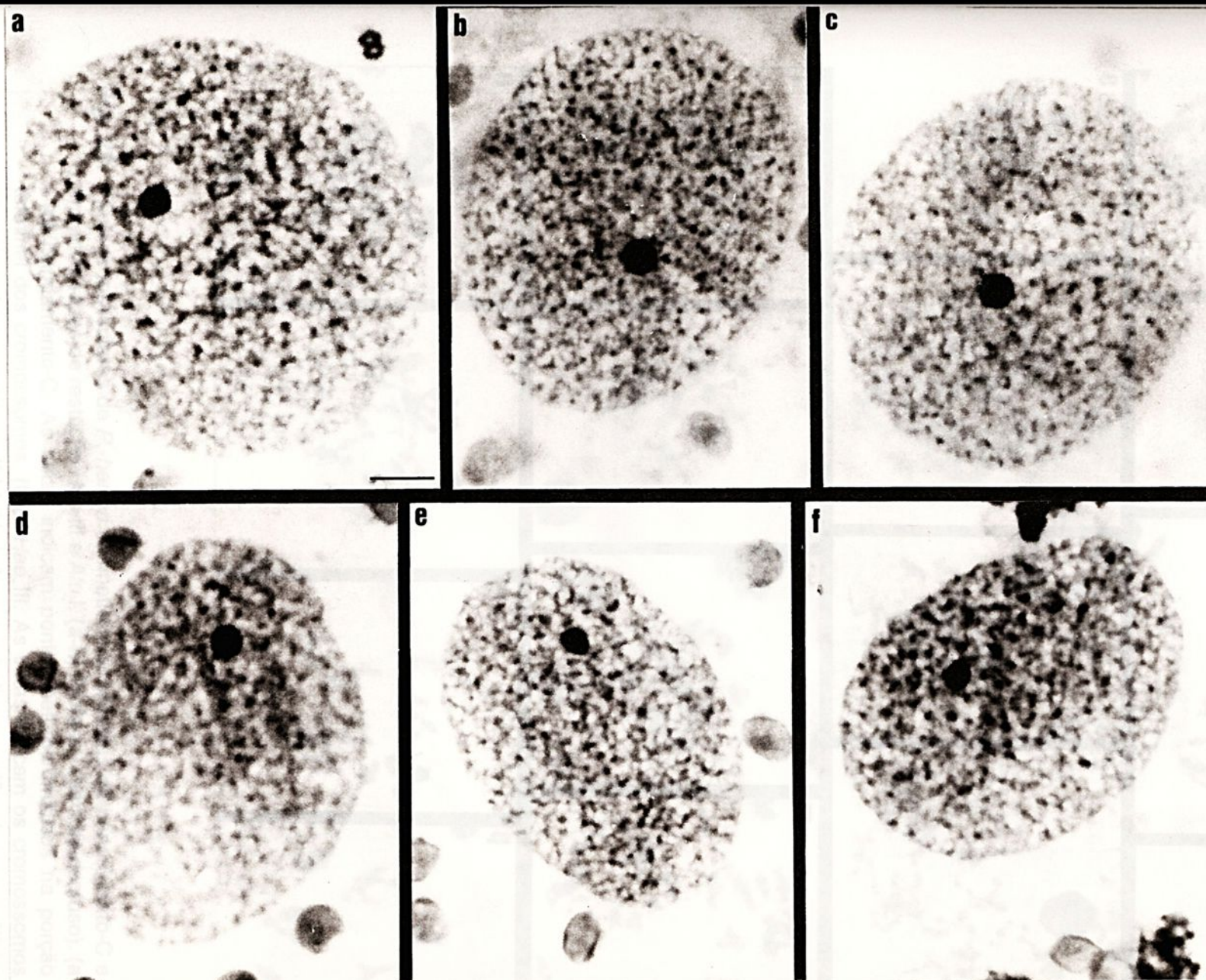
**Fig. 26.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. (a-h) Início de prófase I (estádio confuso). As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. (a e e) Bandamento-C. (b-d) *Hae* III. (f-h) *Alu* I. (i-q) Prófase I da meiose, paquíteno. (i e n) Bandamento-C. Notar a heterocromatina espalhada ao longo dos cromossomos. (j-m) *Hae* III. As setas indicam autossomos apresentando um padrão de digestão enzimática que alterna bandas claras e escuras. (o-q) *Alu* I. As setas indicam a presença de heterocromatina nas regiões terminais dos cromossomos. Escala=10µm.





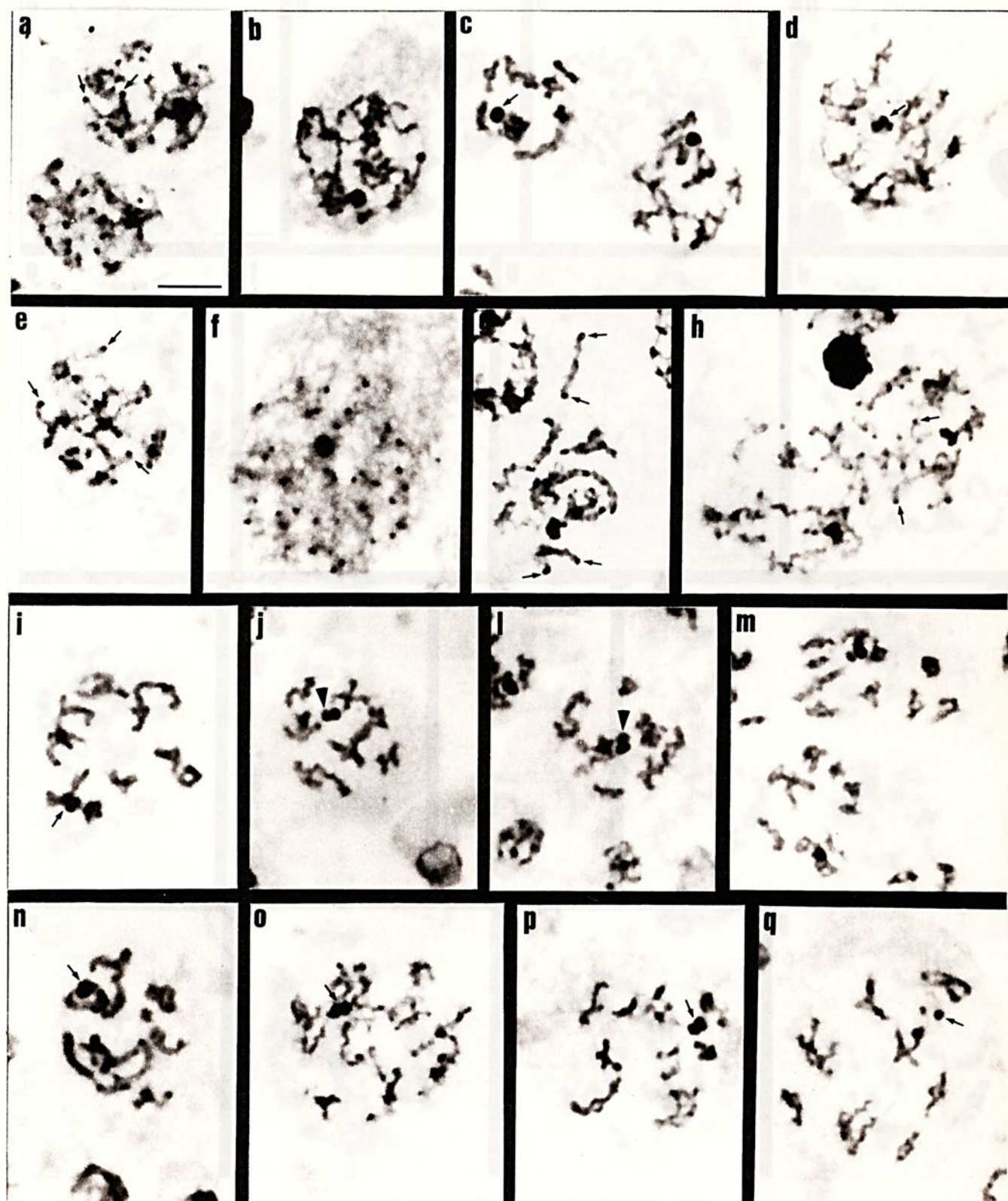
**Fig. 27.** Túbulos testiculares de *P. megistus* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. (a-h) diplóteno. (a e e) Bandamento-C. As setas indicam os cromossomos X em estados hetero e eucromático. (b-d) *Hae* III. Notar os cromossomos sexuais resistentes a ação enzimática (setas). (f-h) *Alu* I. Observar os cromossomos sexuais, também resistentes a ação enzimática (setas). (i-s) Metáfases da segunda divisão meiótica. (i e o) Bandamento-C. (j-n) *Hae* III. (p-s) *Alu* I. Escala=10 $\mu$ m.





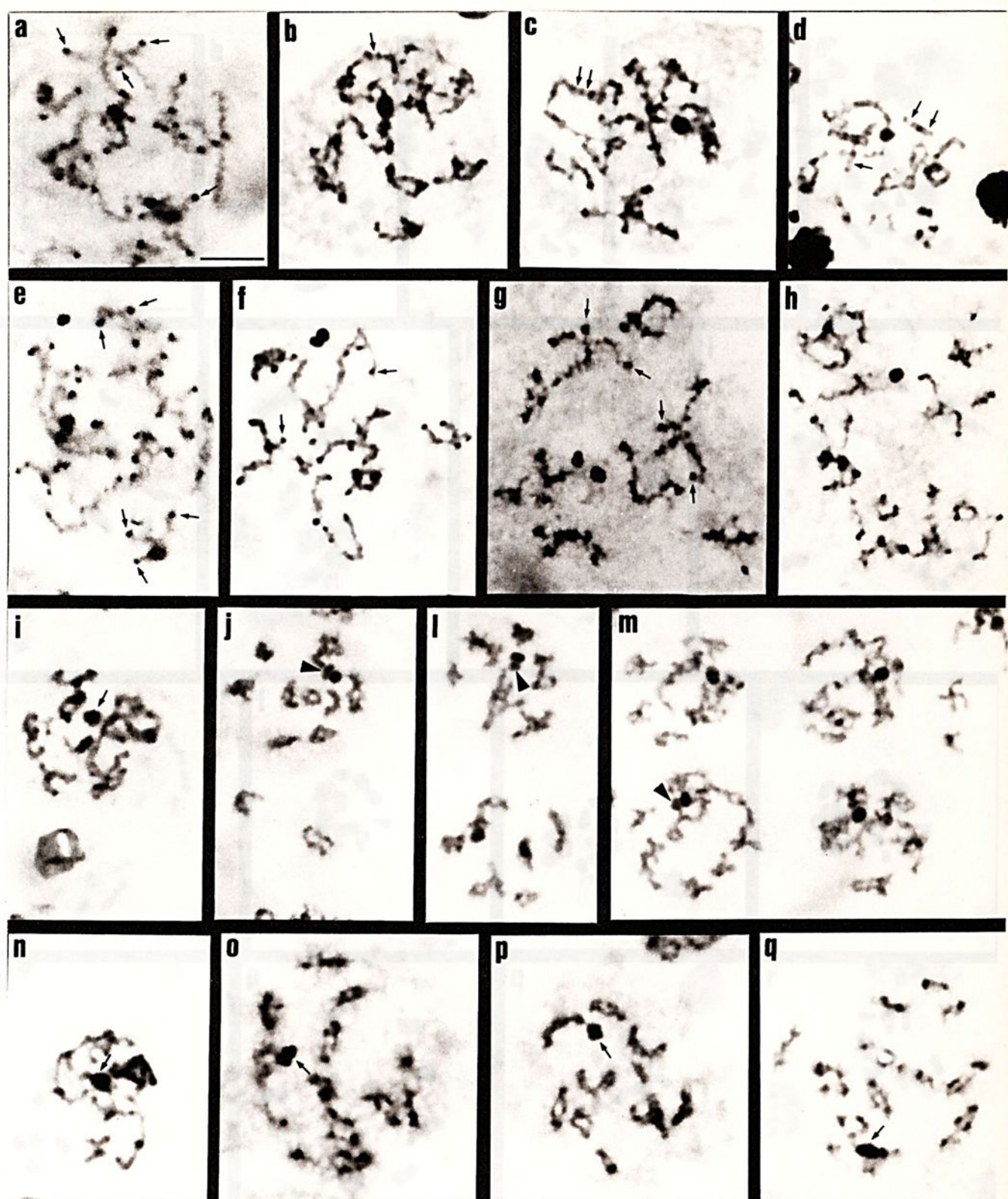
**Fig. 28.** Túbulos testiculares de *P. herreri* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. (a-f) Núcleos poliplóides. (a e d) Bandamento-C, com presença de único corpúsculo heterocromático. (b-c) *Hae* III. Notar que os núcleos apresentam o mesmo padrão cromatínico do bandamento-C. (e-f) *Alu* I. Observar padrão cromatínico semelhante ao do bandamento-C. Escala=10µm.





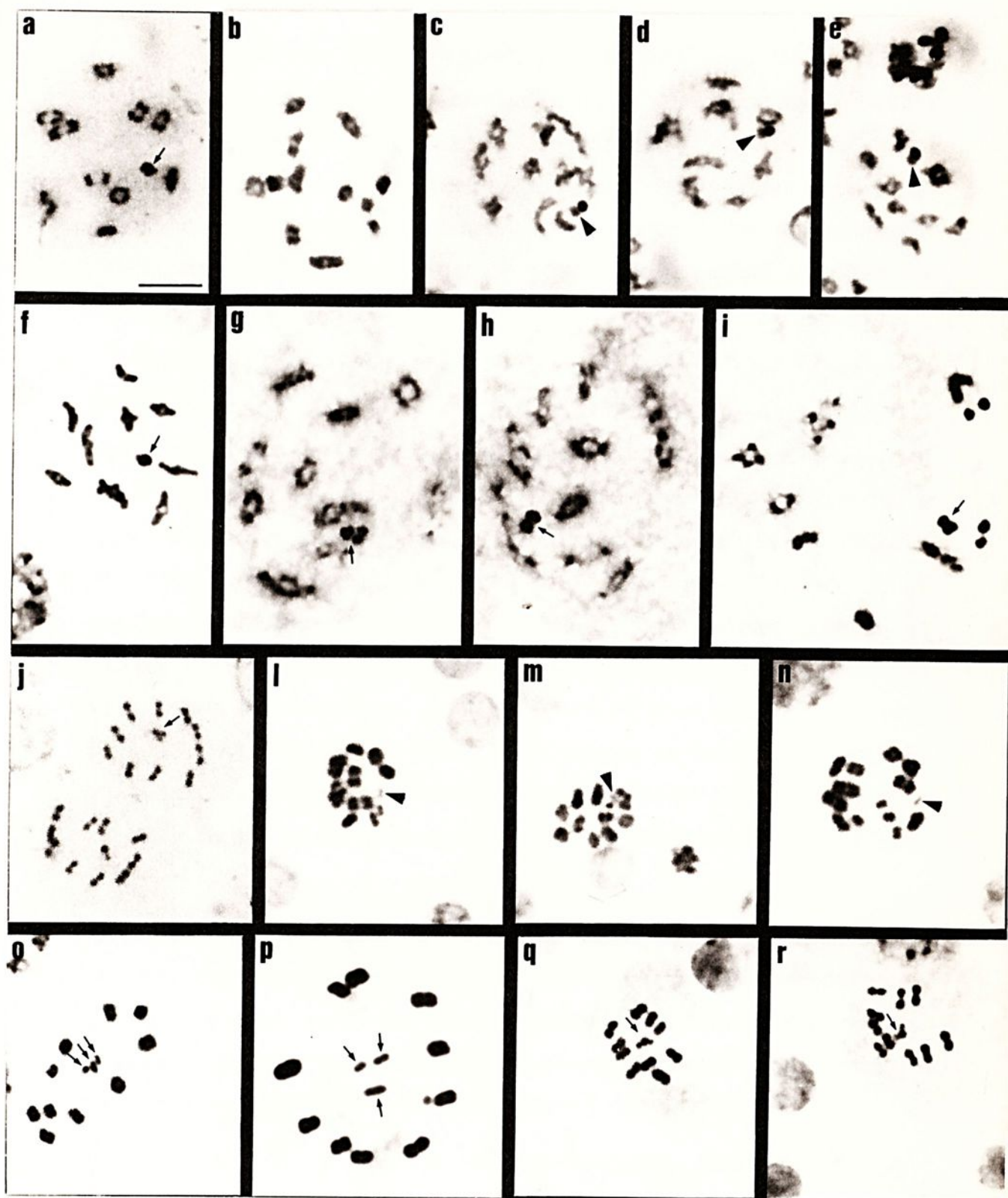
**Fig. 29.** Túbulos testiculares de *P. herreni* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. (a-h) Prófase I (estádio confuso). (a e e) Bandamento-C. As setas indicam pontos heterocromáticos na porção terminal dos cromossomos. (b-d) *Hae* III. As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. (f-h) *Alu* I. As setas indicam regiões herocromáticas coincidentes com as da banda C. (i-q) Prófase I da meiose em estágio mais adiantado. (i e n) Bandamento-C. As setas indicam os cromossomos sexuais. (j-m) *Hae* III. Notar que os cromossomos X estão digeridos (pontas de seta). (o-q) *Alu* I. As setas indicam os cromossomos sexuais totalmente heterocromáticos. Escala=10 $\mu$ m.





**Fig. 30.** Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. (a-h) Prófase I (paquíteno). (a e e) Bandamento-C. As setas indicam regiões heterocromáticas terminais. (b-d) *Hae* III. As setas indicam regiões dos autossomos digeridas pela endonuclease. (f-h) *Alu* I. Notar que as regiões heterocromáticas do bandamento-C e de digestão enzimática coincidem, indicando serem do mesmo tipo de heterocromatina (setas). (i-q) Início de diplóteno (prófase I, estágio confuso). (i e n) Bandamento-C. As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. (j-m) *Hae* III. Notar que os cromossomos X apresentam-se digeridos pela endonuclease de restrição (pontas de seta). (o-q) *Alu* I. As setas assinalam os cromossomos sexuais não digeridos pela ação enzimática. Escala=10µm.





**Fig. 31.** Túbulos testiculares de *P. herrei* submetidos às técnicas de bandamento-C e endonucleases de restrição *Hae* III e *Alu* I. (a-i) Prófase I da meiose (diplóteno). (a e f) Bandamento C. As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. (b-e) *Hae* III. As pontas de seta indicam uma tênue digestão nos cromossomos X. (g-i) *Alu* I. As setas indicam os cromossomos sexuais heterocromáticos. (j-r) Metáfases da primeira e segunda divisão meiótica. (j e o) Bandamento-C. As setas indicam os cromossomos sexuais. (l-n) *Hae* III. As pontas de seta indicam um dos cromossomos sexuais, provavelmente o X, digerido. (p-r) *Alu* I. Notar que os cromossomos sexuais apresentam-se totalmente heterocromáticos (setas). Escala=10µm.







#### 4.1. ORCEÍNA LACTO-ACÉTICA

O estudo da espermatogênese dos triatomíneos *P. megistus* e *P. herreri* com a coloração com orceína lacto-acética aliado aos dados disponíveis na literatura permitiu uma análise do comportamento meiótico na ordem Heteroptera quanto ao tipo de organização cinetocórica do grupo, presença de meiose cóstica e poliploidia, comportamento picnótico dos autossomos e heterocromossomos, tipos de meiose pós e pré-reducional e origem da derivação cromossômica em Heteroptera.

A constituição centromérica dos cromossomos de heterópteros permanece um problema enigmático (Manna, 1995). Ainda que os cromossomos com um único centrômero sejam de ocorrência quase universal acredita-se que em vegetais como *Luzula*, em insetos homópteros e heterópteros os cromossomos sejam holocêntricos (Manna, 1995; Panzera et al., 1996a). Os cromossomos holocêntricos são interpretados como tendo atividade cinetocórica difusa ou com inúmeros, mas discretos centrômeros (Manna, 1995). Ao microscópio eletrônico, tem sido demonstrada a existência de várias placas cinetocóricas, ou de uma única placa ao longo de quase toda a cromátide. Ao microscópio óptico as cromátides se caracterizam por não apresentar constrições primárias e os cromossomos anafásicos migram paralelos uns aos outros, e não em forma de V, como fazem os monocêntricos (Guerra, 1988).

A natureza holocinética dos cromossomos em homóptera e heteróptera foi baseada principalmente em seu comportamento morfológico e verificação experimental após quebra por radiação ionizante. Em cocídeos e afídeos, fragmentos cromossômicos induzidos experimentalmente por raio-X continuam a funcionar mitoticamente (Hughes-Schrader & Schrader, 1961).

Schrader (1933 apud Manna, 1995) observou que o Heteroptera *Protenor belfragei*, possui um grande cromossomo X que é orientado paralelamente ao equador da célula e que as fibras cromossomais são organizadas ao longo de seu comprimento inteiro. O conceito de tais cromossomos com atividade centromérica difusa recebeu suporte de muitos citologistas que trabalham com heterópteros (Manna, 1995). Em Reduviidae, como *Rhodnius prolixus*, encontrou-se a presença de placa cinetocórica em cromossomos mitóticos e sua ausência nos cromossomos meióticos. Estudos sobre determinação de composição de bases, densidade de flotação, cinética de reassociação e



renaturação do DNA em cromossomos de *Oncopeltus fasciatus* (um inseto heteróptero com cinetócoro difuso) revelaram que as seqüências repetidas eram primariamente curtas e espalhadas através do genoma em contraste com as repetições em tandem encontradas no DNA de organismos com centrômero localizados (Manna, 1995).

Outros estudos no Heteroptera *Oncopeltus fasciatus* revelaram que o cinetócoro abrange 75% da extensão cromossômica durante a mitose. Durante a meiose, os microtúbulos eram observados ao longo de praticamente todo o cromossomo e a placa cinetocórica era completamente perdida. Isto sugere que em organismos com cromossomos holocêntricos a formação do aparato cinetocórico meiótico deve ser suprimida para permitir a terminalização do quiasma. Estes dados estão de acordo com o fato de que muitos organismos com centrômero difuso apresentam meiose invertida com divisão equacional ocorrendo na meiose I (MI) e a divisão reducional ocorrendo na meiose II (MII), sendo que o desenvolvimento da placa cinetocórica deve ser suprimida para permitir a auto-orientação do cromossomo na MI (Comings & Okada, 1972).

A microscopia eletrônica, demonstra que nos cromossomos meióticos a placa cinetocórica é completamente perdida e o movimento cromossômico parece ser mediado por microtúbulos inseridos em todas as porções dos cromossomos (Comings & Okada, 1972).

Hughes-Schrader & Schrader (1961), aplicando raios X em machos de heterópteros *Euchistus servus*, *E. tristigmus* e *Solubea pygnax*, observaram uma alta freqüência de translocações e deleções nos fragmentos livres e na anáfase, cromossomos retardatários e pontes cromossômicas. Por ocorrer movimento livre e perpetuação dos fragmentos, os autores concluíram que os cromossomos eram holocêntricos. LaChance et al. (1969, 1970, 1973 apud Manna, 1995) observaram a perpetuação dos fragmentos e translocações em gerações F1, F2, F3 de machos de *Oncopeltus fasciatus* para suportar a natureza holocinética dos cromossomos. Entretanto, outros autores não compartilham esta visão da estrutura cromossômica holocêntrica. Do comportamento morfológico, Mendes (1949 apud Manna, 1995) no inseto *Dysdercus*, Rao (1958 apud Manna, 1995) em *Oncopeltus* e Parshad (1957, 1958 apud Manna, 1995) em insetos coreideos opinaram que os cromossomos de Heteroptera eram monocêntricos. Parshad (1958 apud Manna, 1995) nas espécies *Cletus punctiger* e *Lanchnophorus singalensis*, concluiu que os



cromossomos de Heteroptera, diferentemente daqueles de homópteros com atividade difusa, possuíam atividade cinética localizada.

Desai (1969 apud Manna, 1995) irradiando cromossomos de *Ranatra* com altas doses de raios X, generalizou que cromossomos de heterópteros eram monocêntricos. Ruthmann & Permantier (1973 apud Manna, 1995) em *Dosciostaurus intermediatus* encontrou o fuso dos microtúbulos cromossomais inseridos em discretos cinetócoros nos cromossomos espermatogoniais. Eles afirmaram que o comportamento holocinético durante o movimento de anáfase meiótico é devido a interconecções cromossomais que se desenvolveram durante a prometáfase e eram ausentes nos primeiros estádios meióticos (Manna, 1995).

No entanto, Hughes-Schrader & Schrader (1961) inferiram que nos heterópteros o centrômero ocorre ao longo do comprimento dos cromossomos. Suportes a esta hipótese têm sido propostos por algumas características que diferenciam estes cromossomos do sistema monocêntrico, pois os autores detectaram que fragmentos cromossômicos livres induzidos por radiação comportam-se normalmente e persistem ao longo da divisão. Nos cromossomos monocêntricos, fragmentos acêntricos geralmente falham em orientar-se na placa metafásica. Mesmo nos cromossomos holocêntricos, alguns fragmentos, particularmente os menores, podem ser eliminados na separação anafásica. Isto têm sido demonstrado no heteroptero *Oncopeltus fasciatus*, em coccídeos como *Planococcus ditri* e outros organismos (Ueshima, 1979).

Outra característica também observada na meiose dos Heteroptera é a restrição da atividade cinetocórica à região terminal dos cromossomos. Evidências indicam que a restrição meiótica da atividade cinetocórica, na realidade, é uma inibição temporária (Hughes-Schrader & Schrader, 1961). Esta restrição da atividade holocinética tem sido registrada na maior parte dos organismos com cinetócoro difuso, como por exemplo, em coccídeos, no afídeo *Tamalia* bem como em *Luzula* e *Tityus* (Hughes-Schrader & Schrader, 1961).

A atividade cinética restrita às regiões cromossômicas terminais e ausência de estruturas cinetocóricas nestas regiões são consideradas características gerais da meiose em cromossomos holocinéticos. Um comportamento interessante dos cromossomos meióticos de Heteroptera é que





ambas as extremidades dos cromossomos são capazes de mostrar atividade cinética (González-García et al., 1996) e é postulado que aquelas regiões terminais cromossômicas cineticamente ativas durante a primeira divisão meiótica são inativas na segunda divisão (González-García et al., 1996; Pérez et al., 1997). Tem sido sugerido que estas características podem facilitar processos meióticos, tais como, *crossing over*, terminalização de quiasma e orientação de bivalentes na placa metafásica (Comings & Okada, 1972; González-García et al., 1996).

No Heteroptera *Euryophthalmus rufipennis*, na anáfase, assim que se inicia a separação cromossômica, ainda na zona equatorial, os cromossomos já se apresentam fortemente recurvados para os pólos, aos quais se prendem pelas extremidades. Desta forma a influência polar se faz sentir mais intensamente nas extremidades cromossômicas (Piza, 1946). Piza (1952) estudando a meiose dos heterópteros *Lybindus dichrous* (Coreidae) e *Euryophthalmus humilis* (Pyrrhocoridae) também encontrou provas a favor da existência de um centrômero em cada extremidade dos cromossomo desta ordem.

Manna et al. (1995) obtiveram várias aberrações com raios-X em cromossomos de testículos de *Physopelta schlanbuschi* e *Lygaeus hospes*. As ninfas *Physopelta* apresentaram fragmentos livres induzidos por raios-X que não sobreviviam por muito tempo. Os dados sobre fragmentos livres induzidos por raio-X em *Physopelta* e *Lygaeus* indicam que os fragmentos não sobrevivem o tempo suficiente para a célula sofrer outro ciclo de divisão. Portanto, seus dados não suportam a estrutura holocêntrica dos cromossomos nestas duas espécies de Heteroptera.

As diferenças morfológicas e estudos experimentais nos cromossomos de Heteroptera desafiam as teorias para a organização holocêntrica dos cromossomos neste grupo. A substituição da atividade cinetocórica de uma natureza holocêntrica para uma telocêntrica, aberrações cromossômicas e fragmentos livres induzidos por raios-X em algumas espécies de Heteroptera requerem uma reconsideração da organização cinetocórica dos cromossomos neste grupo. Segundo Manna, a organização cromossômica em Heteroptera, ainda que basicamente monocêntrica, exibe um comportamento incomum. Deve ser considerada a diversificação evolucionária dos elementos do fuso e o seu processo de espiralização em vez de considerar somente a estrutura centromérica por si. O termo holocêntrico deveria, portanto, ter um restrito



significado no qual o cromossomo monocêntrico apresenta-se com comportamento modificado diferente do tipo clássico (Manna, 1995).

Apesar das várias hipóteses sobre a atividade do cinetócoro em Heteroptera há uma série de estudos ultra-estruturais que provam a holocêntridade dos cromossomos deste grupo.

A microscopia eletrônica de transmissão revelou pequenos cinetócoros em espécies de heterópteros. Em *Dysdercus intermedius* os cromossomos das metáfases espermatogoniais mediram de 1.2-1.5 $\mu$ m e a placa cinetocórica apresentou um diâmetro máximo de 0,35 $\mu$ m (23-27% do comprimento cromossomal). Em outra espécie, *Oncopeltus fasciatus*, o cromossomo mediu 3-7 $\mu$ m e o cinetócoro ocupou 74% do cromossomo (Wolf, 1995).

Durante a mitose, cinetócoros difusos são caracterizados pelas seguintes qualidades: 1) ausência de constrição primária; 2) migração uniforme do comprimento inteiro do cromossomo em direção aos pólos; 3) as fibras do fuso parecem ser inseridas ao longo da maior parte do comprimento da cromátide e 4) após irradiação dos cromossomos por raio-X alguns fragmentos participam dos movimentos cromossômicos e não são perdidos. Estas observações sugerem que a maior parte ou toda a extensão do cromossomo participa no arranjo das fibras do fuso e movimentos cromossômicos (Comings & Okada, 1972). A partir das características dos cromossomos holocêntricos pode-se perceber que a ordem Heteroptera enquadra-se em praticamente todos os requisitos pertinentes aos organismos com atividade cinetocórica holocinética.

Outra característica interessante presente na ordem Heteroptera é a formação de cistos no decorrer da meiose. Com relação à espermatogênese dos reduvídeos, *P. megistus* e *P. herreri*, analisados no presente trabalho foram observadas formações císticas com mais ou menos oito células cada cisto.

Quanto ao desenvolvimento dos cistos meióticos dos triatomíneos pode-se constatar que os núcleos do conjunto apical do túbulo testicular representam as células germinativas não diferenciadas, das quais apenas certo grupo transforma-se em espermátócitos verdadeiros, estes se multiplicam por meio de 8 divisões equacionais formando, cada um, precisamente 256 espermátócitos que, depois da fase de crescimento, sofrem duas divisões de maturação, formando, assim, 1026 espermátides em cada cisto. Durante estas multiplicações, os espermátócitos têm seu volume reduzido à metade. Porém,





pela nutrição, concomitantemente fornecida pelas células das paredes dos cistos, o volume depois de cada divisão refaz-se até certo ponto (Barth, 1955). Estas células nutritivas são originárias da parte restante dos núcleos do conjunto apical, que se transformam nas células da parede dos cistos translocando-se do sincício do protoplasma apical e colocando-se entre as espermatogônias. Estes núcleos transformam-se, durante as divisões das fases da multiplicação e do crescimento dos espermatócitos, em núcleos ativos cuja função deve ser apenas nutritiva e sofrem rápida degeneração durante a espermiogênese subsequente, na qual as espermátides transformam-se em espermatozóides, fenômeno que se passa sem consumo de matéria nutritiva (Barth, 1955).

As células germinativas sofrem sua transformação, até chegar a espermatozóide maduro, no interior dos cistos e, pela formação continuada de novas células (rosetas) dentro do germário, vão sendo empurradas, passivamente para a extremidade basal do folículo. Neste ponto do tubo, os cistos desprendem-se e passam a flutuar livremente na testicolínfa. Na zona transitória, entre folículo e vaso eferente, tem lugar uma transformação abrupta das paredes dos cistos: os cistos acumulam-se, ajustam-se uns aos outros e suas paredes sofrem degeneração progressiva, assim os feixes de espermatozóides são libertados e entram no vaso eferente (Barth, 1955).

O Insecta Phthiraptera *Menacantus stramineus* possui cromossomo holocêntrico e sua espermatogênese segue um padrão peculiar pois cada célula que entra em meiose divide-se mitoticamente originando um cisto com espermatozóides ativos. Outra interessante característica da gametogênese do macho são os bivalentes aquiasmáticos e o fato dos cromossomos sexuais serem aparentemente perdidos (Tombesi & Papeschi 1993).

No presente trabalho as duas espécies de triatomíneos analisadas apresentaram núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares com somente um corpúsculo heteropicnótico geralmente central, como o próprio nome diz, estes núcleos possuem função nutritiva e atuam auxiliando os espermatócitos a manterem seu volume após as multiplicações celulares necessárias a formação do cisto meiótico.

Tavares (1996) estudando cinco espécies de triatomíneos observou que quatro delas (*Triatoma brasiliensis*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*) apresentavam núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos



testiculares com regiões heteropicnóticas sob forma de um corpúsculo predominantemente único. A outra espécie estudada *T. delponte*, apresentou vários corpúsculos heterocromáticos, aos quais o autor atribuiu a diferenças nos padrões de heteropicnose dos núcleos poliplóides em *Triatoma*.

A poliploidia somática pode ser funcionalmente comparada a cromossomos plumosos e politênicos. Poliploidia em células de alta atividade pode refletir, como em outros casos, a grande demanda de produção de RNA. É um processo adaptativo para as células economizarem o tempo fisiológico e a síntese proteica que seria necessária se o fuso mitótico e a membrana nuclear fossem elaborados como em uma divisão ordinária (Mello, 1970).

Os núcleos poliplóides originam-se com a não elaboração do fuso e sem a citocinese ou interrupção da membrana nuclear em *Gerris lateralis* e outros Heteroptera (White, 1973). Fenômenos envolvendo poliploidia tem sido investigados em outros grupos de insetos sendo observados na glândula salivar de lepidópteros e em glândulas pós-faringeanas de *Formica rufa rufopratensis minor* (Mello, 1970). Em *Bombyx mori*, durante o desenvolvimento larval, o conteúdo de DNA de cada célula da glândula salivar média e posterior aumenta por volta de duzentas mil vezes acima do que é esperado para uma célula somática diploide, provavelmente esta grande quantidade de DNA inclui uma amplificação do complemento gênico para fibroína, proteína necessária à formação do fio de seda (Gage, 1973).

Poliploidia somática também têm sido observada em Hymenoptera tais como *Apis mellifera* L., *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Melipona quinquefasciata* (Risler, 1954; Merrian et al., 1954; Mello et al., 1970 apud Mello, 1970). Fenerich & Hosaki-Kobayashi (1994) estudando túbulos de Malphigui de insetos formiga-leão (*Myrmeleontidae Neuroptera*), no último estágio de larva, observaram que na região proximal do túbulo as células e núcleos eram grandes, sugerindo a ocorrência de poliploidização. Estes núcleos grandes apresentavam-se expandidos e com muitas ramificações sendo que tais ramificações possuíam inúmeros corpúsculos nucleolares. A poliploidização de parte das células do túbulo de Malphigui, muito provavelmente, deve estar relacionada com a intensa atividade gênica requerida para a produção do fio de seda necessária à construção do casulo de pupação.



A metáfase espermatogonial de *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri* apresentou cromossomos dispostos por toda placa equatorial e claramente unidos por filamentos cromatínicos. Esta característica está presente em muitas espécies de Heteroptera. Segundo a literatura os cromossomos das metáfases espermatogoniais são conectadas por finos "fios" intercromossomais (Banerjee, 1959; Manna, 1995). DuPraw (1970 apud Manna, 1995) interpretou isto como significando que todos cromossomos do complemento representavam meramente segmentos de uma contínua molécula de DNA durante a configuração metafásica de alguns insetos coreídeos. As conexões intercromossomais aparecem na metáfase espermatogonial de alguns, mas não de todas espécies de Heteroptera aleatoriamente, e é terminal ou lateral (Manna, 1995).

A evolução do padrão meiótico parece ter ocorrido de maneira ordenada em Heteroptera, e os principais grupos podem ser classificados com base no número e tamanho dos cromossomos, mecanismo dos cromossomos sexuais, arranjo dos cromossomos na metáfase I, tempo de divisão dos cromossomos sexuais, presença de cromossomos *m* e inter-relações entre e dentro de grupos derivados. O padrão de meiose em diferentes grupos de Heteroptera apresenta uniformidade em alguns comportamentos básicos. Os cromossomos espermatogoniais geralmente tomam a forma de estruturas ovais ou de bastão quando seu número é pequeno e quando seu número é maior comportam-se como pequenos pontos ou esferas (Manna, 1995).

Nos triatomíneos do gênero *Panstrongylus* analisados neste trabalho os cromossomos meióticos são semelhantes a uma esfera e isto torna difícil a análise destes cromossomos. Segundo Barth (1956) na subfamília Triatominae as espécies apresentam cromossomos pequenos de estruturas uniformes com poucas variações em comprimento e espessura. Os autossomos, vistos de cima, apresentam sempre um aspecto oval, enquanto os heterocromossomos são arredondados.

Em *Panstrongylus megistus* ( $2n=18+X_1X_2Y$ ) e *Panstrongylus herreri* ( $2n=20+X_1X_2Y$ ) os cromossomos sexuais são positivamente heteropicnóticos no início da prófase e mantém-se juntos durante o estágio confuso (zigóteno, leptóteno e início de paquíteno). Durante este estágio a célula aumenta de tamanho e o núcleo retorna a um estágio semelhante a intérfase. Na primeira metáfase os heterocromossomos apresentam-se mais separados e tornam-se isopicnóticos como os demais cromossomos condensados. Os cromossomos



sexuais ocupam uma posição periférica no arranjo cromossomal na primeira metáfase do espermátócito. Neste estágio é possível observar os bivalentes autossômicos e os univalentes formados pelos cromossomos sexuais. Na segunda metáfase eles encontram-se unidos no centro do anel formado pelos autossomos. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Ueshima (1966), para o qual, na anáfase II, os cromossomos  $X_1$  e  $X_2$  segregam-se para um pólo e o Y para o outro. Como resultado desta divisão são formados dois tipos de espermátides:  $10A + X_1X_2$  e  $10A + Y$ .

No Heteroptera Reduviidae, *Conorhinus rubrofasciatus*, a primeira divisão meiótica é equacional para os cromossomos sexuais e durante a metáfase II eles formam um pseudo-trivalente e o maior deles (Y) dirige-se para um pólo e os outros dois cromossomos X dirigem-se para o pólo oposto durante a anáfase (Manna, 1950). O mesmo ocorre nas duas espécies de *Panstrongylus* analisados presentemente, os cromossomos sexuais na metáfase II apresentam-se unidos fisicamente na forma de um pseudo-trivalente.

Os termos pré-redução e pós-redução têm sido freqüentemente utilizados para descrever o comportamento dos cromossomos sexuais durante a meiose; pré-redução significa que os cromossomos segregam-se reducionalmente na primeira divisão. Pós-redução significa que uma separação equacional dos cromossomos sexuais tem lugar na primeira anáfase e a segregação dos cromossomos sexuais tem lugar na segunda divisão. Esta seqüência invertida têm sido registrada em muitos organismos e é particularmente proeminente nos organismos com cromossomos holocêntricos. Nos heterópteros a pós-redução dos cromossomos sexuais é uma regra (Ueshima, 1979).

Ainda que o comportamento pós-reducional dos cromossomos sexuais seja característico dos Heteroptera, sua alteração para o padrão pré-reducional foi verificada em algumas famílias como Tigidae. É incerto se a meiose pré-reducional representa um mecanismo original ou se foi uma adaptação secundária (Manna, 1995).

Em Triatominae, na primeira metáfase, há dois tipos de comportamento nos cromossomos sexuais. Um deles é a localização central, na qual os heterocromossomos encontram-se no centro do anel formado pelos autossomos, como em *T. infestans* e *Dipetalogaster maximum*, enquanto em outro é a posição periférica ocupada pelos cromossomos sexuais como em *T. protacta* e *Rhodnius prolixus*. No gênero *Triatoma*, quando as espécies



possuem cromossomos sexuais múltiplos, estes estão localizados na posição periférica. As outras espécies que possuem o mecanismo XY apresentam estes cromossomos na posição central, embora existam casos excepcionais como de *Triatoma rubrovaria* (Ueshima, 1966).

O comportamento dos cromossomos sexuais no primeiro espermatócito, na maior parte dos gêneros e espécies investigados citologicamente, mostrou uma tendência dos cromossomos sexuais permanecerem juntos no estágio confuso e persistirem assim até a diacinese. Porém no gênero *Rhodnius* e *Dipetalogaster* não há tal tendência na prófase do espermatócito I (Ueshima, 1966).

Em *Triatoma infestans* não foram encontrados zigótenos e paquítenos típicos, estes estádios são substituídos pelo estágio confuso e o núcleo é caracterizado pela presença de um ou dois grandes cromocentros. No final do estágio confuso o núcleo apresenta um único cromocentro e é possível verificar que este é constituído pelos cromossomos X e Y e também está associado com segmentos de três grandes bivalentes autossômicos. Na primeira metáfase os bivalentes autossômicos são localizados na periferia de um anel com os cromossomos sexuais isopicnóticos ao centro e dividindo-se equacionalmente. Na segunda metáfase os meios bivalentes novamente situam-se na periferia do anel com os cromossomos sexuais ao centro apresentando emparelhamento. Um variável número de proeminentes cromocentros são observados nos núcleos poliplóides gigantes das células nutritivas que confirmam a presença de regiões heterocromáticas em alguns cromocentros destas espécies (De Vaio et al., 1985; Pérez et al., 1997; Panzera et al., 1995).

Em *Triatoma rubrovaria* a cromatina autossomal difusa e os cromossomos sexuais condensados são presentes no início da prófase e não são observados zigótenos e paquíteno típicos. Os cromossomos X e Y associam-se em uma ou ambas regiões terminais e esta associação persiste através da prófase meiótica e desfaz-se na diacinese. Durante o estágio confuso os cromossomos sexuais permanecem condensados e mantém uma estreita associação enquanto os bivalentes autossomais sofrem alterações. No início do estágio confuso eles estão desespiralizados e indistinguíveis. Subseqüentemente, os heterocromossomos separam-se e podem continuar ligados aos demais cromossomos por finas fibras cromatínicas. No diplóteno os bivalentes são distinguíveis e associados terminalmente. Os cromossomos



sexuais ainda estão associados e apresentam-se heteropicnóticos. Na diacinese os cromossomos sexuais separam-se, na metáfase II estes cromossomos estão fisicamente associados e encontram-se no interior do anel de autossomos. Os núcleos poliplóides das células nutritivas exibem uma cromatina distribuída homogeneamente e com somente dois elementos heteropicnóticos que podem representar os cromossomos sexuais (De Vaio et al., 1985).

Em *Rhodnius prolixus* um típico estágio de zigóteno é observado, nesta fase os cromossomos sexuais apresentam-se intimamente associados formando um simples corpo heteropicnótico. O zigóteno é seguido pelo estágio confuso no qual os bivalentes autossômicos são desespiralizados mas os cromossomos sexuais permanecem condensados. No diplóteno os bivalentes autossômicos são visíveis com quiasma intersticial e os cromossomos X e Y continuam associados até o início da diacinese quando então tornam-se isopicnóticos. Na metáfase I, os cromossomos sexuais e um dos bivalentes são negativamente heteropicnóticos. Na segunda metáfase, os sexuais formam um pseudo-bivalente no centro do anel de autossomos. Os núcleos poliplóides das células nutritivas apresentam somente um cromocentro compacto (De Vaio et al., 1985).

Em *Triatoma platensis* a prófase meiótica é caracterizada pela presença de vários cromocentros. Durante o início da prófase meiótica duas massas heteropicnóticas são proeminentes e uma delas consiste de ambos os cromossomos sexuais (XY). Durante o diplóteno, os cromossomos sexuais permanecem heteropicnóticos e eles frequentemente são ligados a regiões heteropicnóticas de um, dois ou três bivalentes autossômicos (Panzera et al., 1995).

Em *Triatoma delponteii* todos os pares de autossomos apresentam extensivas regiões heteropicnóticas somente nas extremidades cromossômicas. O cromossomo Y é totalmente heteropicnótico enquanto o X possui duas regiões: uma grande região heteropicnótica e outra região isopicnótica. No início da prófase meiótica, grande massa heteropicnótica é observada. Este cromocentro é formado pela associação de regiões heteropicnóticas de todos os bivalentes autossômicos e ambos cromossomos sexuais. Do paquíteno até a prometáfase esta associação persiste. Durante os estágios tardios do diplóteno até a diacinese todos os cromossomos parecem ser associados por seus finais heterocromáticos (Panzera et al., 1995).



No *Oncopeltus fasciatus* e em outros heterópteros o início da prófase não pode ser analisado em detalhes, os cromossomos sexuais são positivamente heteropicnóticos neste início da meiose e assim permanecem até a diacinese. Após o zigóteno, o núcleo entra em um estágio confuso, durante esta fase o tamanho celular aumenta e o núcleo retorna a um estágio semelhante ao interfásico. Durante a diacinese os bivalentes podem ser vistos associados por um ou dois quiasmas. O quiasma invariavelmente terminaliza completamente em todos os heterópteros e na primeira metáfase todos os bivalentes são associados somente pelos sítios terminais. A primeira divisão meiótica é reducional para todos os autossomos e equacional para os cromossomos sexuais. Durante a primeira telófase os cromossomos sexuais tendem a formar um pseudo-bivalente. E a segunda divisão meiótica segue diretamente da primeira telófase sem estádios de descanso. Na segunda metáfase, os cromossomos formam, assim como na primeira, um anel, enquanto o pseudo-par formado pelos cromossomos sexuais é localizado no centro deste anel. Na anáfase II os cromossomos sexuais passam para os pólos opostos e a segunda divisão é portanto reducional para estes cromossomos (Ueshima, 1979).

O complemento cromossômico do Heteroptera, *Carlisia wahlbergi*, como os demais desta ordem é holocêntrico. A progressão da meiose parece ser normal embora ocorra estágio confuso após o zigóteno. Durante este estágio, o tamanho celular aumenta e o núcleo retorna a um estágio semelhante ao interfásico. Após o estágio confuso segue-se um típico diplóteno. O comportamento do cromossomo X é pós-reducional, com uma separação equacional na anáfase I e uma reducional na anáfase II (Ueshima, 1979; Fossey & Liebenberg, 1995).

Em *Graphosoma restricte* (Heteroptera) a coloração com orceína lacto-acética, no início da prófase meiótica, revelou que os cromossomos X e Y são intimamente associados, tomando uma forma arredondada, densa e perifericamente localizada. Estes cromossomos são positivamente heteropicnóticos até a diacinese. Em toda prófase meiótica há significantes diferenças no ciclo de condensação entre os cromossomos sexuais e autossomos. No diplóteno, os bivalentes autossômicos parecem claramente individualizados, apresentando como regra uma associação terminal. Os cromossomos sexuais aparecem como entidades individualizadas na diacinese;



neste estágio os bivalentes autossomais são associados somente pelos sítios terminais (González-García et al., 1996).

No Heteroptera (Largidae) *Largus rufipennis*, no início da prófase, o cromossomo X é positivamente heteropicnótico e encontra-se na periferia do núcleo; no paquíteno a associação do cromossomo X com um bivalente autossomal é aparente. Na diacinese o X é isopicnótico e os bivalentes autossomais apresentam dois quiasmas na posição terminal. Em ambas placas metafásicas o cromossomo X encontra-se no interior de um anel de autossomos. Na anáfase I o X divide-se equacionalmente (Mola & Papeschi, 1993).

Em *Carlisis wahlbergi* ( $2n=18A + X_1X_2$ ), Coreidae, a meiose é normal, exceto na prófase I pois o zigóteno é seguido pelo estágio confuso. Após o estágio confuso segue-se um típico diplóteno. Na prófase I os dois cromossomos sexuais são positivamente heteropicnóticos até a diacinese onde eles se tornam isopicnóticos. Na metáfase I eles são isopicnóticos ou algumas vezes negativamente heteropicnóticos. Os dois cromossomos sexuais apresentam uma estreita associação durante a meiose e até a diacinese permanecem unidos. Os autossomos exibem um simples quiasma enquanto os cromossomos sexuais são invariavelmente aquiasmáticos e com meiose pós-reducional. Como é típico em Heteroptera, a primeira divisão meiótica é seguida imediatamente pela segunda divisão sem um estágio de descanso (Fossey & Liebenberg, 1995).

Banerjee (1959) estudando vinte diferentes espécies de Heteroptera, observou, de uma forma geral, que no diplóteno o núcleo contém bivalentes autossômicos e univalentes sexuais. Os bivalentes possuem uma baixa frequência de quiasmas, sendo um quiasma por bivalente o usual, porém mais do que um quiasma podem ser observados em algumas espécies. Em estádios tardios do diplóteno os cromossomos sexuais geralmente permanecem fusionados, mas em algumas espécies eles se tornam individualizados. Na diacinese os quiasmas terminais aumentam consideravelmente, neste estágio, em algumas espécies todos os quiasmas são terminais e os cromossomos sexuais tornam-se distintos. Na anáfase I, os cromossomos sexuais em Heteroptera dividem-se equacionalmente. Mas, em homópteros pertencentes as famílias Membracidae e Cercopidae, o único cromossomo X não se divide equacionalmente neste estágio. Na metáfase II de todos heterópteros pertencentes as famílias Pentatomidae, Plataspidae e sub-família Dinidorinae,



Lygaeidae, Nepidae e Reduviidae os cromossomos sexuais formam um pseudo-bivalente. A segunda divisão anafásica, em todas as espécies de Heteroptera, é uniformemente reducional para os cromossomos sexuais enquanto em Homóptera a divisão é equacional.

Em outra ordem de insetos como Odonata podemos perceber algumas semelhanças com a ordem Heteroptera, como por exemplo, heteropicnose dos cromossomos sexuais no início da meiose e pós-redução de heterocromossomos. Em *Aeshna confusa* ( $2n=13+X_0$ ), nos estádios iniciais da prófase meiótica até o diplóteno, o cromossomo X é heteropicnótico. Nas metáfases espermatogoniais o cromossomo X não pode ser identificado por ser isopicnótico e de tamanho similar aos autossomos que são muito pequenos. Na diacinese e metáfase I todos bivalentes têm somente um quiasma na posição mediana ou terminal. Os autossomos dividem-se reducionalmente na anáfase I enquanto o cromossomo sexual X divide-se equacionalmente e migra sincronicamente com os autossomos (Mola, 1995).

As espécies de Heteroptera (Reduviidae) analisadas no presente trabalho, apesar da considerável congruência com a maior parte dos Heteroptera estudados, apresentam algumas características distintas, como por exemplo, na diacinese os cromossomos sexuais ainda não aparecem como entidades distintas, fato que somente ocorre durante a prometáfase. Desta forma no diplóteno ainda não é possível verificar os univalentes formados pelos cromossomos sexuais como é comum em Heteroptera.

De uma maneira geral, a família Reduviidae é heterogeneamente constituída quanto ao cariótipo. O número diplóide oscila entre 12 e 34. A maior parte das espécies apresentam o mecanismo sexual XY e  $X_nY$  e três espécies possuem o sistema  $X_0$ . O arranjo dos cromossomos nesta família é mais típico na metáfase II. E o número de autossomos é menos variável que o de cromossomos X. Em Acanthaspidinae (Reduvidae), quatro ou cinco espécies tinham sistemas XY e uma  $X_4Y$ . Espécies exclusivamente XY foram encontradas em Apiomerinae, Bactrodinae e Emesinae, enquanto as subfamílias Harpactorinae, Piratinae, Stenopodinae, Triatominae e Zeelinae apresentam machos com sistemas sexuais XY e  $X_nY$ . *Polytoxus* (saicinae) e duas espécies de *Extrychotes* (Ectrichodiinae) apresentavam o incomum mecanismo  $X_0:XX$ . Nos Reduviidae a evolução dos cromossomos sexuais aparentemente procedeu de um tipo XY em duas direções. Em uma delas o Y foi perdido e em outra o X foi quebrado dando origem a um máximo de  $X_5Y$ ,



embora o tipo mais comum seja o  $X_2Y$ . O número cromossômico mais freqüente foi entre 20 e 22 (Manna, 1995).

O mecanismo de cromossomos sexuais na subfamília Triatominae atinge de XY até  $X_1X_2X_3Y$  no macho. Geralmente não há dúvidas que o mecanismo de cromossomos sexuais múltiplos é mais recente que o sistema XY. O sistema de cromossomos sexuais múltiplos é mais comum em Heteroptera do que em outros insetos. Este fato provavelmente deve ser por causa da natureza holocinética dos cromossomos em Heteroptera. Quando cromossomos sexuais múltiplos ocorrem nos insetos, tais como Orthoptera e Diptera, usualmente há uma tendência para o decréscimo no número de autossomos quando aumenta o número de cromossomos sexuais, devido ao evento de fusão cromossômica (White, 1954 apud Ueshima, 1966). Mas em Heteroptera não há este tipo de relação.

Os tipos de cromossomos sexuais em machos de Heteroptera podem ser amplamente generalizado em  $X_0$ ,  $X_n0$ ,  $XY$  e  $X_nY$ . No sistema  $X_n0$ , o número de cromossomos X pode ser determinado somente no complemento espermatogonial, por que durante a meiose geralmente os múltiplos cromossomos X geralmente fundem-se como um simples elemento. No caso dos tipos XY e  $X_nY$ , os cromossomos sexuais são fundidos e heteropicnóticos no início da prófase e na diacinese eles são separados como univalentes (Manna, 1995).

Na evolução do mecanismo dos cromossomos sexuais o papel da fragmentação tem sido enfatizado. Schrader (1947 apud Ueshima, 1966) apontou que uma simples quebra nos cromossomos sexuais holocinéticos pode resultar em múltiplos cromossomos sexuais.

A idéia de fragmentação cromossômica é fortemente suportada pelas observações de Heizer (1950 apud Ueshima, 1979) no Heteroptera Pentatomidae, *Oechalia pacifica*. Há um polimorfismo sexual interessante nesta espécie. Dos quatorze espécimens analisados, 12 possuíam um sistema normal XY. Um dos dois remanescentes tinham dois cromossomos X e outro três cromossomos X. A relação de tamanho entre o único, duplo e triplo X claramente indica a ocorrência de simples fragmentação. Adicionalmente Hughes-Schrader & Schrader (1961) demonstraram que os fragmentos de cromossomos X induzidos por raios-X comportam-se normalmente e podem persistir por muitas gerações celulares, edificando que a fragmentação



desempenha um importante papel no sistema de múltiplos cromossomos X, bem como, no aumento do número de autossomos em Heteroptera.

Em Heteroptera, o polimorfismo cromossomal relativo aos cromossomos sexuais tem apresentado uma situação peculiar. Muitos citologistas acreditam que os mecanismos de fissão e a fusão desempenham principal papel na evolução dos cromossomos em Heteroptera. Heterozigotos para inversões e translocações não têm sido registrados em nenhuma das 1200 espécies até agora examinadas. Há suspeitas de fusão entre cromossomos sexuais e autossomos em belastomídeos, *Lethocerus* sp. e *L. indicus*. Outras formas de polimorfismo cromossomal em populações naturais não foram descobertas (Manna, 1995).

Nos Pentatomídeos polimorfismos nos XY para  $X_1X_2Y$  e  $X_1X_2X_3Y$  foram encontrados em *Oechalia pacifica* e em outras espécies, conduzindo a sugestão de que o X original do complexo XY e em alguns casos também autossomos dão origem aos múltiplos Xs e um Y. O mecanismo de múltiplos cromossomos X também foi encontrado em Nepidae, Reduviidae, Coreidae, Pyrrhocoridae e alguns Lygaeidae. A fragmentação, fusão e algumas vezes não disjunção são fatores relevantes na origem dos múltiplos cromossomos sexuais. Nos tipos  $X_nY$ , o Y na maior parte das vezes é maior do que os Xs. Espécies congêneras com tipo XY possuem geralmente um Y menor e X maior. Portanto, a fragmentação de um único X deve ter dado origem aos demais cromossomos Xs. Este evento pode ser explicado porque o Y é maior que o X nos sistemas  $X_nY$  (Manna, 1995).

A evolução dos múltiplos cromossomos sexuais pela fragmentação de um cromossomo sexual original tem sido a hipótese mais aceita entre os citologistas (Ueshima, 1979; Manna, 1995). Os cromossomos X parecem ser relativamente mais frágeis do que o Y. E a sobrevivência dos fragmentos pode ter sido facilitada pelo mecanismo de meiose pós-reducional dos cromossomos sexuais que impede a formação de quiasma entre eles. Entre os tipos  $X_nY$  os machos com  $X_1X_2Y$  foram os mais freqüentes, o que sugere que o X original quebra-se mais freqüentemente uma vez, sendo menos freqüente, duas, três ou quatro vezes dando origem a indivíduos  $X_1X_2X_3Y$ ,  $X_1X_2X_3X_4Y$  e  $X_1X_2X_3X_4X_5Y$  (Manna, 1995).

Em sistemas monocêntricos, a fusão parece ser um modo comum de alterações cromossômicas que conduz ao decréscimo do número de



cromossomos. A possibilidade de ocorrência de fusão em organismos com cromossomos holocêntricos têm sido discutida por muitos pesquisadores (Ueshima, 1966; Ueshima, 1979). Porém, o mecanismo predominante em organismos holocêntricos é a fragmentação (UESHIMA, 1979).

Em organismos com cromossomos monocêntricos os sistemas com múltiplos cromossomos sexuais não são comuns. Além disso, sua ocorrência é geralmente correlacionada com a presença de um menor número de autossomos do que em espécies com sistemas XY e XO, o que implica que muitos deles surgiram por translocações entre os cromossomos sexuais e autossomos (White, 1973 apud Ueshima, 1979). Em contraste, os múltiplos mecanismos em Heteroptera são também distintos em virtude do fato que eles geralmente não são acompanhados por redução no número de autossomos, isto implica em surgimento por fragmentação.

O comportamento meiótico dos cromossomos sexuais em Heteroptera também desempenha importante papel no estabelecimento do sistema de múltiplos cromossomos X. No sistema cromossômico  $X_nY$  de Heteroptera não ocorre formação de quiasma entre os cromossomos X e Y devido a pós-redução destes heterocromossomos (Ueshima, 1979).

A análise citogenética de machos de diferentes populações de *Belostoma plebejum* ( $2n=14+XY$ ) revelou a presença de duas aberrações cromossômicas que ocorrem naturalmente: fusão autossomal e fragmentação do cromossomo sexual. A meiose em ambas condições é regular. Com a fusão observa-se um trivalente autossomal na meiose I, o qual divide-se reducionalmente na primeira anáfase. Na outra condição de aberração cromossômica os três cromossomos sexuais ( $2n=14+X_1X_2Y$ ), provavelmente, resultaram da fragmentação do cromossomo X original. Particularmente em *Belostoma*, tem sido proposta a evolução de um ancestral ( $2n=26+XY$ ) com fusão de autossomos e fragmentação do cromossomo X (Papeschi, 1994).

Nos Heteroptera da família Belostomatidae, o complemento cromossômico mais freqüente é  $2n= 26 +XY$  (machos)/  $XX$  (fêmeas); em adição, há quatro espécies cuja fórmula cromossômica é  $2n= 26+X_1X_2Y/X_1X_2X_3X_4$ . Considerando que os mecanismos de múltiplos cromossomos sexuais são provavelmente derivados de um tipo mais primitivo XY. Os outros complementos são derivados de fusões e fragmentações dos autossomos e cromossomos sexuais. No caso de *Belostoma flumineum* ( $2n=22+XX/XY$ ) pode-se observar



que dois pares de autossomos são maiores que os outros, a origem deste cariótipo deve ser devida a fusões autossomais (Papeschi, 1994), principalmente, considerando que espécies como *B. elegans*, *B. dentatum* e *B. cunmingsi*, apresentam o mesmo complemento  $2n = 26 + X_1X_2Y / X_1X_2X_3X_4$ . Em contraposição, nestas espécies o sistema de cromossomos sexuais  $X_1X_2Y / X_1X_2X_3X_4$  pode ter derivado da fragmentação de um X ancestral (Papeschi & Bidau, 1985).

A família Pentatomidae é a mais primitiva de todas as famílias de Heteroptera. Os membros das tribos Halyini da família Pentatomidae até agora conhecidos tem  $2n=14$  cromossomos com sistema XY para machos. Esta condição cromossômica pode ser considerada a mais primitiva da ordem, pois, a maior parte das famílias de Heteroptera possui um número de cromossomos comparativamente mais alto do que os pentatomídeos e portanto devem ser considerados mais recentes na evolução deste grupo (Banerjee, 1959).

Desta forma, analisando os exemplos disponíveis na literatura, o modo mais freqüente de derivação cromossômica em Heteroptera é a fragmentação podendo ocorrer também casos de fusão entre os autossomos. Nos cromossomos sexuais não foram relatados casos de fusão nas famílias analisadas, sendo a fragmentação o sistema predominante.

#### 4.2. Impregnação com Nitrato de Prata

A primeira informação sobre a complexidade do nucléolo foi feita por Leydig (1852 apud Wachtler & Stahl, 1993). Avanços adicionais foram feitos com reações de impregnação pelos íons prata. Observações feitas por Heitz (1931 apud Wachtler & Stahl, 1993) e McClintock (1934 apud Wachtler & Stahl, 1993) estabeleceram uma conexão entre nucléolo e *loci* cromossomal. A localização cromossomal foi denominada RON (região organizadora nucleolar).

O nucléolo é estudado desde o século passado e despertou o interesse dos cientistas mesmo antes das células e núcleos. Até hoje esta organela é foco de relevantes estudos que englobam aspectos de sua organização, origem, participação na síntese de proteínas e presença nos mais diversos tipos de organismos. No presente trabalho foram observados importantes



resultados após emprego da impregnação pelos íons prata. Os cromossomos sexuais de *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri* possuem atividade organizadora nucleolar apresentando-se fortemente impregnados durante os vários estádios da prófase I meiótica. Nossos dados também indicaram que nas espécies analisadas ocorre fragmentação do nucléolo, pois, até a diacinese da prófase meiótica é possível observar a região nucleolar e após esta fase são notados corpúsculos e fragmentos nucleolares que se espalham no interior celular. Também foi possível verificar que nestes Heteroptera ocorre reativação de síntese de RNAr pós-meiótica, provavelmente relacionada à diferenciação celular. Para melhor entendimento da coloração pela prata é necessário compreender os mecanismos da coloração, fisiologia nucleolar e relacionar dados sobre outros organismos disponíveis na literatura.

O substrato para impregnação com prata são proteínas (Schwarzacher, 1978). As proteínas responsáveis pela impregnação são denominadas proteínas Ag-NOR, pelo fato do mesmo procedimento de coloração ser usado para corar material nucleolar que permanece ligado a RON nos cromossomos metafásicos (Wachtler & Stahl, 1993).

Testes citoquímicos com DNase, RNase e tratamentos com proteases indicam que o material prata positivo consiste de proteínas acídicas (Schwarzacher & Wachtler, 1993). Esta hipótese está de acordo com a observação de que o nucléolo contém por volta de 60% de proteínas acídicas. As RONS são ativamente transcritas no início da prófase, neste estágio grandes quantidades de material Ag-positivo podem ser vistas nos sítios das regiões organizadoras nucleolares. Quando a atividade das RONS cessa no final da prófase, o material Ag-positivo é gradualmente removido, mas ainda algum remanescente é observado na metáfase e anáfase como marcações adjacentes as RONS. Na telófase o material Ag-positivo começa a reacumular com a ativação das RONS (Schwarzacher et al., 1978). Desta forma, as proteínas marcadas pela prata provavelmente incluem alguns dos fatores necessários a transcrição do DNAr e também ao processamento do RNAr (Schwarzacher & Wachtler, 1993). Segundo Miller e colaboradores (1976 apud Schwarzacher et al., 1978) a coloração pela prata é positiva somente nas RONS de células mitóticas que foram funcionalmente ativas durante a intérfase precedente.

O nucléolo é organizado ao redor de sítios cromossomais heterocromáticos contendo muitas cópias de genes RNAr, comumente



referidos como região organizadora do nucléolo (RON) (Mélèse & Xue, 1995). O DNA dos *cistrons* que codifica a transcrição de RNAr é redundante e o número destes genes em cada genoma varia de 8 a mais do que 1000 (Dessen et al., 1981). A maior parte das espécies de plantas têm muito mais cópias de gene RNAr por genoma do que mamíferos (mais do que 1000 cópias). O genoma diplóide de *Alium cepa* L., por exemplo, contém por volta de 7000 cópias de genes RNAr (Panzer, 1996b). Usualmente a maior parte destas cópias são inativas e formam grandes blocos heterocromáticos que são ligados ou incluídos no nucléolo (Schwarzacher & Wachtler, 1993).

A correlação entre um aumento na atividade transcricional e aumento na coloração pela prata são freqüentemente observadas, indicando que as RONS cromossômicas envolvidas na formação do nucléolo foram transcricionalmente ativas (Wachtler & Stahl, 1993; Schwarzacher et al., 1978). De outra forma, um decréscimo de transcrição no DNAr não é necessariamente acompanhado por perda de marcação pela prata e depende também da síntese protéica (Wachtler & Stahl, 1993). A coloração pela prata, portanto, não pode ser considerada um indicador incondicional de transcrição de DNAr.

Medina et al. (1986) acreditam que a coloração da RON pela prata deve ser associada a descondensação da cromatina portadora do DNAr melhor do que a atividade transcricional. Adicional suporte para esta idéia foi dado pelo emprego de inibidores de transcrição, que não aboliam a coloração pela prata (Hernandez-Verdun et al., 1984). Parece não haver uma única proteína ou conjunto de proteínas responsáveis pela coloração pela prata. De fato, nem a presença de RON nem a atividade transcricional são características comuns de todas estruturas impregnadas pela prata (Medina et al., 1986).

A hipótese da impregnação pelos íons prata estar associada a descondensação da cromatina portadora do DNAr é suportada pela descoberta de regiões ácidas fortemente fosforiladas nas proteínas ligadas a região organizadora nucleolar (do inglês AG- NOR) pois, o processo de fosforilação e desfosforilação de proteínas cromatínicas não histônicas (ácidas) é responsável por alterações estruturais que afetam o grau de empacotamento das fibras cromatínicas. Assim os dados citológicos suportam a idéia que proteínas coradas pela prata são associadas com duas funções nucleolares: o processo de descondensação do DNAr necessário à transcrição e os processamentos iniciais do pré-RNAr (Medina et al., 1986). Entretanto, há controvérsias sobre a sugestão dos autores acima citados com relação a



cromatina descondensada associada ao nucléolo, pois outros autores como Kaplan (1992 apud Wachtler & Stahl, 1993) afirmam que a cromatina condensada é freqüentemente encontrada adjacente ao nucléolo (cromatina perinucleolar) e que nos compartimentos nucleolares a cromatina condensada pode ser vista em várias quantidades através de micrografias eletrônicas convencionais.

Os genes que codificam para a transcrição de RNA ribossômico são responsáveis pela formação do nucléolo (Fischer et al., 1991). Dentro do nucléolo tem lugar a produção de componentes pré-ribossomais, incluindo a transcrição dos genes RNAr, o processamento do transcrito primário (RNAr 45S) em maduros RNAr (18S, 5,8S e 28S), a adição de proteínas aos pré-ribossomos nascentes e incorporação do RNAr 5S, o qual é transcrito fora do nucléolo (Scheer & Weisenberger, 1994; Hernandez-Verdun, 1991).

A ultraestrutura nucleolar inclui três principais componentes: centro fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD) e componente granular (CG) (Wachtler & Stahl, 1993; Raska, 1995). Na maioria das células animais, 75% do nucléolo é composto por componente granular, 17% pelo componente fibrilar denso e 2% pelo centro fibrilar (Shaw et al., 1985). Algumas vezes aparecem vacúolos de 0,1 a 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro no nucléolo (Schwarzacher & Wachtler, 1993).

O centro fibrilar consiste de uma rede de finas fibras de 4,8 nm (Schwarzacher & Wachtler, 1993) e pode ser corado e visualizado pela coloração com prata tanto em microscopia de luz como em eletrônica. Uma variedade de proteínas com função conhecida foram localizadas no centro fibrilar. Por exemplo, a proteína C23 atua na supressão da transcrição influenciando a estrutura da cromatina DNAr e síntese de RNAr, atua também na montagem dos ribossomos, e faz parte das proteínas Ag-NOR. A proteína RNA-Polymerase I responsável pela transcrição do DNAr também é encontrada no centro fibrilar (Wachtler & Stahl, 1993).

O componente fibrilar denso (CFD) está aos arredores do centro fibrilar e consiste de fibrilas densamente empacotadas com 3-5 nm. O CFD forma uma rede de fibras de 0,05 a 0,1  $\mu\text{m}$  também chamada nucleolema (Schwarzacher & Wachtler, 1993). Este componente pode ser marcado por prata, embora ele core menos homogeneamente que o centro fibrilar. A proteína B23 é uma das responsáveis pela impregnação argêntea, ela é uma fosfoproteína



intermediária entre o citoplasma e o nucléolo (Borer, 1989 apud Wachtler & Stahl, 1993) e interage com ácidos nucleicos (Dumbar, 1989 apud Wachtler & Stahl, 1993). Outras proteínas a serem citadas são a C23, RNA-Polymerase I, Topoisomerase I. Assim como as proteínas localizadas no centro fibrilar, as proteínas localizadas no componente fibrilar denso parecem envolvidas no processamento da molécula de RNAr. É interessante ressaltar que muitas proteínas encontradas no componente fibrilar estão presentes no centro fibrilar e vice-versa. A presença de DNA no componente fibrilar denso tem sido demonstrada por métodos citoquímicos, imunocitoquímicos (Moreno, 1992 apud Wachtler & Stahl, 1993) e por hibridização *in situ* (Wachtler & Stahl, 1993). O padrão da distribuição de DNA observado por Jordan (1992 apud Wachtler & Stahl, 1993) também indica que o DNA pode estar presente no componente fibrilar denso.

O componente granular como o nome indica consiste de um material de aspecto granular e é formado por estruturas que atingem diâmetros de 10 a 15nm (Schwarzacher & Wachtler, 1993). Este componente envolve tanto o centro fibrilar como o componente fibrilar denso e ocupa uma posição periférica no nucléolo. O componente granular parece não se impregnar pela prata e situa-se na região de formação dos pré-ribossomos. RNA (Wachtler & Stahl, 1993; Raska, 1995), RNAr e proteínas ribossomais também são encontrados neste componente (Wachtler & Stahl, 1993).

Embora a função do nucléolo já tenha sido elucidada, o significado funcional dos diferentes componentes nucleolares ainda não estão claros. A localização dos primeiros passos da biogênese ribossomal, especialmente onde o RNAr está sendo transcrito é ainda assunto de controvérsias (Wachtler & Stahl, 1993).

Há basicamente duas diferentes visões sobre este problema: um grupo de autores acredita que o centro fibrilar é o sítio de transcrição dos RNAr. Esta idéia foi aventada pela observação que o material corado pela prata aparentemente idêntico ao material encontrado no centro fibrilar está ligado as RONS cromossomais. Esta visão foi corroborada pela descoberta que RNA-Polimerase I foi detectada somente ou predominantemente no centro fibrilar. Adicionalmente DNAr foi detectado por hibridização *in situ* no centro fibrilar ao nível de microscopia eletrônica (Wachtler & Stahl, 1993).



Uma visão alternativa é que o RNAr é transcrito no componente fibrilar denso. Esta hipótese é corroborada pela observação da incorporação por uridina no componente fibrilar denso, revelada por técnicas de autorradiografia (Bouteille et al., 1982 apud Wachtler & Stahl, 1993). Em adição, o nucléolo pode ser transcricionalmente ativo na ausência do centro fibrilar, indicando a possibilidade que nestes casos o centro fibrilar não funciona como sítio de transcrição. Estudos de hibridização *in situ* e microscopia eletrônica indicam que o rDNA está presente no componente fibrilar denso melhor do no centro fibrilar (Wachtler & Stahl, 1993).

Uma interpretação consenso tem sugerido que o sítio de transcrição é localizado na interface entre o centro fibrilar e o componente fibrilar denso (Wachtler & Stahl, 1993; Raska, 1995).

A questão da localização dos passos pós-transcricionais da biogênese dos ribossomos está melhor estabelecida. Os passos iniciais parecem acontecer no componente fibrilar enquanto o componente granular é correspondente a um passo mais tardio da biogênese dos ribossomos. Algumas observações complementares têm conduzido a esta hipótese. A incorporação da uridina tritiada é observada no componente fibrilar denso e somente mais tarde no componente granular (Ghosh et al., 1976 apud Wachtler & Stahl, 1993). Do mesmo modo, na nucleogênese, após a mitose, com a reativação nucleolar, o componente fibrilar denso aparece antes do componente granular (Wachtler & Stahl, 1993).

Mudanças nucleolares *in vivo* são bastante comuns. O tamanho, o número e estrutura do nucléolo mudam com o estado metabólico e proliferativo da célula. Geralmente, células ativas tendem a ter um nucléolo maior e mais nucléolos que as células inativas. Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo testicular das espécies de insetos estudadas neste trabalho, por exemplo, são células muito ativas apresentando um nucléolo fortemente impregnado pelos íons prata, com um halo proeminente ao seu redor constituído de uma material nucleolar proteico que se cora menos homogeneamente como o componente fibrilar denso.

A descoberta que os cromossomos ocupam um território específico no volume nuclear, definido como domínio cromossômico, foi demonstrado recentemente. Esta demonstração foi feita com pintura em cromossomos, usando sondas específicas correspondentes a um único cromossomo, e



hibridização *in situ* para localizar cromossomos específicos durante a intérfase. Portanto, não é surpreendente que a distribuição dos genes ribossomais siga uma regra geral altamente ordenada na estrutura nuclear. As regiões organizadoras nucleolares são fortemente envolvidas na polaridade nuclear. Além de constituir uma marca citológica tradicional, há também a evidência para polaridade entre diferentes RONS, e entre RONS e o envelope nuclear. Na placa metafásica, as RONS dos cromossomos adjacentes estão próximas umas das outras, melhor do que se esperaria ser em uma distribuição aleatória. Esta observação indica que há certamente um arranjo polarizado das RONS de cromossomos adjacentes no núcleo interfásico (Hernandez-Verdun, 1991).

Os cromossomos portadores de RONS podem deslocar-se dos diferentes pontos através do núcleo para concentrar-se em um nucléolo e podem ser dispersados em um ou dois ciclos celulares. Isto significa que esses devem mover-se livremente dentro do núcleo sem perturbar a ordem dos outros cromossomos. Frequentemente, em células eucariotas, o nucléolo está localizado no ou próximo do envelope nuclear e em procariotos, como por exemplo, levedura, ele está justaposto no interior da membrana celular. Esta posição parece relacionada a presença de uma estrutura esquelética específica no sítio da ligação nucleolar ao envelope (Hernandez-Verdun, 1991).

A específica compartimentalização do processo nucleolar no núcleo demonstra a existência de algum tipo de maquinária celular que gera esta organização nuclear e nucleolar. A localização das proteínas nucleolares em regiões específicas do nucléolo indica que estas proteínas devem conter sinais que determinam seu destino nucleolar final (Hernandez-Verdun, 1991).

A ausência de uma membrana ao redor do nucléolo significa que não há uma barreira para a difusão entre o nucléolo e o nucleoplasma, isto é, embora o nucléolo seja uma estrutura morfológicamente distinta no interior do núcleo, não há evidências sugerindo que ele está fisicamente separado do nucleoplasma. Entretanto não podemos afirmar que as diferentes áreas no interior do nucléolo são igualmente acessíveis a difusão de moléculas do nucleoplasma (Mélèse & Xue, 1995).

Foi constatado ao nível de microscopia eletrônica que durante a mitose o nucléolo geralmente desaparece no final da prófase e reaparece na telófase.



Este processo é acompanhado pela cessação da síntese de RNAr. O desaparecimento não é total, desde que material corado pela prata pode ser observado nas RONS cromossômicas no decorrer da mitose. Na telófase, o componente fibrilar denso reaparece, seguido mais tarde pelo material granular, corroborando a visão de que o componente granular corresponde a um passo mais tardio na biogênese dos ribossomos do que o componente fibrilar. O reaparecimento relativamente rápido do nucléolo após a cariocinese é muito provável não ser somente devido a síntese "*de novo*" do material nucleolar, mas também, devido a reconstrução do nucléolo a partir do material nucleolar que está disperso no núcleo e citoplasma na prófase. A favor desta visão foram feitas algumas observações na literatura. O aumento no material corado pela prata observado após as mitoses, não é abolido por inibição de síntese proteica (Wachtler & Stahl, 1993), deste modo indicando que a reconstrução do nucléolo não depende só do material sintetizado novamente.

Paweletz (apud Wachtler & Stahl, 1993) observou uma coloração pela prata cobrindo cromossomos durante a mitose e tem sugerido que este fenômeno é devido a proteínas nucleolares. Um artigo de Sato (1988 apud Wachtler & Stahl, 1993) indica que as RONS cromossomais são capazes de organizar o nucléolo a partir do material dispersado no curso de uma mitose precedente. Importantes observações deste problema têm sido estudadas a partir de experimentos com células micronucleadas (Hernandez-Verdun et al., 1991). Foi demonstrado que algumas células micronucleadas contêm nucléolo funcional, enquanto outras contêm estruturas fibrilares que reagem com anticorpos anti-nucleolares, não possuem atividade transcricional e não contêm DNAr.

Para investigar o potencial de agregação das proteínas nucleolares, Hernandez-Verdun et al. (1991) seguiram a distribuição e localização das proteínas nucleolares em células micronucleadas. Nos micronúcleos que somente continham um cromossomo, o nucléolo e genes ribossomais ativos foram encontrados somente em micronúcleos que continham RON adjacente ao cromossomo. Em outros, as proteínas nucleolares correspondentes a diferentes domínios nucleolares acumulavam-se a despeito da ausência de genes ribossomais. Estas proteínas tendem a agregar-se em estruturas fibrilares, mas estas são distribuídas aleatoriamente no volume nuclear. Portanto, a transcrição de genes ribossomais parece necessária neste modelo experimental, como ela é durante o ciclo celular, para coordenar o correto



posicionamento pré-empacotamento das proteínas nucleolares (Hernandez-Verdun, 1991).

A visão de desintegração e subsequente reintegração do material nucleolar no curso da mitose tem sido corroborada através de uma combinação de hibridização *in situ* e uso de anticorpos contra proteínas nucleolares. Estes estudos têm indicado que as proteínas nucleolares são especificamente localizadas de novo ao redor dos cromossomos durante a mitose (Wachtler & Stahl, 1993).

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

A persistência do material nucleolar nas mitoses tem sido observada em vários exemplos; Goessens e Lepointe (1974 apud Schawarzacher & Wachtler, 1983) descreveram que um material semelhante ao centro fibrilar do nucléolo algumas vezes permanece ligado aos cromossomos metafásicos em células "Ehlich ascites". Também ligados aos cromossomos metafásicos nas células de pâncreas de rato e em células Hela aparecem remanescentes do material nucleolar semelhantes ao centro fibrilar (Schawarzacher & Wachtler, 1983).

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

A desorganização do território nucleolar e a subsequente dispersão das proteínas nucleolares estão entre os primeiros eventos da mitose. Esta dispersão não é simplesmente devida ao desligamento da transcrição



ribossomal, pois o ciclo celular é dependente de modificações das proteínas nucleolares que também têm lugar ao mesmo tempo. Tem sido demonstrado que duas principais proteínas nucleolares, nucleolina (C23) e numatrina (B23), são altamente fosforiladas durante o ciclo celular. Tem se sugerido que a fosforilação é responsável pelo controle das alterações na estrutura e atividade nucleolar durante a mitose (Hernandez-Verdun, 1991).

No decorrer da mitose, as proteínas nucleolares específicas são localizadas em diferentes lugares. Algumas permanecem associadas com as RONS, enquanto outras são espalhadas no citoplasma ou distribuídas ao redor dos cromossomos (Somerville, 1986 apud Hernandez-Verdun, 1991). A RNA-polimerase permanece ligada as RONS, bem como a nucleolina, proteínas Ag-NOR e DNA topoisomerase I. Isto indica que os componentes básicos da transcrição ribossomal permanecem juntos durante a mitose, mesmo na ausência de transcrição ribossomal. Estes fatos estão a favor da rápida ativação dos genes ribossomais no final-da telófase, porque somente a adição de um único fator de transcrição ou de um processo de defosforilação pode induzir a ligação destes genes (Hernandez-Verdun, 1991).

Nossos resultados estão de acordo com a persistência nucleolar durante o ciclo celular. Nas duas espécies de triatomíneos estudadas, *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*, até o final da diacinese é possível observar o nucléolo e a partir desta fase existem corpúsculos ou fragmentos nucleolares, mesmo nos estádios mais avançados da divisão, como anáfase e telófase. Estes corpúsculos ou fragmentos podem ser restos nucleolares que permanecem durante todo ciclo na célula. Assim, podemos inferir a possibilidade do nucléolo não desaparecer totalmente em triatomíneos, permanecendo sob forma de pequenos corpúsculos pré-nucleolares que irão se reunir de novo para formar o próximo ciclo nucleolar, que no caso da meiose só será completado se ocorrer fertilização e formação de um zigoto.

Mello (1995) encontrou corpos semelhantes a nucléolos associados ao cromossomos ou livres no citoplasma durante a mitose em células humanas MCF-10A concordando com outros exemplos encontrados na literatura que detectaram a persistência do nucléolo durante a mitose em várias células de mamíferos cultivadas *in vitro*.

A persistência de corpos como nucléolos durante a mitose dá suporte a idéia que o material nucleolar não se quebra completamente durante a



metáfase e anáfase, tendo um significado funcional ainda não muito claro. Pode ser hipotetizado que estes corpos carregam um primeiro ou novo material nucleolar ou represente uma fonte de RNA nucleolar para as células filhas enquanto o novo nucléolo está sendo organizado (Mello, 1995).

Após a desorganização, o material nucleolar pode comportar-se de duas ou três maneiras. Parte dele dissolve-se na prófase, no nucleocitoplasma comum, e retorna ao desenvolvimento do nucléolo na telófase; outra parte permanece associada com as RONS durante todo estágio da mitose; uma terceira parte, junta-se a bainha pericromossomal dos cromossomos condensados e move-se de volta para o núcleo com a descondensação dos cromossomos na telófase (Schwarzacher & Wachtler, 1993; González-García et al., 1995). A análise das duas espécies de *Panstrongylus* do presente trabalho corrobora a hipótese de dissolução de material nucleolar no nucleocitoplasma.

A reorganização nucleolar, conhecida como nucleogênese, começa no final da anáfase e início da telófase, quando o material nucleolar localizado sobre a superfície dos cromossomos começa a agregar-se em numerosos corpos pré-nucleolares. O retorno da transcrição de RNAr durante a telófase permite a fusão dos corpos pré-nucleolares sobre as RONS para formar o novo nucléolo funcionalmente maturo durante o início de G<sub>1</sub> (González-García et al., 1995).

O estudo das proteínas Ag-NOR durante a mitose em tecidos cancerosos de mama, em humanos, revelou importantes resultados: a desagregação do nucléolo profásico é simultânea com a segregação das estruturas arginofílicas que então tomam uma forma arredondada; durante a telófase numerosas estruturas esféricas arginofílicas de 0,2 µm de diâmetro aparecem antes da formação dos corpos pré-nucleolares (Fakan & Hernandez-Verdun, 1986).

Na meiose, os espermatócitos e oócitos na prófase I da meiose, apresentam várias vantagens para o estudo da relação do nucléolo e RONS. Durante a prófase meiótica, os cromossomos são bem individualizados e suas características morfológicas podem ser analisadas a microscopia de luz ou eletrônica. Eles são menos condensados do que os cromossomos metafásicos. Considerando que a transcrição é suspendida na metáfase das células somáticas, genes ribossomais são ativos durante o leptóteno, zigóteno e



estádios iniciais dos espermátocitos no paquíteno e durante o leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno de oócitos (Wachtler & Stahl, 1993).

Em oócito de codorna, a nucleogênese ocorre no paquíteno e os genes ribossomais estão localizados na parte eucromática de dois pares de microcromossomos. No diplóteno, o nucléolo é aumentado, tendo um aspecto reticular (Wachtler & Stahl, 1993).

Em oócito de rato, do zigóteno tardio para meados do paquíteno, novamente é formado o nucléolo. Os bivalentes portadores de regiões organizadoras nucleolares são ligados ao envelope nucleolar por sua heterocromatina centromérica. Adjacente a esta região, as RONS pareadas, correspondem a constrição secundária dos cromossomos mitóticos. Durante o diplóteno, o nucléolo (com a fusão dos dois nucléolos formados no paquíteno) aumenta de tamanho, tomando um aspecto reticular (Wachtler & Stahl, 1993).

Em oócito humano, no leptóteno, o nucléolo é composto de um grande centro fibrilar rodeado por uma camada fibrilar densa. Em alguns oócitos, três bivalentes são associados com o mesmo centro fibrilar. No estágio diplotênico o nucléolo é muito grande e forma um retículo fibrilo-granular (Wachtler & Stahl, 1993).

Em espermátocito humano, a nucleogênese ocorre no leptóteno. Um novo nucléolo é formado e associado com a RON de cromossomos acrocêntricos que estão ancorados na membrana interna do envelope nuclear. Durante o zigóteno, o nucléolo aumenta de tamanho e complexidade. Os bivalentes nucleolares mostram um típico arranjo em relação ao envelope nuclear: o telômero corresponde ao satélite citológico e está ligado a membrana interna do envelope nuclear (Wachtler & Stahl, 1993).

No presente trabalho, pelo estudo da espermatogênese dos triatomíneos *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri* podemos verificar que a nucleogênese ocorre no início da prófase I meiótica (estádio confuso), provavelmente no leptóteno, pois nesta fase a impregnação pela prata permite a observação de um grande corpo nucleolar. No diplóteno e diacinese é possível notar que o nucléolo está em íntima associação com os cromossomos sexuais, indicando assim a localização de pelo menos uma RON nos heterocromossomos. É possível observar ainda a ligação de um ou dois autossomos à região nucleolar em ambas as espécies. É interessante ressaltar



que nas espermatogônias é observada a presença de fragmentos nucleolares dispersos em alguns núcleos e corpúsculos nucleolares compactos em outros.

Estudos sobre uma variedade de espécies mostram que sítios de coloração pela Ag-NOR sobre cromossomos correspondem a sítios de genes ribossomais identificados pela hibridização *in situ*. Entretanto, em humanos, por exemplo, é muito raro que todos os 10 sítios de DNAr que são os cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21, 22 e que formam uma constrição secundária característica em cada um destes cromossomos na metáfase (Fakan & Hernandez-Verdun, 1986) sejam marcados com prata. Este fato deve ser por que alguns sítios contêm menos genes DNAr, abaixo do limiar de sensibilidade da impregnação pela prata (Sumner, 1990).

A quantidade de coloração pela prata dos núcleos interfásicos é maior do que aquela dos cromossomos metafásicos na mesma preparação, refletindo a supressão de transcrição na mitose (Sumner, 1990). Na meiose de *P. megistus* e *P. herrei* este padrão também é observado confirmando os dados encontrados durante a mitose.

Durante a espermatogênese de vertebrados, há uma substancial mudança na impregnação pela prata a qual é bem correlacionada com mudanças no padrão de síntese de RNA ribossomal (Hofgärtner et al., 1979; Schmid et al., 1982 apud Sumner, 1990); resultados similares têm sido reportados em oogênese de humanos (Hartung et al., 1979 apud Sumner, 1990). Estudos indicam que no desenvolvimento embrionário do anfíbio *Xenopus laevis*, a coloração Ag-NOR aparece ao mesmo tempo do início da síntese de RNAr embrionário (De Capoa et al., 1983 apud Sumner, 1990), também foi mostrada uma direta correlação entre quantidades de impregnação Ag-NOR de cromossomos humanos e síntese de RNAr 18S e 28S (Morton et al., 1983 apud Sumner, 1990).

Todas observações citadas indicam que a coloração pela prata é um indicador de atividade gênica ribossomal. Resultados experimentais para testar esta hipótese entretanto são ambíguos. Várias substâncias conhecidas como inibidoras de transcrição de genes ribossomais (actinomicina D, brometo de etidio e cardiopirina) não tiveram significativo efeito sobre coloração pela Ag-NOR embora o MPB, um inibidor de síntese de RNA, reduziu a coloração pela prata (Sumner, 1990). Porém, os experimentos com inibidores de transcrição podem somente indicar que a completa perda de coloração Ag-



NOR é um processo lento, por exemplo, é possível obter impregnação pela prata sobre cromossomos metafásicos, nos quais a transcrição é suprimida, então é claro que a marcação pela prata não desaparece imediatamente quando a transcrição cessa. Baldini e colaboradores (1988 apud Sumner, 1990) obtiveram um aumento na síntese de RNAr em células em cultura por tratamento com hormônio de crescimento, este aumento foi correlacionado com aumento de coloração pela prata. Ferraro e colaboradores (1988 apud Sumner, 1990) trataram células com 5-azacetidine, que é incorporada ao DNA na replicação, suprimindo a metilação do DNA e portanto, permitindo um maior nível de transcrição, e obteve um aumento na impregnação pela prata. Podemos dizer que a prata pode, entretanto, indicar o potencial para transcrição melhor do que a real ocorrência de transcrição (Medina et al., 1986).

O mecanismo de marcação pela prata tem se tornado um padrão nos métodos de bandamento, e a impregnação pela prata é parte essencial da caracterização cariotípica das espécies e pode provavelmente ser usada para demonstrar RONS em eucariotos. Esta coloração provou ser particularmente proveitosa nos estudos da atividade nucleolar durante a gametogênese. Na espermatogênese de mamíferos e outros vertebrados, a coloração das RONS ocorre na prófase meiótica até o final do paquíteno. A coloração é ausente na diacinese e também nas metáfases I e II, mas reaparece nas espermátides iniciais, indicando reativação pós-meiótica da transcrição do DNAr. A coloração pela prata desaparece novamente com o desenvolvimento e alongação das espermátides. Evidências também sugerem a presença de numerosos micronúcleolos, que foram interpretados como produto de amplificação dos genes ribossomais (Sumner, 1990).

Em humanos, o material Ag-positivo é observado na prófase I melhor do que na metáfase e anáfase e começa aumentar novamente em estádios tardios da telófase. Em meiose de machos, as RONS permanecem Ag-positivas até o paquíteno e em alguns estádios de espermátides (Sousa & Cavalheiro, 1994) nas metáfases I e II são Ag-negativas (Schwarzacher et al., 1978).

Schimid et al. (1982) estudaram o padrão de atividade da região organizadora nucleolar (RON) na espermatogênese de 10 espécies de vertebrados não mamíferos: aves (*Gallus domesticus*, *Columba livia*), reptilia (*Elaphe radiata*, *Emys orbicularis*), anfíbios (*Bufo bufo*, *Bufo mauritanicus*, *Triturus vulgaris*), osteídeos (*Salmo gairdneri*, *Carassius auratus*) condricteos



(*Scylliorhinus caniculus*) e uma espécie de cefalocordado (*Branchiostoma lanceolatum*) através da técnica de coloração pela prata. Todas as espécies apresentam um padrão muito similar de atividade da RON nos vários estádios da espermatogênese. E os dados obtidos estão em concordância com os resultados obtidos em mamíferos: a impregnação pela prata é detectável durante a prófase meiótica até o estágio de paquíteno, é completamente ausente nas metáfases I e II e novamente aparece nos estádios iniciais dos núcleos espermáticos. A espermatogênese em vertebrados não mamíferos, estudados por Schmid e mamíferos estudados por outros autores (Geremia et al., 1978; Monesi et al., 1978 apud Schmid et al., 1982) confirmam a ocorrência de reativação pós-meiótica dos genes para RNAr. Isto permite a conclusão que a síntese de RNAr, na gametogênese de machos segue o mesmo padrão em todos os vertebrados. Este padrão deve ser muito antigo em termos de evolução porque já é existente nos primitivos cefalocordados. A conservação evolucionária da reativação pós-meiótica da RON, dos cefalocordados até o homem, indica uma necessidade de RNA ribossomal pós-meioticamente sintetizado. Este RNAr novamente sintetizado pode ser um pré-requisito para a produção de RNAm, o qual deve ser transcrito em estádios iniciais do desenvolvimento da espermátide (Schmid et al., 1982).

No presente trabalho foram verificadas marcações arginofílicas nas espermátides iniciais em ambas as espécies de *Panstrongylus*, tais impregnações pelos íons prata desaparecem com o processo de elongação das espermátides, conforme a literatura descreve para uma série de vertebrados e alguns cefalocordados. Assim, nosso trabalho corrobora a hipótese da reativação pós-meiótica dos genes para RNA, permitindo que este fenômeno seja aplicado também aos invertebrados, desta forma reforçando a idéia que a síntese de RNA na gametogênese é um padrão muito antigo e possivelmente universal entre os organismos com reprodução sexuada.

Hofgartner et al. (1979) aplicaram a coloração pela prata em quatro espécies de mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus Norvegicus* e *Cavia cobaya*). Estas espécies exibiram um padrão de atividade muito similar na região organizadora nucleolar durante os vários estágios da espermatogênese. Precipitados de prata são detectáveis em espermatogonia em crescimento e até o estágio de paquíteno da prófase meiótica. Durante as metáfases I e II a impregnação desaparece completamente. Ocorre um



ressurgimento da impregnação nas espermatídes indicando reativação pós-meiótica das RONS e este processo persiste até o início da fase de alongação.

Nas espermatídes iniciais de *Oedipoda coerulescens*, estudos com microscopia eletrônica mostraram um nucléolo consistindo de uma série de material fibrogranular que, no curso da diferenciação, parece ser transformado em uma massa de material fibrilar e *clusters* de corpos granulares. Estes últimos corpos tornam-se menores até eles eventualmente desaparecerem enquanto o material fibroso persiste. Um comportamento similar a esse material nucleolar é observado pela microscopia de luz, no último estágio do desenvolvimento da espermatíde em *Schistocerca gregaria* (Rufas & Gosálvez, 1982).

Nos estádios pós-meióticos da espermatogênese de vertebrados o processo de diferenciação pode ser controlado de duas formas. A atividade gênica pré-meiótica pode realizar a síntese de moléculas estáveis de RNA no espermatócito, que são mais tarde traduzidas nos estágios pós-meióticos (controle diplóide). Há também a possibilidade de atividade gênica pós-meiótica nos núcleos espermáticos (controle haplóide). Estudos genéticos, citológicos e bioquímicos têm provido evidências para expressão gênica pré e pós-meiótica (Schmid et al., 1982).

A maior parte dos estudos sobre atividade gênica em espermatogênese de vertebrados está concentrada em mamíferos, e grande parte destes estão restritos a demonstração de síntese de RNA pré e pós-meiótico. Com técnicas de autorradiografia e microscopia eletrônica foi possível demonstrar não somente uma distinta síntese de RNA pré-meiótica, mas também uma pequena síntese pós-meiótica de RNA, a qual declina durante estádios mais tardios da diferenciação espermática (Schmid et al., 1982).

Não está definido se o RNA ribossomal sintetizado pós-meioticamente possui alguma função. A aplicação da impregnação pela prata, em anfíbios mutantes que apresentam somente uma RON, nas suas células diplóides, mostra que as espermatídes carentes de material prata positivo são capazes de desenvolverem-se em células maduras. As espermatídes não são, entretanto, funcionalmente isoladas umas das outras. Existem pontes citoplasmáticas intercelulares entre as espermatídes de muitos organismos (Phillips 1974 apud Hofgartner et al., 1979). Em testículos de mamíferos, por exemplo, mais de cem espermatídes podem estar interconectadas através de



pontes citoplasmáticas (Dym et al., 1971 apud Hofgartner et al., 1979). Conseqüentemente, é possível que a potencial letalidade por deficiência de RON nas espermatídes, seja superada pela cooperação metabólica. As espermatídes normais podem cooperar com a diferenciação das células vizinhas deficientes de RON, provendo suficiente RNAr. Estes fatos não excluem a possibilidade que o padrão de genes ativados nas espermatídes iniciais tenha importância para a diferenciação celular (Hofgartner et al., 1979).

Em *Drosophila melanogaster* os genes ribossômicos estão agrupados em 2 organizadores nucleolares: um localizado no meio da heterocromatina proximal do cromossomo X e outro no braço curto do Y, cromossomo que aparece completamente heterocromático na metáfase. No grupo repleta, *D. hydei*, apresenta três RONs, uma no braço heterocromático do cromossomo X e duas no Y, sendo uma no braço curto e uma próxima da ponta do braço longo. Um segundo padrão, que se refere a localização de genes ribossômicos no cromossomo X e no microcromossomo, foi encontrado em espécies do complexo mulleri do grupo acima citado, abrangendo *D. mulleri*, *D. arizonensis*, *D. aldrichi*, *D. navojoa*, *D. mojavensis* e *D. wheeleri*. A presença de cistrons DNAr nos microcromossomos de *Drosophila* tem uma implicação evolutiva mais geral, favorecendo a idéia de uma origem filogenética comum para o cromossomo X e o microcromossomo nesse organismo (Bicudo, 1984).

Em *Sciara coprophila*, o organizador nucleolar está localizado na região proximal do cromossomo X, formando o nucléolo principal. No final do quarto estágio do desenvolvimento, esse nucléolo fragmenta-se e forma um grande agregado de micronúcleolos. A região organizadora do nucléolo parece bastante ramificada, e os ramos abrangem grande parte da área nuclear. Em *Rhynchosciara*, a hibridização *in situ* mostrou que, além da RON no cromossomo X, há outra no cromossomo C. Em *Acheta domesticus*, nas oogônias e ovócitos deste inseto ocorre amplificação do DNAr localizado nos autossomos 6 e 11. O DNAr amplificado forma um corpúsculo que se separa dos cromossomos meióticos e posteriormente distribui-se em milhares de nucléolos envolvidos na síntese de RNAr. Corpúsculos de DNAr extracromossômicos semelhantes ao detectado em ovócitos de *Acheta* foram encontrados também em outros insetos como *Dytiscidae* (Kato 1961 apud Bicudo, 1984), *Chrysopa perla* (Gruzova et al., 1972 apud Bicudo, 1984).

Nas espécies de triatomíneos estudadas no presente trabalho, como em grande parte dos insetos, também foi detectada associação da atividade



nucleolar aos cromossomos sexuais. Nos estádios mais adiantados da prófase I da meiose fica evidente a impregnação pela prata na região dos heterocromossomos. Com relação aos autossomos, acreditamos que dois deles desempenhem função organizadora nucleolar por apresentarem-se ligados por pontes cromatinícas aos corpúsculos nucleolares. Como foi citado anteriormente, também, verificamos um grande número de corpúsculos nucleolares durante a espermatogênese. Estes corpúsculos aparecem após a desorganização do nucléolo na diacinese e permanecem até a telófase. Uma outra possibilidade para este fenômeno, além da hipótese de persistência nucleolar aventada previamente, pode ser a ocorrência de amplificação dos genes de DNAr.

Em Chrysomelidae e Curculionidae a produção secundária de material nucleolar em forma de fragmentos reunidos em cadeia é de comum ocorrência na prófase da espermatogênese destes besouros. Este fenômeno é mais freqüentemente acentuado naquelas espécies onde há um estágio confuso prolongado combinado com uma intensa atividade transcricional. Grilos, por exemplo, exibem arginofilia somente durante a prófase da meiose de machos (Virkki & Denton, 1987).

O complemento cromossômico do Heteroptera *Carlisis wahlbergi* é holocêntrico e a meiose é normal, exceto por um estágio confuso após o zigóteno. Durante os estádios iniciais da prófase I, incluindo o estágio confuso, observa-se a presença de dois nucléolos que também podem ser vistos como uma única massa nucleolar. Estes nucléolos decrescem de tamanho com a progressão da meiose, assemelham-se a um ponto e são completamente ausentes na metáfase I, embora um certo número de células apresentem remanescentes nucleolares. Um pequeno nucléolo é formado na telófase I sendo também observado na metáfase II (Fossey & Liebenberg, 1995).

A impregnação pela prata em meiose de machos de seis espécies de coleóptera do gênero *Cicindela*, com múltiplos cromossomos sexuais, revelou a presença de regiões organizadoras nucleolares ativas nas vesículas sexuais. Em uma das espécies, *Cicindela melancholica*, a hibridização *in situ* com sondas ribossomais mostraram que um dos três cromossomos X e o cromossomos Y apresentam genes RNAr. A coloração pela prata e a técnica de Fish mostraram que espécies relacionadas de *Cicindela paludosa*, com sistema sexual de machos X0, tem RONS localizadas em um par de autossomos. Em *Megacephala euphratica* estas técnicas indicam que as RONS



são localizadas nos três pares de autossomos, mas não no único cromossomo X dos machos. Em todas as espécies, o nucléolo pode ser observado do princípio da meiose até final do estágio confuso; desaparecendo no diplóteno e novamente reaparecendo nas espermatídes (Galián et al., 1995).

Durante a espermatogênese do Orthoptera *Schistocerca gregaria* no início da prófase da primeira divisão uma simples massa nucleolar é encontrada próxima ao cromossomo X. Esta massa é caracterizada pela presença de regiões: uma delas aparece como um precipitado de prata escuro enquanto a outra apresenta um precipitado de prata mais claro. Em estádios meióticos mais adiantados da prófase a massa nucleolar é separada em duas regiões de menor volume. Um dos nucléolos permanece próximo do cromossomo X, enquanto o outro se dispõe em outra parte dentro do núcleo. Da diacinese até a metáfase II precipitados de íons prata não são observados, porém nas espermatídes iniciais são detectadas marcações pela prata (Rufas & Gosálvez, 1982).

Em Coleoptera é sugerido que um par de cromossomos contendo RONS está presente. O grande cromossomo sexual de *Oedionychina* pode ser marcado por várias bandas Ag, nesta espécie estudos sugerem que uma grande quantidade de síntese de substâncias granulares ocorre durante o estágio confuso. No início do estágio confuso, ocorre uma complicação na estrutura nucleolar: o nucléolo original desintegra-se, e cadeias de fragmentos pré-nucleolares aparecem. Uma forte precipitação pela prata ajuda no estudo do núcleo confuso. A impressão é que somente alguns dos fragmentos originais tornam-se incorporados no nucléolo final e outros desintegram-se. Um ou dois nucléolos persistem até a metáfase I, onde tendem a permanecer junto aos cromossomos sexuais, embora eles possam flutuar entre os autossomos (Virkki & Denton, 1987).

Vários autores (Garcia De La Veja et al., 1982; Cella et al., 1983; Rufas et al., 1983 apud Virkki & Denton, 1987) têm observado a coincidência de bandas-C com coloração pela prata, provavelmente devido a heterocromatina associada ao nucléolo (Virkki & Denton, 1987). Esta coincidência de bandamento não é uma regra, por exemplo, em espécies de peixes Cyprinidae, os sítios contendo RONS não foram relacionados com as bandas-C. A coloração pela prata mostrou regiões Ag-NOR na posição terminal dos braços curtos do par de cromossomos médios submetacêntrico (S1) e no par menor



submetacêntrico (S2) regiões estas que não participavam da atividade organizadora nucleolar (Rodrigues & Collares-Pereira, 1996).

No nosso trabalho, a coincidência de banda-C e impregnação pela prata ocorreu nos cromossomos sexuais que permanecem heterocromáticos em grande parte do ciclo, porém com relação aos autossomos não foi possível estabelecer um padrão.

#### 4.3. BANDAMENTO-C

O bandamento-C nos triatomíneos, *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*, apresentou resultados que corroboram o padrão de bandamento na ordem Heteroptera e também alguns dados que estão presentes em outros organismos. Nestas duas espécies estudadas foram encontradas bandas intersticiais e terminais nos autossomos. Já os cromossomos sexuais apresentaram um padrão bastante interessante na medida que, em *P. herreri* esses comportaram-se de forma totalmente heterocromática durante toda espermatogênese e em *P. megistus* os cromossomos Xs alternavam entre bandamento positivo e negativo. Também foi possível, em parte deste trabalho, relacionar regiões banda-C positivas com região organizadora do nucléolo (RON), além da observação da presença de heterocromatina em estádios adiantados da diferenciação celular. Todos estes dados foram comparados com aqueles disponíveis na literatura. Na presente discussão será apresentado um panorama sobre o mecanismo do bandamento-C, classificação e origem da heterocromatina e em seguida os resultados obtidos serão discutidos mais especificamente.

A técnica de bandamento-C teve sua origem na clássica observação de Pardue & Gall (1970 apud Sumner, 1990) quando realizaram hibridização *in situ* do DNA satélite dos cromossomos de rato e encontraram uma forte coloração das regiões centroméricas (Babu & Verma, 1987; Sumner, 1990). A partir de então foram realizadas uma série de modificações do protocolo, culminando com o tradicional bandamento-C.

As estruturas consideradas pertencentes à categoria de bandas-C constituem-se de um tipo particular de cromatina denominada heterocromatina constitutiva (C=constitutiva) que, após o tratamento específico, cora-se mais intensamente com solução Giemsa (corante com alta afinidade ao DNA) que



as demais regiões cromossômicas. O procedimento para a manifestação dessas bandas envolve a remoção do DNA eucromático da cromatina em uma taxa mais elevada que a do DNA heterocromático. A extração do DNA está baseada na solubilização diferencial do DNA da eucromatina devido a ação dos diferentes tratamentos realizados seqüencialmente durante a técnica.

Sobre o mecanismo da banda-C, Mace e colaboradores (1972), usando antisoro específico para uma única fita de DNA, afirmaram que após tratamento de bandamento-C, o DNA foi denaturado, exceto nas bandas-C. Outras considerações indicaram que o bandamento-C era um mecanismo somente baseado na denaturação e seletivo anelamento do DNA. Porém, em alguns casos, parece que a denaturação do DNA cromossomal pelo tratamento alcalino é fortemente irreversível. Evidências adicionais para um mecanismo alternativo provém de observações que o bandamento-C pode ser produzido por reagentes cuja ação é essencialmente sobre proteínas, e não sobre o DNA. Parece portanto, que o mecanismo baseado no anelamento diferencial de DNA não pode explicar a produção do bandamento-C satisfatoriamente. Foi estabelecido que o bandamento-C envolve uma remoção preferencial do DNA nas regiões cromossômicas banda-C negativas (Sumner, 1990).

O processo químico responsável pela perda de DNA durante o bandamento-C foi descrito por Holmquist (1979 apud Sumner, 1990). Cada um dos três estádios investigados, tratamento ácido, tratamento alcalino e incubação em solução salina possui uma parte específica no processo. O tratamento preliminar com 0,2N de ácido clorídrico depurina o DNA, mas não quebra os sítios depurinados. Este tratamento suplementa a depuração que se iniciou durante a fixação com metanol-ácido acético (Sumner, 1982). A extração do DNA depurinado ocorre durante a incubação com solução salina. O tratamento alcalino quebra os sítios apurínicos, bem como denatura o DNA irreversivelmente. Como resultado DNA é reduzido a pequenos fragmentos os quais são mais facilmente perdidos dos cromossomos (Sumner, 1990).

Se o mecanismo de extração do DNA durante o processo de bandamento é aceito, resta a questão: Por que o DNA é extraído preferencialmente nas regiões cromossômicas banda-C negativas? Há três possibilidades cabíveis. Primeiro, o DNA banda-C é menos depurinado do que o restante. Segundo, o DNA banda-C é menos denaturado na solução alcalina. Terceiro, é que este DNA é menos extraído durante o tratamento a quente em solução salina (Sumner, 1990).





Outra possibilidade é que pode existir uma interação distintiva entre o DNA e as proteínas nas banda-C. Há evidências que certas proteínas da cromatina ligam-se mais fortemente ao DNA altamente repetido (Maio et al., 1969; Musich et al., 1977; Hsieh et al., 1979 apud Sumner, 1990) em mamíferos e *Drosophila*, mas não é conhecido se tais proteínas ocorrem em todas bandas-C. Burkholder e Weaver (1977 apud Sumner, 1990) mostraram que as bandas-C foram protegidas contra a digestão com DNase pela presença de proteínas não-histônicas e concluíram que a proteção foi fortemente devida a estreita ligação do DNA a proteínas não histônicas que restringem o acesso da enzima. Uma forte ligação do DNA a proteínas nas regiões de banda-C é um mecanismo plausível para a diferencial extração do DNA dos cromossomos.

Em resumo, o diferencial anelamento do DNA denaturado não deve ser parte do mecanismo de bandamento-C. Importante característica deste processo parece ser o progressivo ataque dos reagentes sobre a molécula de DNA que conduzem a extração deste e a ligação do DNA a proteínas nas bandas-C.

A heterocromatina constitutiva não pode ser unicamente caracterizada por qualquer composição particular de bases, embora o DNA de composição de bases altamente repetidas é mais comumente encontrado na heterocromatina. Em termos gerais existe uma boa relação entre DNA altamente repetido, regiões banda-C positivas e heterocromatina constitutiva no genoma (Verma, 1988).

Segundo o Verma, recentes estudos com uso de sondas satélites e de enzimas de restrição indicaram que no interior do cromossomo, a distribuição de heterocromatina constitutiva definida pela banda-C e de DNA altamente repetido definido pela hibridização *in situ*, é freqüentemente embora nem sempre, coincidente. Isto indica que a heterocromatina não é constituída unicamente de DNA altamente repetido e que este não está localizado exclusivamente nas regiões heterocromáticas constitutivas. Em humanos, por exemplo, o satélite ou outro tipo de DNA altamente repetido não é o único ou mesmo o mais comum componente de algumas categorias de heterocromatina constitutiva, pois a banda-C indica em média 13% de heterocromatina constitutiva genômica (Verma, 1988) entretanto, somente metade destes sítios contêm seqüências satélites. Em hamster chinês são observadas bandas-C no braço longo do cromossomo X, no cromossomo Y inteiro e na região centromérica do cromossomo 10, porém estas regiões não contêm uma alta



proporção de DNA altamente repetido (Arrighi et al., 1974 apud Sumner, 1990).

Alguns exemplos de tipos de DNA encontrados na banda-C podem ser citados. Em monocotiledôneas: *Scilla siberica* - G+C satélite (Timmis et al., 1975 apud Sumner, 1990), *Secale cereale*-DNA satélite (Appels et al., 1978 apud Sumner, 1990). Em Insecta (Orthoptera): *Atractomorpha* - satélite-1 (Miklos et al., 1976 apud Sumner, 1990). Em Insecta (Diptera) - *Drosophila melanogaster* - DNA altamente repetido (Jones et al., 1970 apud Sumner, 1990), *D. nasuta* - Satélite rico em A-T (Ranganath et al., 1982 apud Sumner, 1990). Em Amphibia: *Plethodon cinereus* -Satélite rico em G+C (MacGregor et al., 1971 apud Sumner, 1990). Em Mammalia (Primata): *Saimiri sciureus* - Satélite rico em A+T (Lau et al., 1977 apud Sumner, 1990). Em Mammalia (Rodentia): *Mus musculus* - satélite rico em A+T (Pardue et al., 1970 apud Sumner, 1990), *Peromyscus eremicus* - satélite rico em G+C (Hazen et al., 1977 apud Sumner, 1990). Em Mammalia (Artiodactyla) *Bos taurus*, *Capra hircus*, *Ovis aries* - Satélite rico em G+C (Kurnit et al., 1978 apud Sumner, 1990).

A cromatina condensada é transcricionalmente inativa. Uma região cromossômica pode, entretanto, ser inativa por duas razões. Primeiro, porque ela está em um estado reprimido, pelo fato de possuir DNA codificador que está temporariamente e reversivelmente inativado. Segundo, por que ela é composta de DNA não codificador e assim permanece incapaz de transcrever. Em relação a estas formas de inatividade, é possível distinguir três diferentes espécies de cromatina no interior do núcleo interfásico (Verma, 1988).

A primeira forma de cromatina é a eucromatina condensada tecido-específica. Para entendermos este tipo de cromatina devemos considerar que no desenvolvimento animal, embora vários tipos celulares contenham as mesmas seqüências de DNA codificador, somente parte da informação é expressada. Neste tipo de repressão, a condensação cromossômica envolve uma fração da cromatina inativada especificamente dentro de uma dada geração celular. É importante reconhecer que nem toda a cromatina dispersa adota automaticamente um estado ativo, portanto, não podemos simplesmente igualar eucromatina com cromatina transcricionalmente ativa. Embora a descondensação da eucromatina é certamente um pré-requisito para a atividade gênica, ela não é necessariamente suficiente para o início da transcrição (Verma, 1988).



A segunda forma de cromatina é a eucromatina facultativamente heterocromatinizada ou heterocromatinização facultativa da eucromatina. Esta forma caracteriza a repressão da eucromatina em segmentos cromossômicos, cromossomos inteiros e algumas vezes em conjuntos cromossômicos. A eucromatina facultativamente heterocromatinizada é inativada e condensada durante o início do desenvolvimento e por isso permanece inativa durante muitas gerações celulares nos tecidos somáticos. Está também associada a um processo de *imprinting* cromossômico, no qual somente um dos homólogos é reprimido, como no exemplo clássico do único X reprimido nas fêmeas de mamíferos (XX) ou a um conjunto cromossômico, como no caso da repressão do conjunto paterno de coccídeos machos. O material que é heterocromatinizado tem um complemento normal de genes e estes podem ser ativados nas gerações sucessivas (Verma, 1988).

A terceira forma de cromatina é a heterocromatina constitutiva. Esta cromatina difere da eucromatina pela composição predominante de DNA não codificador e altamente repetido (Lewin, 1994). Ela está assim permanentemente sem transcrever e não somente reprimida, representando uma classe estrutural distinta da cromatina melhor do que um estado da cromatina com nos casos de eucromatina condensada tecido-específica e eucromatina facultativamente heterocromatinizada. De acordo com Verma, (1988) não existem duas classes de heterocromatina, constitutiva e facultativa, como ainda é comumente denominado. A heterocromatinização facultativa da eucromatina, em princípio, está mais relacionada com a condensação tecido-específica da eucromatina, embora ocorra em uma escala mais extensiva dentro de um indivíduo. As regiões facultativamente heterocromatinizados não apresentam banda-C, conseqüentemente, com o bandamento-C é possível corar diferencialmente a heterocromatina constitutiva.

Na literatura existem informações indicando que nem todos animais exibem uma correspondência entre bandas-C e heterocromatina. No gafanhoto *Cryptobothrus chrysophorus* vários pares de cromossomos possuem blocos terminais de heterocromatina, mas o bloco heterocromático M5 nunca apresenta banda-C (Sumner, 1990).

Nagl e colaboradores (1985 apud Sumner, 1990) observaram que o DNA repetido pode ser transcrito na planta *Vicia faba*, enquanto White (1987 apud Sumner, 1990) encontrou que heterocromatina constitutiva pode ser transcrita em *Microtus agrestis*. Em *Triturus cristatus* carniflex tem sido verificado



transcrição no DNA satélite nos cromossomos plumosos (Sumner, 1982). Esta informação é particularmente interessante, pois sugere que a função do DNA banda-C positivo ocorre mais preferencialmente na meiose do que nas células somáticas (Sumner, 1990). Desta forma deve ser colocado que a concentração de genes é menor na heterocromatina que na eucromatina e que o fenômeno de transcrição ocorre em taxa menor na heterocromatina em relação a eucromatina. Porém, não é possível afirmar que não ocorre transcrição na heterocromatina (Sumner, 1982).

Em *Drosophila*, genes requeridos para viabilidade e fertilidade (fatores de fertilidade do cromossomo Y) estão na heterocromatina (Mello, 1977). A remoção de alguns genes de sua usual localização heterocromática impede sua expressão normal. Do mesmo modo, genes que ocupam uma posição eucromática são reprimidos quando colocados na heterocromatina. A variável inativação de ambas classes de genes que ocorre quando eucromatina e heterocromatina são anormalmente justapostas é chamada variegação por efeito de posição. A função gênica pode requerer ambiente cromatínico particular ou posição nuclear provida da localização cromossômica normal (Cook & Karpen, 1994).

Um motivo para o estudo do bandamento-C durante a espermatogênese é proporcionado pelas evidências que sugerem que a função da heterocromatina deve estar relacionada as células da linhagem germinativa e não as células somáticas. Em cromossomos politênicos de Díptera, a heterocromatina é usualmente sub-replicada, sugerindo que não é importante nestes cromossomos (Sumner, 1990). Em uma variedade de organismos a heterocromatina é completamente eliminada nas células somáticas, mas sempre é retida em células da linhagem germinativa. A função da heterocromatina na linha germinativa que é a mais claramente estabelecida é o efeito na formação do quiasma na meiose. *Crossing-over* raramente ocorre na própria heterocromatina (John & Miklos, 1979; Sumner, 1990), mas talvez o grande significado é o fato dos blocos heterocromáticos afetarem a formação de *crossing* nos segmentos cromossômicos eucromáticos adjacentes. Em uma espécie de gafanhoto australiano a frequência de quiasma é claramente correlacionada com a quantidade de heterocromatina, uma grande quantidade de heterocromatina causa menor número de quiasmas (Milkos, 1976 apud Sumner, 1990). Não somente a frequência dos *crossing* é alterada, mas sua posição, desde que a heterocromatina telomérica causa uma substancial



redução na formação do quiasma na eucromatina adjacente. Em espécies de *Allium*, os quiasmas são encontrados preferencialmente adjacentes as bandas-C, mas onde as bandas-C são ausentes, as regiões de quiasmas são menos localizadas (Sumner, 1990).

Com respeito a evolução das seqüências heterocromáticas podemos citar que o heteromorfismo em humanos bem como, em outras espécies, representa variações na quantidade e diversidade de seqüências de heterocromatina. Dois diferentes processos fundamentais são requeridos para tais variações. Acredita-se que a divergência ocorra por mutações de pequenas seqüências repetidas. Esta é seguida por amplificação e origina formas mais complexas (Babu et al., 1987; Lewin, 1994). Tais colocações estão de acordo com a forma de evolução dos DNAs satélites. O princípio geral desta evolução é que, de tempos em tempos, um grupo de unidades repetidas é inesperadamente amplificado para gerar um grande número de cópias idênticas em *tandem*. Este evento é chamado replicação saltatória. Então, as cópias divergem em seqüência com mutações acumuladas. Em momento subsequente, um grupo destas cópias é levado para outra replicação saltatória. A extensão da divergência entre cópias amplificadas em cada salto dependerá do período que tenha passado desde a última replicação saltatória identificada no satélite. Os satélites podem desenvolver-se por uma série destas *replicações saltatórias*, alternada com acumulação de mutações (Lewin, 1994).

Várias funções têm sido propostas para o DNA satélite e heterocromatina constitutiva. Estas funções incluem reconhecimento de centrômeros homólogos, pareamento meiótico, proteção estrutural para regiões tais como centrômeros e genes ribossomais e regulação do *crossing-over*. Está bem estabelecido que blocos de heterocromatina afetam o *crossing-over* na eucromatina, não somente podendo afetar a freqüência de quiasmas mas também sua posição (Sumner, 1982).

Freqüentemente os blocos de heterocromatina constitutiva ocupam a mesma posição em cada cromossomo de um dado cariótipo. Na maioria das espécies esses blocos situam-se no centrômero ou imediatamente ao lado, como por exemplo no homem, no esquistossomo, na drosófila, na graviola e outros. Menos freqüentemente, a heterocromatina é preferencialmente ou exclusivamente telomérica, como na cebola e no alho e pode ocupar diferentes posições do cromossomo como no trigo e no centeio.



O estudo do bandamento cromossômico em anfíbios da família Bufonidae indicou a presença de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas de todos os cromossomos. Em algumas metáfases, os cromossomos pertencentes ao par 7 apresentaram uma banda-C intersticial próximas às regiões de constrição secundária (Kasahara et al., 1996). Em Hymenoptera do gênero *Microstigmus* (*M. arlei* e *M. luederwaldti*), a heterocromatina em sua maior parte é restrita a região pericentromérica (Costa et al., 1993). No Díptera *Muscina stabulans*, as bandas-C foram localizadas na região centromérica de todos os cromossomos e marcações intersticiais apareceram somente no braço curto do cromossomo 2 (Parise et al., 1996).

No Orthoptera *Trimerotropis pallidipennis*, os cromossomos apresentaram bandas teloméricas, centroméricas e principalmente bandas intersticiais. Sendo estas desde somente uma nos cromossomos menores até seis nos membros maiores do complemento e os cromossomos supranumerários apresentaram duas bandas intersticiais (Sanchez & Confalonieri, 1993). Também em Orthoptera as espécies do gênero *Montana* (*M. montana*, *M. evermanni* e *M. alexandra* e *M. daghestanica*), as bandas-C pericentroméricas foram uniformemente presentes em todos os autossomos e bandas distais e intersticiais nos cromossomos X foram também verificadas (Warchalowska-Sliwa & Bugrov, 1994).

x Na maior parte dos Heteropteros a banda-C+ tem sido descrita como geralmente localizada nas posições teloméricas e subteloméricas. Bandas-C+ intersticiais algumas vezes tem sido também descritas (Papeschi, 1995). No presente trabalho as espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri* apresentaram padrão de bandamento-C de acordo com os dados da literatura descritos para Heteroptera. Em *P. megistus* foram observadas bandas intersticiais ao longo dos autossomos e em *P. herreri* as regiões heterocromáticas estavam preferencialmente localizadas nas regiões terminais desses cromossomos. Estes dados, pelo menos em *P. herreri*, corroboram a hipótese de que nos cromossomos holocêntricos a heterocromatina-C é preferencialmente localizada próxima aos telômeros (Muramoto, 1980; Papeschi, 1988; Panzera, 1992; Camacho et al., 1985).

x A caracterização e identificação dos cromossomos de espécies heterópteras são dificultadas pela carência de diferenciação morfológica. No bandamento-C realizado nos Heteroptera *Molipteryx fuliginosa*, *Spilostethus equestris*, *Carbula humerigera* e *Dolycoris becarum*, basicamente, os



cromossomos foram arranjados em grupos com respeito ao seu padrão de banda-C. No primeiro grupo estão incluídos os cromossomos de 1 a 4 e 7 a 8, e as bandas-C ocorrem em ambas extremidades de cada cromossomo. O segundo grupo é constituído pelos cromossomos 5 e 6 e as bandas-C ocorrem na região centromérica do cromossomo 5 e terminal do cromossomo 6. O terceiro grupo compreende os cromossomos 10 e X e não apresentam nenhum tipo de banda-C. Desta forma, as bandas-C nestes Heteroptera foram preferencialmente localizadas nas extremidades cromossômicas (Muramoto, 1980). Estes dados são similares aqueles obtidos em *P. herreri* no presente trabalho.

O estudo do bandamento-C em algumas espécies de heterópteros Belostomatidae (*Belostoma bifoveolatum*, *B. dentatum*, *B. elegans* e *B. martini*) revelou a presença de bandas-C com localização telomérica em todas as espécies, com cromossomos sexuais geralmente exibindo bandas teloméricas ou sendo totalmente heterocromáticos. O padrão de bandamento observado mostrou uma certa regularidade pelo fato da maioria das bandas localizarem-se nas extremidades cromossômicas. Como já foi citado e exemplificado acima, a heterocromatina-C+ nos heterópteros tende a ser localizada nas posições teloméricas. Este padrão pode ser relacionado a natureza holocinética destes cromossomos (Papeschi, 1991).

No grupo Odonata, espécies pertencentes às famílias Macrodiplacidae, Coenagrionidae e Libellulidae, apresentaram uma pequena quantidade de heterocromatina. As bandas-C, se presentes, são localizadas exclusivamente nas extremidades cromossômicas, exceto no cromossomo X em que muitas espécies apresentam heterocromatina C+ em toda extensão. Este padrão de distribuição tem sido relatado para insetos heterópteros e homópteros (Prasad & Thomas, 1992; Muramoto, 1980). Do ponto de vista de distribuição de banda-C: odonatas, homópteros e heterópteros representam material único, pois estes grupos possuem centrômero difuso e talvez a localização da banda-C esteja relacionada ao tipo de centrômero destes grupos (Prasad & Thomas, 1992).

O bandamento-C foi estudado em cromossomos monocêntricos de *Vicia faba* e cromossomos policêntricos de *Luzula purpurea* e *L. multiflora*. As regiões C-positivas exibiram uma restrita distribuição em *V. faba* e foram localizadas próximas aos centrômeros dos cromossomos. Em *L. purpurea* e *L. multiflora*, as bandas-C foram mais numerosas e completamente distribuídas



ao longo do núcleo e cromossomos. Nestas duas espécies, alguns cromossomos apresentaram blocos heterocromáticos nas regiões terminais dos cromossomos (Ray & Venketeswaran, 1978). Neste estudo, os autores encontraram ambas distribuições, ou seja, cromossomos policêntricos (holocêntricos) com heterocromatina intersticial e terminal, estes resultados são bastante semelhantes aos observados no estudo de *P. megistus* e *P. herreri* do presente trabalho.

Em cromossomos holocêntricos de *Luzula flacida* (Juncaceae), foi demonstrado que os blocos de heterocromatina constitutiva são teloméricos ou intersticiais e que o estudo do padrão de bandamento é mais efetivo nos estádios de prófase, pois os cromossomos metafásicos são muito pequenos e compactados, raramente apresentando bandamento (Collet & Westerman, 1984). Musich (1973 apud Collet & Westerman, 1984) observou a presença de heterocromatina constitutiva intersticial e telomérica na prófase meiótica do inseto heteróptero *Oncopeltus fasciatus*, entretanto estas bandas-C não foram discerníveis nos cromossomos metafásicos fortemente corados. Estudos futuros de espécies animais e vegetais com cromossomos holocêntricos devem concentrar-se nos estádios de paquíteno para obter o verdadeiro retrato da presença da distribuição da heterocromatina constitutiva (Collet & Westerman, 1984).

As observações da heterocromatina-C+ do presente trabalho também foram feitas em estádios da prófase I da meiose, preferencialmente no paquíteno, pois os cromossomos metafásicos eram bastante condensados e dificultavam o estudo do padrão de bandamento. Atualmente a análise do padrão de bandamento durante a prófase meiótica é quase uma tendência geral para os organismos com cromossomos holocinéticos devido ao seu alto grau de condensação em fases mais avançadas do ciclo celular.

Os cromossomos dos heterópteros *Belostoma elegans*, *B. micantulum* e *B. oxyurum*, quando analisados pela técnica de bandamento-C, apresentaram bandas teloméricas e nenhuma banda intersticial foi encontrada. Em *Belostoma elegans*, o cromossomo Y é C- negativo enquanto os cromossomos X, assim como, os autossomos, apresentam bandas teloméricas. Em *B. micantulum* e *B. oxyurum*, o cromossomo Y é completamente heterocromático e os cromossomos X apresentam o mesmo padrão de bandas dos autossomos. Neste caso, as bandas-C também foram observadas em estádios anteriores a



metáfase I por causa do intenso grau de condensação cromatínica durante a metáfase (Papeschi, 1988).

No Orthoptera *Peruvia nigromarginata*, a banda-C revelou a presença de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos, incluindo o cromossomo X. Entretanto o cromossomo X, é completamente heteropicnótico na prófase I e na metáfase apresenta regiões banda-C positiva somente na região pericentromérica, sugerindo que a região banda-C positiva possa incluir heterocromatina constitutiva ou facultativa (neste caso devemos considerar heterocromatina facultativamente heterocromatinizada pela nova classificação) (Vendrame & Cella, 1993).

Em nosso trabalho, os cromossomos sexuais também apresentaram características bastante peculiares em relação ao padrão de bandamento. Em *P. herreri*, os cromossomos sexuais apresentaram-se heterocromáticos durante toda espermatogênese enquanto em *P. megistus*, somente o cromossomo Y manteve-se heterocromático. Os cromossomos X de *P. megistus* no estágio diplóteno-diacinese, em alguns núcleos, eram completamente heterocromáticos enquanto em outros eram bandas-C negativos. O comportamento semelhante de ambos cromossomos X em resposta à técnica de bandamento-C corrobora a hipótese da origem dos vários cromossomos X em Heteroptera a partir da fragmentação de um único X, pois a cromatina dos múltiplos X apresenta um comportamento bastante similar. Estes dados também estão de acordo com o fato, já comentado em detalhes no princípio, de que nem sempre as regiões C+ são necessariamente formadas por heterocromatina constitutiva.

Os cromossomos sexuais do heteróptero *Belostoma oxyurum* estão sempre associados com o nucléolo, tanto na mitose, como na meiose (Papeschi, 1995). Nesta espécie, o bandamento-C tem revelado que no diplóteno o cromossomo X apresenta banda-C positiva na região telomérica, enquanto o cromossomo Y é suavemente corado em toda sua extensão. Na espécie *B. oxyurum*, em contraste com as bandas-C autossomais que são sempre positivas, a intensidade de banda-C nos cromossomos sexuais varia durante a meiose. O suave bandamento de um dos telômeros do cromossomo X e o bandamento brando do cromossomo Y, do diplóteno ao início da diacinese, desenvolvem-se em bandas normais nos estádios tardios da diacinese. Cardoso e Dutra (1979 apud Papeschi, 1995) fizeram observações similares nos cromossomos meióticos de três espécies de Orthoptera, nas



quais a fraca banda-C torna-se uma banda positiva no diplóteno. De acordo com estes autores, a coloração fracamente positiva deve ser resultante de diferenças no grau de empacotamento da cromatina, mais do que consequência da presença de DNA pouco repetido (Papeschi, 1995). Possivelmente esta explicação também aplica-se ao comportamento do bandamento-C no triatomíneo *P. megistus* no presente trabalho.

Em *Pseudococcus obscurus* (Coccideos) os cromossomos supranumerários variam de zero a seis em populações naturais. Estes cromossomos são heterocromáticos em alguns tecidos de fêmeas e nos machos comportam-se como membros típicos da heterocromatina até a espermatogênese. Neste estágio, estes cromossomos repentinamente tornam-se menos condensados do que os cromossomos eucromáticos e comportam-se desta forma durante a meiose (Brown & Nur, 1964).

Analizando, o exemplo de nosso trabalho juntamente com os demais relacionados acima, podemos verificar que durante o ciclo celular as variações encontradas nas respostas da heterocromatina ao bandamento-C são fatores constantemente presentes nos vários organismos analisados. Assim, não podemos afirmar que a técnica de bandamento-C é unicamente específica para detecção da heterocromatina constitutiva, pois algumas vezes é bem provável que a heterocromatina observada seja a facultativamente heterocromatinizada.

Em *Triatoma infestans* ( $2n=22$ ) três grandes pares de autossomos formam um cromocentro heteropicnótico durante a prófase meiótica. Solari (1979) demonstrou que este cromocentro é formado por blocos de heterocromatina dos três pares de cromossomos e dos cromossomos sexuais. Dois destes pares de autossomos contém dois blocos de heterocromatina-C localizados próximos as regiões cromossômicas terminais, enquanto o terceiro par exibe um único bloco de heterocromatina terminal. O cromossomo Y mostrou um grande bloco C-positivo, enquanto, no cromossomo X não foi detectada banda-C (Panzera et al., 1992; Pérez, 1997). Os outros cromossomos do complemento apresentaram alguns blocos semelhantes a bandas em regiões intersticiais ou terminais. Hirai et al. (1991) estudando o heteromorfismo da heterocromatina constitutiva em *T. infestans*, também encontrou marcações C-positivas nas extremidades cromossômicas.



Nas espécies de triatomíneos analisadas no presente trabalho também foi observada a presença de cromocentro na prófase I meiótica mas, diferentemente do gênero *Triatoma*, este era constituído somente pelos cromossomos sexuais. Todavia, o cromocentro tanto, em *Panstrongylus* como em *Triatoma*, corresponde a regiões de heterocromatina constitutiva. Nos núcleos poliplóides das células da parede do túbulo testicular das duas espécies de *Panstrongylus* estudadas foi possível observar a presença de um único cromocentro em cada núcleo mas, como estes núcleos permanecem em intérfase, não foi possível relacionar a presença do cromocentro a qualquer cromossomo.

Em Insecta Phasmatodea, a espécie *Bacillus rossius*, apresentou bandamento-C em seis pares de cromossomos com blocos heterocromáticos pericentroméricos, outras regiões banda-C+ foram encontradas nas regiões dos satélites e correspondiam a localização da NOR (Manaresi et al., 1991). No heteroptera *Nezera viridula*, a técnica de bandamento-C e a impregnação pela prata revelaram que a heterocromatina-C está presente em grande parte do cromossomo Y e na região organizadora do nucléolo (RON) no cromossomo A1. Além disto, um telômero de cada autossomo apresenta uma leve banda-C (Camacho et al., 1985).

Em *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri*, estudados no presente trabalho, foi encontrada uma relação entre regiões organizadora do nucléolo, observadas com a impregnação pela prata, e as regiões heterocromáticas detectadas no bandamento-C. Os cromossomos que apresentaram coincidência destas regiões foram os sexuais.

É importante citar, que nas duas espécies de heterópteros analisadas neste trabalho, no princípio da diferenciação celular as espermátides apresentam pontos heterocromáticos marcados pelo bandamento-C, tais marcações provavelmente devem estar relacionadas àquelas obtidas em espermátides iniciais no processo de impregnação com prata. Esta heterocromatina, no caso destes triatomíneos, relacionada com a NOR, segundo a literatura, é um reflexo de reativação pós-meiótica da transcrição de genes ribossomais. Na espermatogênese de ratos também são observados pontos heterocromáticos em espermátides iniciais também presentes após o processo de coloração pela prata (Czaker, 1987).



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

No presente trabalho observamos que *P. megistus* possui preferencialmente bandas intersticiais ao longo dos autossomos e os cromossomos sexuais tem um comportamento bastante peculiar, isto é, o Y permanece heterocromático durante a espermatogênese e os cromossomos X apresentam ocasiões em que não se comportam de maneira heterocromática. Já em *P. herreri*, a heterocromatina foi localizada nas regiões terminais cromossômicas e os cromossomos sexuais mantiveram-se heterocromáticos por todo o ciclo meiótico. Como veremos a seguir é bastante comum encontrarmos semelhanças e diferenças com relação ao padrão de distribuição das regiões heterocromáticas entre as mais diversas espécies.

A análise de ortópteros da família Romaleidae com relação ao bandamento-C revelou a presença de heterocromatina-C nas regiões pericentroméricas, teloméricas e intersticiais (Souza & Kido, 1995). No estudo de Orthoptera do gênero *Tettigonia* foram observadas bandas-C nas regiões paracentroméricas de todos autossomos e no cromossomo X (Warchalowska-Sliwa & Bugrov, 1994). No Orthoptera *Isophya brevipennis*, o padrão C+ na espermatogênese revelou bandas-C nas regiões paracentroméricas, intersticiais e distais (Warchalowska-Sliwa & Maryanska-Nadachowska, 1992).

O padrão de banda-C dos coleópteros *Amara aenea*, *Calathus erratus* e *Harpalus picipennis* indica que a heterocromatina-C é principalmente localizada nas proximidades dos telômeros (Rozek, 1995). No coleóptera *Harpalus affinis* o bandamento-C de todos os autossomos têm heterocromatina pericentromérica e também bandas-C intercalares nos braços de vários cromossomos. Os cromossomos 18 e X são em sua maior parte heterocromáticos (Rozek & Nadachowska, 1991).

Em *Triatoma platensis*, três ou quatro pares de autossomos apresentam blocos heterocromáticos terminais localizados em uma ou em ambas extremidades cromossômicas. O cromossomo Y é totalmente heterocromático enquanto X apresenta uma região C+ e outra C- (Panzera et al., 1995).

Perez e colaboradores (1992) analisaram o padrão de banda-C em algumas espécies de triatomíneos. Em *Rhodnius pictipes*, após a técnica de





bandamento-C somente o cromossomo Y apresentava-se heterocromático e os autossomos não possuíam evidência de blocos. Em *Rhodnius nasutus* o cromossomo Y era heterocromático e os autossomos tinham blocos C+ terminais. Em *Rhodnius robustus*, o cromossomo Y também era heterocromático. Com relação a *Triatoma pseudomaculata* o heterocromossomo X apresentava-se totalmente heterocromático e também foram observados alguns autossomos com blocos heterocromáticos terminais. Em *Triatoma matogrossensis* o maior dos cromossomos sexuais (X) era heterocromático e os autossomos não apresentaram bandas.

O bandamento pode ser usado para o estudo da evolução cromossômica de várias formas, como por exemplo, a diferenciação entre espécies relacionadas. Diferenças em quantidade, posição e tipo de heterocromatina são extremamente comuns (King et al., 1980 apud Warchalowska-Sliwa & Bugrov, 1994). Espécies relacionadas podem diferir não somente na quantidade de heterocromatina de seu genoma mas, também no número de bandas, localização e suas propriedades de coloração (Warchalowska-Sliwa & Bugrov, 1994).

Finalmente, é importante ressaltar, que o bandamento pode corroborar o conhecimento evolutivo permitindo a detecção de alterações na evolução do cariótipo. Os padrões de bandas também podem ser úteis para dedução de relações filogenéticas se comparados com estudos de anatomia comparativa e polimorfismo proteico.

#### 4.4. Bandamento com Endonucleases de Restrição

O bandamento-C pode ser produzido por digestão dos cromossomos com DNase sob condições apropriadas (Alfi et al., 1973; Kato et al., 1974 apud Sumner, 1990). Usando um tratamento ténue, o padrão de banda-G pode também ser produzido em cromossomos de mamíferos pela digestão com a DNase I (Burkholder et al., 1977 apud Sumner, 1990). Estes métodos não representaram procedimentos práticos para demonstrar os diferentes tipos de bandas, mas foram todavia importantes para mostrar a sensibilidade diferencial das diferentes regiões cromossômicas às nucleases, provavelmente devido a diferenças na interação DNA-proteína (Burkholder et al., 1975 apud Sumner, 1990).



A DNase é denominada classe I de enzimas de restrição pois reconhece uma sequência específica de nucleotídeos mas cliva sítios inespecíficos distante da sequência de reconhecimento (Roberts, 1976).

O estudo da hipersensibilidade à DNase tem se tornado um importante instrumento no estudo da organização cromossômica. A hipersensibilidade à DNase foi primeiro descrita por Weintraub & Groudine (1976 apud Sumner, 1990) com a demonstração que certos genes em tecidos nos quais eles foram ativos eram particularmente susceptíveis a digestão pela DNase I, enquanto os mesmos genes nos tecidos onde estes não foram ativos eram inacessíveis a digestão. Assim a hipersensibilidade à DNase I indica potencial para transcrição (Sumner, 1990).

O tipo II de endonucleases de restrição são enzimas que cortam o DNA em sequências específicas de nucleotídeos, geralmente 4 a 6 bases. Esta sequência é geralmente palindrômica. A primeira aplicação de endonucleases de restrição para cromossomos metafásicos foi realizada por Lima-de-Faria e colaboradores (1980 apud Sumner, 1990). Desde então o bandamento por endonucleases de restrição tornou-se amplamente utilizado, e tem sido capaz de diferenciar diferentes classes de heterocromatina (Sumner, 1990).

Enzimas de restrição são empregadas para produzir bandamento em uma ampla variedade de organismos, cromossomos de certas espécies de insetos, vertebrados e algumas espécies de plantas. Por exemplo, no Orthoptera, *Arcyptera tornosi* são usadas as enzimas *Alu* I, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I, no díptera, *Aedes albopictus*, as enzimas *Hha* I, *Hin* PI, *Hpa* II, *Msp* I, *Mbo* I, *Taq* I, em peixe, *Salmo gairdneri*, as enzimas *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Mbo* I, *Pvu* II, no anfíbio, *Anura Triturus alpestris*, *Eco* RI, *Hae* III, *Hind* III, *Hpa* II, *Msp* I, na ave, *Gallus domesticus*, *Eco* RI, *Hae* III, *Hind* III, *Hpa* II, *Msp* I e no vegetal, *Vicia faba*, *Alu* I, *Bam* HI, *Mbo* I. Desde que nenhum destes organismos possuiu banda-G em seus cromossomos, somente bandas heterocromáticas são demonstradas. Embora poucas enzimas falhem em produzir algum padrão de banda, a maioria produz padrões semelhantes ao bandamento-C e cada enzima revela subconjuntos de bandas característicos (Sumner, 1990).

Enzimas de restrição clivam o DNA em sequências específicas de reconhecimento, produzindo um padrão de bandas. A extensão em que o DNA é extraído das regiões cromossomais depende da frequência e acessibilidade das sequências de reconhecimento naquela região. Regiões resistentes a



digestão ou contendo poucos sítios acessíveis não apresentam significativo padrão de digestão e muitas vezes exibem um padrão bastante semelhante ao do bandamento-C. Em mamíferos, anfíbios e insetos, a digestão por endonucleases de restrição tem fornecido evidências para subclasses de DNA repetido na heterocromatina constitutiva em indivíduos da mesma espécie e entre espécies relacionadas (Hartley, 1991).

Várias enzimas produzem blocos heterocromáticos positivamente corados, como por exemplo, a *Alu* I. Com a aplicação de outras enzimas, certos blocos heterocromáticos são negativamente corados. *Hinf* I em particular produz tal efeito sobre alguns cromossomos humanos e efeito similar tem sido reportado para *Msp* I. Deve ser notado que uma enzima específica geralmente não diferencia todos os blocos heterocromáticos, particularmente em cromossomos humanos. Entre os cromossomos humanos, há uma extensiva heterogeneidade nos blocos de heterocromatina pelas diferentes endonucleases de restrição, e muitos blocos são também de tamanho heteromórfico. Similar variabilidade tem sido encontrada em cromossomos de macacos (Sumner, 1990); e mesmo nos cromossomos homólogos em diferentes espécies (homem, gorila, chimpanzé e orangotango) não necessariamente ocorrem heterocromatina com digestibilidade similar pelas enzimas de restrição. A heterocromatina de cromossomos de *Muntiac* é também completamente variável em sua resistência a digestão (Sumner, 1990). A situação em camundongo é melhor diferenciada, desde que todos os blocos heterocromáticos (exceto aquele do cromossomo Y) comportam-se similarmente, embora heteromorfismos de tamanho possam ser vistos. *Ava* II e *Bst* NI, todavia, extraem completamente a região banda-C positiva exceto em uma região da extremidade centromérica a qual, é especulado, representar um satélite menor (Kaelbling et al., 1984).

No presente trabalho foi analisada a meiose dos triatomíneos *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri* pelo tratamento com as endonucleases *Hae* III e *Alu* I e os resultados foram comparados com os dados obtidos no bandamento-C. Com aplicação da endonuclease *Alu* I, os núcleos poliplóides da parede dos túbulos testiculares das duas espécies, apresentaram padrão semelhante ao bandamento-C, com cromatina dispersa e único corpúsculo heterocromático. O tratamento com *Hae* III forneceu padrão semelhante a banda-C em *P. herreri*, porém em *P. megistus* este núcleo apresentou único corpúsculo heterocromático, com halo ao redor deste



corpúsculo apresentando digestão enzimática. A cromatina presente no núcleo também mostrou sinais de digestão por estar menos compacta quando comparada ao bandamento-C.

Na prófase I da meiose (estádio confuso), em *P. megistus* e *P. herreri*, a endonuclease *Alu* I apresentou padrão semelhante ao bandamento-C observado em cada espécie. Assim em *P. megistus*, alguns blocos heterocromáticos eram visíveis nos autossomos e os cromossomos sexuais permaneceram heterocromáticos. Em *P. herreri*, os blocos heterocromáticos localizavam-se nas porções terminais dos autossomos e os cromossomos sexuais também apresentaram-se heterocromáticos. Com a endonuclease *Hae* III, na espécie *P. megistus*, foi observado padrão semelhante à banda-C indicando a presença de um mesmo tipo de heterocromatina. Em *P. herreri*, a heterocromatina comportou-se de maneira dispersa não sendo evidenciada nas extremidades cromossômicas e os cromossomos sexuais apresentaram-se heterocromáticos exibindo um padrão semelhante ao bandamento-C. Em um estágio mais adiantado da prófase I meiótica, os cromossomos sexuais, provavelmente os Xs, apresentaram-se digeridos exibindo padrão diferente do observado no bandamento-C. Este fato indica que a heterocromatina presente nos cromossomos X de *P. herreri* é distinta daquela observada no bandamento-C.

No paquíteno, após tratamento com a endonuclease *Hae* III, ambas espécies apresentaram padrão de digestão enzimática que alternava entre bandas claras e escuras em alguns autossomos e os cromossomos sexuais permaneceram unidos e heterocromáticos. O tratamento com a endonuclease *Alu* I gerou um padrão similar ao bandamento-C nas duas espécies de triatomíneos, ou seja, *Panstrongylus megistus* apresentou heterocromatina espalhada ao longo dos autossomos e cromossomos sexuais heterocromáticos e *Panstrongylus herreri*, como no bandamento-C, apresentou regiões heterocromáticas nas extremidades cromossômicas.

No diplóteno, após tratamento com a endonuclease *Hae* III, *P. megistus* apresentou cromossomos sexuais totalmente resistentes a ação enzimática indicando que a heterocromatina presente nestes heterocromossomos é de certa forma diferente daquela detectada no bandamento-C, pois neste estágio, através do bandamento-C, os cromossomos sexuais provavelmente os Xs, apresentaram-se ora eucromáticos ora heterocromáticos. Nos triatomíneos da espécie *Panstrongylus herreri*, com aplicação da endonuclease *Hae* III, é



possível novamente verificar sinais de digestão nos cromossomos sexuais (provavelmente os Xs). No tratamento com a enzima de restrição *Alu* I em *P. megistus*, o padrão foi similar ao encontrado na endonuclease *Hae* III, isto é, heterocromossomos resistentes a ação enzimática. Em *P. herreri*, após tratamento com *Alu* I, os resultados também foram coincidentes com o bandamento-C desta espécie, ou seja, cromossomos sexuais heterocromáticos.

Nas metáfases meióticas, após tratamento com as duas endonucleases de restrição, de uma forma geral, os cromossomos de ambas espécies apresentaram-se bastante condensados dificultando a observação dos bandamentos. Porém, em *P. herreri*, foi possível notar digestão nos cromossomos sexuais, certamente nos mesmos cromossomos que apresentaram sinais de digestão anteriormente.

Muitas enzimas produzem bandamento-G nos cromossomos de mamíferos. *Hae* III produz bandamento G e C, ou uma combinação dos dois, dependendo da digestão (Mezzanotte et al., 1983). Os cromossomos metafásicos da enguia *Anguilla anguilla* foram tratados com as endonucleases de restrição *Hae* III, *Hinf* I e *Mse* I. Todas as endonucleases induziram um padrão semelhante ao bandamento-G (Viñas et al., 1994). No primata, *Saimiri boliviensis boliviensis*, a digestão com as endonucleases *Hae* III e *Alu* I também produziu padrão semelhante ao bandamento-G (García et al., 1995). Nos triatomíneos estudados no presente trabalho, os tratamentos com as endonucleases *Hae* III e *Alu* I produziram bandamento semelhante ao C em alguns estádios da espermatogênese.

Um outro bom exemplo de bandamento-C, coincidente com resultados obtidos pelo tratamento com enzimas de restrição, são os cromossomos do mosquito *Culiseta longiareolata* ( $2n=6$ ) que foram submetidos à digestão com nove endonucleases de restrição. As regiões heterocromáticas aparentemente estavam protegidas da digestão de todas as enzimas exceto pela *Mbo* I. A diferenciação longitudinal produzida nos cromossomos de *C. longiareolata* por oito das nove endonucleases (*Alu* I, *Hha* I, *Hae* III, *Hpa* II, *Msp* I, *Dde* I, *Hinf* I, *Bam* HI I ) foi similar ao padrão obtido no bandamento-C, ou seja, regiões heterocromáticas localizadas ao redor dos centrômeros nos três pares autossômicos e uma região telomérica no cromossomo Y (Marchi & Mezzanotte, 1988).



Outros organismos, como o bivalve *Mytilus galloprovincialis* ( $2n=28$ ), oferecem exemplos de padrão de diferenciação cromossômica diferente daquele observado no bandamento-C. Este organismo foi estudado através das técnicas de endonucleases de restrição e bandamento-C. A banda-C revelou uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva, geralmente localizada nos telômeros e em alguns cromossomos também aparece intercaladamente ao longo dos braços cromossômicos. Os tratamentos das amostras com as endonucleases de restrição *Alu* I, *Hae* III, *Dpn* I, *Msp* I, e *Hinf* I forneceram padrões de bandamento específicos. A endonuclease *Alu* I produziu bandas intercalares e terminais positivas e a heterocromatina de certos autossomos pareceu não digerida pela endonuclease. A *Hae* III gerou centrômeros e telômeros com bandas positivas e em alguns cromossomos as bandas produzidas são menores do que aquelas observadas no bandamento-C. A endonuclease *Hinf* I exibiu centrômeros não digeridos enquanto as regiões teloméricas são claramente diferenciadas. A atividade da *Dpn* I causou parcial digestão das bandas-C de vários cromossomos. A maior parte das enzimas utilizadas produziu um padrão de banda específico diferente da banda-C convencional. Tais resultados indicam que algumas regiões cromossômicas ou cromossomos inteiros pertencem ao mesmo tipo de heterocromatina, enquanto outras heterocromatinas são únicas. Estes dados permitem subdividir as regiões heterocromáticas com base na presença ou ausência de sítios de restrição no DNA bem como detectar heterogeneidade na heterocromatina (Martínez-Lage et al., 1994).

A endonuclease de restrição *Hae* III induz o aparecimento de bandamento C e G em cromossomos humanos. Desde que sítios de restrição para esta enzima compreendem uma sequência de bases "GGCC" e as regiões cromossômicas entre as bandas-G são ricas em guanina, tem sido proposto que a *Hae* III preferencialmente digere regiões de interbandas e então aumenta o aparecimento de bandas-G (Bianchi et al., 1985). Nos Heteroptera analisados no presente trabalho, no estágio paquíteno, ambas espécies apresentaram padrão de bandas claras e escuras ao longo dos autossomos indicando que, na maior parte dos insetos, apesar de não ocorrer bandamento G, a endonuclease *Hae* III produz digestão intermediária ao longo dos cromossomos.

Evidências sugerem que a resistência de certas bandas-C às endonucleases de restrição por causa da falta de sítios de clivagem das



enzimas não são tão prováveis. Deve ser lembrado que o DNA nas bandas-C é, em alguns casos, menos facilmente extraído do que o DNA eucromático mesmo por agentes não específicos. Confirmações para um considerável grau de especificidade na ação das enzimas de restrição sobre a banda-C provêm de duas fontes. Primeiro, em cromossomos humanos, diferentes enzimas produzem diferentes subconjuntos de bandas-C (Sumner, 1990). E segundo, certas enzimas, podem extrair todo ou quase todo o DNA de certas bandas-C. Ambos conjuntos de observações indicam que as endonucleases de restrição têm acesso a todas as partes dos cromossomos (Miller et al., 1983 apud Sumner, 1990). Entretanto estas afirmações são bastante contestadas pela literatura, pois provavelmente uma série de fatores influem na digestão enzimática, tais como, grau de compactação cromatínica, interação DNA-proteína, tamanho do fragmento de DNA gerado, conformação enzimática e metilação.

O caso de digestão mais simples para considerar é quando uma enzima de restrição preferencialmente digere DNA satélite, que é o componente predominante de certas bandas-C. Miller e colaboradores (1984) demonstraram perda de DNA satélite em cromossomos de camundongo após digestão com *Bst* NI produzindo regiões banda-C negativas. A endonuclease *Ava* II gera o mesmo resultado, quando analisada através de *nick translation*, produzindo uma forte reação na cromatina centromérica de camundongo (Sumner, 1990).

A possibilidade de detectar seqüências de DNA altamente repetido em outras regiões além das bandas-C positivas mostra que o uso combinado de endonucleases de restrição e técnicas convencionais de citogenética aumentam grandemente a capacidade para analisar os diferentes tipos de organização cromatínica desvendando a questão da heterogeneidade cromatínica (Gosálvez et al., 1987).

A heterocromatina cêntrica de camundongo parece ser inalterada após incubação com *Alu* I confirmando certos dados da literatura como o fato das seqüências de DNA satélite estarem localizadas na heterocromatina centromérica dos cromossomos metafásicos (Pardue et al., 1970 apud Mezzanotte & Ferruci, 1984), também confirmando que a enzima *Alu* I não cliva DNA satélite purificado (Horz et al., 1977 apud Mezzanotte & Ferruci, 1984) e por fim confirmando a característica da *Alu* I digerir fortemente a cromatina enquanto deixa o DNA satélite intacto (Marismas et al., 1979 apud





Mezzanotte & Ferruci, 1984). Mezzanotte e colaboradores (1983) mostraram que endonuclease de restrição *Alu* I digere seletivamente DNA cromossomal humano sendo que todas as áreas heterocromáticas contendo DNA satélite parecem não alteradas, enquanto as regiões eucromáticas conhecidas não conterem DNA altamente repetitivo são extensivamente alteradas.

Cromossomos fixados da linhagem RIII de embriões de camundongos e células A9 foram tratadas com endonucleases de restrição. O tratamento com *Alu* I, *Hinf* I e *Mbo* I produziu bandamento semelhante ao C e as endonucleases *Eco* RII ou *Hae* III produziram banda-G e banda-C concomitantemente. *Ava* II e *Bst* NI produziram o padrão de banda-G e na maior parte dos cromossomos somente um pequeno segmento de cada banda-C, adjacente ao centrômero, foi corado. Esta minúscula banda-C residual pode conter um satélite menor localizado adjacente aos *clusters* dos satélites principais (Kaelbling et al., 1984).

➤ Os efeitos das endonucleases de restrição sobre cromossomos fixados podem ser explicados pelos seguintes fatores: 1) presença ou ausência de seqüências específicas de bases de DNA em regiões particulares dos cromossomos; 2) habilidade de uma endonuclease de restrição cortar uma seqüência alvo, a qual pode ou não ser acessível dependendo da organização de regiões específicas dos cromossomos; 3) a quantidade de atividade da endonuclease de restrição sobre cromossomos fixados é também afetada pelo comprimento de sua seqüência alvo (Gosálvez et al., 1987).

O tradicional método de uso de enzimas de restrição, de fato, não detecta diretamente os sítios de ataque da enzima, mas somente, parece induzir perda de DNA. Tal método não é muito eficiente na detecção de certos sítios. Alguns pesquisadores tem, portanto, realizado experimentos com *nick translation* para detectar os cortes no DNA cromossomal produzido pelas endonucleases de restrição. O processo de *nick translation in situ* envolve a síntese de DNA marcado. A marcação pode ser reconhecida por procedimentos adequados como autorradiografia ou imunocitoquímica (Sumner, 1990).

Um exemplo da aplicação da técnica de *nick translation* é o estudo do organismo *Arcyptera fusca* que possui 11 bivalentes autossomais de diferentes tamanhos. A heterocromatina pericentromérica e distal caracterizam a maior parte dos cromossomos e são banda-C positiva. Polimorfismos para presença e ausência dos segmentos distais têm si descritos (Torre et al., 1987 apud



Torre & López-Fernández, 1992). Entretanto, a heterocromatina centromérica nunca apresentou polimorfismos deste tipo. Além disso, ambos os homólogos de cada bivalente reagem da mesma forma, ou seja, eles mostram uma resposta homogênea em sua heterocromatina centromérica. Em contraste, cromossomos fixados parcialmente digerido com *Sal* 3A, e submetidos a técnica de *nick translation* apresentam uma heterogeneidade críptica na heterocromatina centromérica. Esta heterogeneidade foi refletida pelas diferentes reações de regiões heterocromáticas centroméricas homólogas em diferentes bivalentes, isto é, enquanto a heterocromatina centromérica de um cromossomo mostrava uma intensa fluorescência àquela de seu homólogo não foi significativamente corada. Estes resultados mostram que domínios cromatínicos homólogos e equilocais podem diferir consideravelmente na distribuição dos sítios de restrição, então provendo diferentes substratos para clivagem por enzimas de restrição e diferencial coloração após *nick translation*. Desde que os resultados apresentam diferenças entre regiões cromossômicas homólogas, pode ser sugerido que as regiões heterocromáticas homólogas são capazes de incorporar diferentes mutações durante sua evolução (Torre & López-Fernández, 1992).

Estudando cromossomos humanos através de algumas endonucleases de restrição tais como *Alu* I, *Mbo* I, *Hae* III, *Dde* I, *Rsa* I e *Hinf* I, Bianchi e colaboradores (1985), encontraram vários polimorfismos nas bandas, os quais não foram encontrados com o bandamento-C, indicando uma variabilidade na frequência e distribuição de sítios de restrição em regiões cromossômicas homólogas. Este trabalho também analisou a interferência do grau de compactação cromatínica no bandamento por endonucleases de restrição concluindo que o empacotamento da cromatina desempenha pequeno ou nenhum papel na indução de bandas por endonucleases de restrição. Endonucleases de restrição são capazes de extrair DNA do núcleo interfásico, bem como no estágio G1 e cromossomos metáfásicos. Os autores acima citados acreditam que a detecção de polimorfismos de bandas nas regiões cromossômicas homólogas é uma clara indicação que a frequência de sítios de clivagem para a enzima e não a estrutura da cromatina é a principal causa do bandamento cromossômico.

Sentís e colaboradores (1988) também acreditam que a ação das endonucleases de restrição é baseada no corte e extração de DNA, sendo



essencialmente determinada pela composição de base melhor do que pela estrutura cromatínica.

Em Orthoptera, cromossomos de *Arcyptera tornosi* ( $2n=23$ ) têm sido analisados pelo bandamento-C, bem como, pela digestão com endonucleases de restrição tais como *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hind* III. Algumas regiões bandas-C positivas são digeridas por endonucleases específicas, enquanto outras áreas não são, as regiões digeridas provavelmente contém DNA altamente repetido. As bandas-C revelam a presença de pequenas bandas cêntricas em todos os cromossomos, e em alguns cromossomos ocorrem bandas distais. O tratamento com a endonuclease *Hind* III não apresenta um padrão de diferenciação longitudinal nos cromossomos. Já as endonucleases *Alu* I, *Hae* III, *Hind* III produzem diferenciação cromossômica semelhantes às obtidas com bandamento-C com algumas diferenças particulares (Gosálvez et al., 1987). É importante salientar que, segundo os autores, *A. tornosi* como em outras espécies, as enzimas de restrição parecem capazes de clivar o DNA localizado em sítios específicos a despeito do grau de empacotamento da cromatina. É possível observar a presença de blocos não digeridos e intensamente digeridos na intérfase e prófase, os quais correspondem a regiões específicas dos cromossomos metafásicos. A digestão com *Alu* I parece incluir mais material do que o material banda-C positivo em alguns cromossomos. A *Hinf* I produz um padrão similar ao obtido no tratamento com *Alu* I. A endonuclease *Hae* III não digere a heterocromatina associada a região organizadora nucleolar (Gosálvez et al., 1987).

Cromossomos meióticos e mitóticos do Orthoptera *Pyrgomorpha conica* foram tratados com as endonucleases de restrição *Alu* I, *Mbo* I e *Hae* III. Dois importantes resultados foram obtidos. Primeiro, as endonucleases atuam produzindo uma diferenciação linear nos cromossomos meióticos e mitóticos. Segundo, as alterações de picnoses que ocorrem na cromatina da prófase até a primeira metáfase da meiose, não afetam a capacidade de digestão das endonucleases de restrição. Estes resultados sugerem que a presença de sítios de restrição, melhor do que os estados de condensação da cromatina, é um fator crítico para obtenção de diferenciação linear cromossômica. O bandamento-C observado na meiose revelou bandas positivas nas regiões cromossômicas pericentroméricas em todos os cromossomos exceto no cromossomo S9. O tratamento com *Alu* I apresentou um padrão incluindo fraca coloração na heterocromatina pericentromérica de todos os cromossomos e



uma forte coloração na eucromatina e cromatina densa dos cromossomo X e S9. Este padrão é contrastante com aquele obtido com as endonucleases *Mbo* I e *Hae* III. Tais enzimas produzem um padrão de bandamento reverso, similar ao induzido pelo bandamento-C. Nos cromossomos mitóticos as endonucleases de restrição reproduziram o padrão encontrado na meiose, isto é, regiões pericentroméricas fracamente coradas no caso da endonuclease *Alu* I, enquanto, um padrão similar ao do bandamento-C foi induzido pelas enzimas de restrição *Mbo* I *Hae* III (López-Fernández et al., 1988).

Bianchi et al. (1985) relataram que as endonucleases de restrição *Alu* I, *Mbo* I e *Hae* III induziram bandas que foram similares nos cromossomos pré-condensados da fase G1 (PCC) quando comparada com as bandas induzidas nos cromossomos mitóticos. Com base neste fato, estes autores afirmaram que a organização espacial e empacotamento das fibras de cromatina desempenham pequenos papéis ou nenhum papel no mecanismo de bandamento cromossômico pelas endonucleases de restrição. Entretanto, Gosálvez e colaboradores (1989) acreditam que estes dados não são conclusivos, no mínimo, até informações adicionais sobre o PCC estarem disponíveis e ser possível comparar a acessibilidade das macromoléculas no PCC em relação a cromossomos metafásicos. Dados disponíveis fortemente sugerem que as diferentes organizações das diferentes classes cromatínicas podem afetar a ação das endonucleases sobre os cromossomos metafásicos. Por exemplo, há possibilidade que a presença de uma particular interação DNA-proteína possa impedir a ação das endonucleases ou pode fazer o DNA tornar-se uma região de difícil extração mesmo após a clivagem.

O resultados do presente trabalho particularmente concordam com o fato de que outros elementos, além da presença dos sítios de reconhecimento das endonucleases, atuam nos resultados obtidos após tratamentos com ERs. As duas espécies de triatomíneos analisadas com as endonucleases *Hae* III e *Alu* I apresentaram certo padrão de digestão nos estádios iniciais da meiose, ou seja, estágio confuso, paquíteno e diplóteno, entretanto os cromossomos metafásicos tornaram-se praticamente inacessíveis a atuação das endonucleases. Assim o grau de empacotamento da cromatina, algum tipo de interação DNA-proteína ou outros fatores devem ter influenciado nos resultados.

→ Têm sido reportado que uma variedade de endonucleases de restrição são capazes de clivar o DNA de cromossomos fixados dependendo da



composição de bases de regiões específicas (Miller et al., 1983 apud Mezzanotte & Ferruci, 1984). Entretanto, a atividade da endonucleases sobre cromossomos fixados não é somente relacionada a presença ou ausência de sítios de restrição em uma área específica do cromossomo. Por exemplo, a endonuclease *Eco* RII, embora seja capaz de clivar extensivamente DNA satélite purificado de camundongo (Souther, 1975 apud Mezzanotte & Ferruci, 1984), não ataca heterocromatina satélite em preparações citológicas com cromossomos de camundongo. Além disso, Lica e Hamkalo (1983 apud Mezzanotte & Ferruci, 1984) demonstraram que a atividade das endonucleases *Alu* I e *Eco* RII nas células metafásicas é possivelmente afetada pelo alto grau de condensação das estruturas da heterocromatina cêntrica, enquanto Mezzanotte e colaboradores (1983 apud Mezzanotte & Ferruci, 1984) postularam que a atividade de várias enzimas de restrição sobre cromossomos humanos fixados depende da organização cromatínica. Estes fatos sugerem que a composição de base de certas regiões cromossômicas é uma condição necessária mas não suficiente para explicar estes resultados. Portanto, os autores acreditam que a estrutura da cromatina desempenhe um importante papel, permitindo ou impedindo, a interação DNA-enzima nos cromossomos fixados (Mezzanotte & Ferruci, 1984).

Cromossomos fixados de camundongo tem sido tratado com as endonucleases de restrição *Alu* I, *Eco* RII, *Hind* III e *Bam* HI. Os resultados obtidos tem sido discutidos em termos de extração preferencial ou não preferencial de DNA de áreas cromossômicas específicas. O possível envolvimento de uma organização estrutural particular de algumas classes de heterocromatina tem sido considerado para explicar os resultados obtidos após tratamento com *Alu* I e *Eco* RII. Os cromossomos tratados com *Alu* I e *Eco* RII revelaram bandas centroméricas, todos cromossomos pareciam extensivamente digeridos com exceção das áreas centroméricas as quais apareciam não afetadas. A digestão com as enzimas de restrição *Hind* III e *Bam* HI produziu bandas intercalares semelhantes às bandas G enquanto toda heterocromatina cêntrica foi fortemente corada (Mezzanotte & Ferrucci, 1984).

Cromossomos humanos e de camundongos foram tratados com os isoquirômeros *Mbo* I/ *Sau* 3A e *Eco* RII/ *Bst* NI. Em ambos casos cada membro dos pares de isoquirômeros produziu diferentes resultados, indicando que outros fatores além da composição de base do DNA podem afetar a digestão *in situ* pelas endonucleases de restrição e que a estrutura das enzimas é um



fator. Os isoquirômeros *Mbo* I e *Sau* 3A produziram o mesmo efeito nos cromossomos do gafanhoto *Oedipoda germanica*. Isto indica que diferenças na estrutura da cromatina de espécies diferentes podem ser importantes para determinar a atividade das endonucleases nos cromossomos de eucariotos (Gosálvez et al., 1989).

Em cromossomos de mamíferos a não diferenciação longitudinal após tratamento com as endonucleases *Sau* 3A e *Bst* NI não foi devida a ausência de alvos. Pois seus isoquirômeros, *Mbo* I e *Eco* RII, mostraram uma atividade intensa e extensa de remoção de DNA dos mesmos cromossomos. Outros fatores além da composição de bases do DNA devem explicar estes resultados (Gosálvez et al., 1989).

→ A existência de sítios alvos para endonucleases de restrição é condição necessária, mas não suficiente para obtenção de bandas (formadas a partir da extração de DNA). A organização estrutural da cromatina, a frequência dos sítios de restrição e a quantidade de DNA removido também são fatores importantes. Enzimas de restrição isoquirômeros produzem diferentes padrões de bandamento em cromossomos metafásicos de humanos e de camundongo, o que indica que outros fatores, diferentes das seqüências alvo, desempenham papéis no bandamento pela endonucleases de restrição (Petitpierre et al., 1996). Como apontado por Sumner (1990), os dois fatores críticos responsáveis pelo bandamento são acessibilidade do DNA às endonucleases e a habilidade do DNA digerido para difundir-se do cromossomo.

Há indicações que as proteínas cromossomais afetam a extração de DNA. Lica & Hamkalo (1983 apud Sumner, 1990) demonstraram que a resistência da heterocromatina centromérica de cromossomos de camundongo (não fixados) pelas endonucleases *Alu* I ou *Eco* RI foi parcialmente devida a sua estrutura altamente condensada, desde que DNA livre de proteínas desta cromatina condensada pode ser clivado pelas mesmas enzimas. Em cromossomos de camundongo fixados, *Bst* NI digere DNAs satélites, os quais portanto, devem ser protegidos por proteínas que são perdidas durante a fixação (Burkholder, 1989 apud Sumner, 1990).

Há uma possibilidade de que as diferentes classes de heterocromatina constitutiva reagem diferencialmente ao ataque enzimático. As diferenças entre tais tipos de cromatina podem ser devidas a presença ou ausência de proteínas cromossômicas específicas, possivelmente relacionadas com



seqüências específicas de bases de DNA, como mostrado pela ligação preferencial de uma proteína particular a uma seqüência repetida de polinucleotídeos altamente específica em *Drosophila melanogaster* (Hsieh et al., 1979 apud Mezzanotte & Ferruci, 1984).

Duas enzimas de restrição (*Hae* III e *Msp* I) empregadas em cromossomos de *Allium subvillosum* I foram capazes de digerir a eucromatina, apresentando bandas com padrão semelhante ao do bandamento-C, isto é, mostrando 4 principais blocos heterocromáticos localizados nos telômeros dos cromossomos 1, 5, 9 e 11 e outra pequena banda heterocromática e segmento supernumerário heterocromático no bivalente 13 (Fernandez-Piqueras et al., 1992). As regiões heterocromáticas são particularmente resistentes à digestão enzimática e os autores acima citados somente observaram digestão destas áreas usando subsequente tratamento com agentes proteolíticos ou nucleolíticos tais como as proteinases J ou nuclease S1, mais uma vez comprovando que uma interação proteica pode interferir na atuação das endonucleases de restrição.

→ O tipo de bandamento produzido pelo emprego das ERs pode ser correlacionado com a especificidade da endonuclease e com o comprimento dos fragmentos de DNA produzidos. Dois mecanismos têm sido sugeridos para reduzir a coloração com Giemsa ou outros corantes no bandamento com endonucleases de restrição: remoção dos fragmentos de DNA e alterações na estrutura da cromatina, isto é, descondensação (Miller et al., 1984).

Miller e colaboradores (1983 apud Sumner, 1990) estimaram que os fragmentos de DNA gerados por endonucleases de restrição menores que 100 pb prontamente eram extraídos dos cromossomos, enquanto fragmentos maiores do que 1000 pb eram retidos. Entretanto, Burkholder (1989 apud Sumner, 1990) mostrou experimentalmente que fragmentos maiores do que 4000 pb foram perdidos de cromossomos não fixados após digestão, enquanto Sumner et al. (1990) encontraram que digestão com *Dra* I, a qual produziu fragmentos predominantemente maiores do que 2000 bp, causou extensiva perda de DNA de cromossomos fixados.

✕ → Pouco é conhecido sobre o possível papel desempenhado pela estrutura das endonucleases de restrição na determinação da digestão do DNA isolado ou da cromatina. Entre as endonucleases usadas, somente a *Eco* RII tem sido caracterizada com relação ao peso molecular (40.000) e composição de



aminoácidos (404 aminoácidos). A maior parte dos tipos II de endonucleases estudadas até agora tem tamanho similar (aproximadamente 250 aminoácidos). Exceções envolvendo a estrutura e atividade dos sítios de restrição são possíveis. É interessante notar que a endonuclease *Bst* NI tem peso molecular maior do que o observado na maioria das endonucleases de restrição. Diferenças na estrutura das enzimas podem explicar os resultados da atuação dos isoquirômeros *Eco* RII/*Bst* NI nos cromossomos de mamíferos (com diferentes padrões de bandas). Então a estrutura das endonucleases de restrição, bem como, a interação entre a molécula da endonuclease de restrição e organização da estrutura cromatínica são fatores a serem considerados nas conclusões sobre o efeito das ERs na digestão *in situ* (Gosálvez et al., 1989).

→ Há polêmicas se ocorrem outros fatores, além da composição de bases do DNA, que são responsáveis por determinar as consequências citológicas induzidas pelo efeito das ERs. Alguns autores mantêm que o DNA de todas regiões cromossômicas é igualmente acessível às endonucleases de restrição (Miller et al., 1983; Bianchi et al., 1985). Outros acreditam que a organização diferente das diferentes áreas cromossômicas permite ou inibe a atividade das ERs (Gosálvez et al., 1989) como uma consequência da organização cromossômica dos eucariotos em diferentes domínios estruturais e funcionais. Se esta última afirmação é verdadeira, é importante ainda considerar que os pré-tratamentos necessários para obtenção das preparações cromossômicas podem afetar a organização estrutural cromossômica (Gosálvez et al., 1989).

Muitas enzimas de restrição falham em cortar sua seqüência de reconhecimento se esta estiver metilada. A metilação pode ser de adenina e citosina, mas destas, somente a 5-metilcitosina ocorre normalmente em DNA de eucariotos (Sumner, 1990). A atividade da endonuclease *Mbo* I é inibida pela metilação da adenina na seqüência GATC, enquanto a atividade da *Sau* 3A não é. Em contraste, a metilação da citosina inibe *Sau* 3A, mas é irrelevante para a atividade da *Mbo* I sobre a mesma seqüência. Metilação da citosina interna na seqüência CC(A/T)GG inibe a atividade da *ECO* RII, mas não afeta a da *Bst* NI (Gosalvez et al., 1989).

\* → Examinando o conjunto de cromossomos holocêntricos das espécies de Homóptera Aphodidae, *Sitobion avenae* e *Schizaphis graminum*, por bandamento-C e bandamento pelas endonucleases de restrição, *Alu* I e *Hae*



III, notou-se que na primeira espécie estas endonucleases não promovem bandamento distinto, e esta observação pode ser um reflexo da perda de sítios AT e GC nos cromossomos destas espécies. Em *Schizaphis graminum*, a endonuclease *Hae* III produz bandas terminais em dois grandes cromossomos similar àsquelas encontradas no bandamento-C. A digestão com *Alu* I produziu um importante padrão de banda, um dos cromossomos maiores encontra-se intercalarmemente bandado (Celis et al., 1997).

Cromossomos politênicos de *Drosophila virilis* foram tratados com as endonucleases de restrição *Alu* I e *Hae* III. Ambas as enzimas foram capazes de digerir o DNA cromossomal, com exceção de algumas regiões que continham DNA repetido. Os resultados obtidos foram comparados com os já existentes sobre *D. melanogaster*. A digestão com *Alu* I mostrou que as regiões dos genes para RNA 5S de *D. virilis* e *D. melanogaster* apresentam diferentes composições de bases, enquanto a aplicação da endonuclease *Hae* III revelou resistência das regiões dos genes para histona em *D. virilis*, contrariamente ao que foi observado em *D. melanogaster* (Mezzanotte et al., 1987).

No Homóptera, Aphididae, *Megoura vicia* o cromossomo X das fêmeas partenogenéticas têm sido analisado pelo bandamento-C e digestão enzimática através de endonucleases de restrição tais como *Dde* I, *Dra* I, *Tru* 9I e *Cfo* I. O cromossomo X possui um bem definido padrão de bandas e a heterocromatina constitutiva basicamente consiste de uma grande área intercalar e duas áreas teloméricas. Em *M. vicia* as bandas-C positivas parecem ser confinadas quase exclusivamente ao cromossomo X, o qual é facilmente reconhecido como o maior par cromossômico do complemento. Digestão *in situ* realizada com diferentes endonucleases de restrição produz diferenciação longitudinal quase exclusivamente limitada ao par cromossômico X. Em particular, a digestão com *Cfo* I produz um padrão de bandamento que assemelha-se fortemente ao bandamento-C, exceto que a endonuclease digere amplamente a área superior ao telômero heterocromático do cromossomo X. A endonuclease *Dde* I fortemente ataca a principal banda-C intercalar positiva dos cromossomos X obtidas pelo bandamento-C e tratamento com *Cfo* I. O padrão obtido pela digestão com *Dra* I e *Tru* 9I são similares e ambos resultam no reverso do padrão da *Cfo* I. Tais resultados permitem a observação da heterogeneidade presente na heterocromatina do cromossomo X de *M. viciae* (Manicardi et al., 1996).



Nas duas espécies de triatomíneos analisadas no presente trabalho, os cromossomos Xs, como foi citado anteriormente, também apresentaram padrão característico de coloração. Em *P. megistus*, após tratamento com as endonucleases *Hae* III e *Alu* I, os cromossomos sexuais mostraram-se totalmente heterocromáticos. Padrão este diferente dos resultados obtidos no bandamento-C em que estes cromossomos apresentavam ora banda-C positivos ora negativos. Em *P. herreri*, os dados obtidos com bandamento-C e aplicação da endonuclease *Alu* I são coincidentes, com cromossomos sexuais totalmente heterocromáticos, já o tratamento com a endonuclease *Hae* III mostrou digestão de certas regiões dos cromossomos Xs.

*Dociostaurus jagoi* e *Dociostaurus genei* são dois Orthoptera com grandes diferenças no conteúdo de heterocromatina. As endonucleases de restrição *Mbo* I e *Sau* 3A, digerem extensivamente a região centromérica em ambas espécies. Os segmentos heterocromáticos supernumerários presentes em *D. genei* parecem ser ricos em -AT e são bastante digeridos pela endonuclease *Alu* I. Em ambas espécies, todos cromossomos apresentam bandas-C pericentroméricas. Entretanto, estas bandas são maiores em *D. genei*. A maior parte das enzimas aplicadas produziram padrão semelhante ao do bandamento-C. Algumas das enzimas forneceram claras diferenças entre as regiões heterocromáticas. *Hae* III e *Hpa* II digerem certas bandas pericentroméricas em *D. genei*. Uma outra endonuclease, *Pvu* II, reproduz o padrão de bandamento-C em ambas espécies e não produz grande digestão nos segmentos supranumerários (Iñigo et al., 1993). Os dados deste trabalho permitiram aos autores observarem que a heterocromatina localizada em regiões homólogas comporta-se de maneira idêntica após os tratamentos corroborando com a hipótese de que a heterocromatina de regiões homólogas possui distribuição equilocal.

Cromossomos metafásicos do Orthoptera *Oedipoda germanica* ( $2n=22+X$ ) foram tratados com as endonucleases de restrição *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* II, *Mbo* I, *Msp* I e *Taq* I. Bandamento-C e fluorocromos com especificidade para diferentes pares de bases também foram utilizados para localizar e caracterizar a heterocromatina que é paracentromérica e em forma de grandes blocos. Os resultados indicam que os grandes blocos de heterocromatina paracentromérica são heterogêneos. Esta heterogeneidade é distribuída entre quase todos cromossomos do genoma. Todas as



endonucleases produziram diferenciação longitudinal no complemento cromossômico de *O. germanica* (López-Fernández et al., 1989).

Similaridades e diferenças entre subconjuntos de heterocromatina localizadas nos autossomos, cromossomos sexuais e cromossomos-B no genoma do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (machos  $\rightarrow 2n=11+X0$  e fêmea  $\rightarrow XX$ ) foram analisados pela digestão *in situ* com diferentes endonucleases de restrição e bandamento-C. As populações analisadas possuíam somente um tipo de cromossomo-B homogeneamente C+. O padrão produzido pelas endonucleases nos autossomos subdividem-se em duas categorias: aqueles que induziam padrão semelhante ao bandamento-C (*Mbo* I, *Msp* I, *Dde* I, *Bam* HI, *Rsa* I, *Hae* III, *Alu* I, *Hinf* I) e aqueles que removiam parte da heterocromatina constitutiva diminuindo as áreas C-positivas apresentando um pequeno ponto positivamente corado em cada centrômero (*Hin* pI, *Scr* FI, *Sau* 96A, *Taq* I). Nos cromossomos sexuais as endonucleases *Mbo* I, *Mso* I e *Dde* I produziram bandamento semelhante ao C e as endonucleases *Scr* FI, *Sau* 96A e *Taq* I digeriram parte de heterocromatina constitutiva. A heterogeneidade de bandas produzidas pela digestão com diferentes endonucleases foi mais pronunciada nos cromossomos-B do que nos autossomos ou cromossomos sexuais e os resultados foram divididos em duas classes: endonucleases capazes de revelar toda heterocromatina centromérica e endonucleases capazes de produzir bandas intersticiais não detectadas no bandamento-C. Os resultados mostram uma equilocal distribuição dos diferentes subconjuntos de heterocromatina. Além disso, indicam que o processo evolutivo, nesta espécie, produziu um grau de heterogeneidade dentro das diferentes frações da cromatina o que possibilita inferir que o material que origina os cromossomos-B envolve reorganização do material autossômico e passos evolutivos de amplificação deste material (López-Fernández et al., 1992).

Cromossomos mitóticos de *Tenebrio molitor* foram analisados pelo bandamento-C e digestão com as ERs *Eco* RI e *Alu* I. A morfologia cromossomal que é ambígua após o bandamento-C é melhorada pela digestão com endonucleases de restrição. A heterocromatina constitutiva revelada pelo bandamento-C ocupa extensivos blocos aparentemente localizados nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos e o cromossomo Y é totalmente heterocromático. A endonuclease *Alu* I fornece um padrão similar àquele obtido pelo bandamento-C enquanto a *Eco* RI, induz um padrão de bandamento reverso a esse. O padrão de digestão da *Eco* RI é provavelmente



produzido pela extração de um DNA repetido pericentromérico e equilocal. A morfologia cromossômica após digestão com *Eco* RI é estreitamente relacionada com a particular estrutura do DNA satélite localizado na região heterocromática de *T. molitor* (Juan et al., 1990).

Cromossomos metafásicos de camundongo têm sido tratados com as endonucleases de restrição *Alu* I, *Mbo* I, *Hae* III e *Eco* RII e corados com brometo de etídio. A digestão com *Alu* I produz bandas centroméricas semelhantes as bandas-C e as outras porções dos cromossomos apresentam-se totalmente não coradas, revelando uma massiva perda de DNA cromossomal. Resultados idênticos foram encontrados através do tratamento pela endonuclease *Mbo* I. O tratamento com a *Hae* III produziu cromossomos exibindo bandas semelhantes as bandas C e G dependendo do tempo de incubação (4 a 20 horas). Finalmente, a digestão com *Eco* RII produziu forte coloração nas regiões cromossômicas centroméricas de alguns cromossomos (Mezzanotte et al., 1985).

Cromossomos prometáfásicos (de linfócitos) do macaco (*Aloutta caraya*,  $2n=52$ ) foram analisados por bandamento G, C e pelas endonucleases de restrição *Hae* III, *Eco* RI, *Alu* I e *Sau* 3A. A digestão com *Hae* III e *Eco* RI produziu bandas semelhantes às bandas-G. Regiões centroméricas e certas bandas-C intersticiais mostraram polimorfismo heterocromático intra e interindividual. A digestão com *Alu* I produziu bandas semelhantes às bandas-C com redução de densidade de coloração nas regiões centroméricas e a *Sal* 3A produziu bandas semelhantes às bandas-C. Em todas as metáfases C+ analisadas, os blocos heterocromáticos foram localizados nas regiões centroméricas (Mudry et al., 1994).

Os cromossomos dos primatas da espécie *Callithrix argentata* são caracterizados por grandes quantidades de heterocromatina constitutiva distal. A heterocromatina das espécies *C. argentata*, *C. humeralifera* e *C. emiliae* foram analisadas com as endonucleases de restrição *Hinf* I, *Mbo* I, *Alu* I, *Rsa* I, *Dde* I, *Hae* III e *Msp* I. Os resultados obtidos permitiram classificar a heterocromatina destas espécies em três tipos 1) heterocromatina distal com homogênea resposta a ação enzimática, as quais não foram alteradas (*Hinf* I, *Mbo* I, *Alu* I, *Hae* III), parcialmente digeridas (*Dde* I) e completamente digerida (*Rsa* I) (Pieczarka et al., 1996).



O tratamento dos cromossomos metafásicos dos primatas *Pan troglodytes*, *Pan paniscus* e *Gorilla gorilla* com a endonuclease de restrição *Alu* I, demonstra diferenças qualitativas na heterocromatina telomérica entre *Pan* e *Gorilla* a despeito do fato que estas áreas aparecem homogêneas nos dois gêneros pelo bandamento-C, ou seja, o gênero *Pan* apresenta áreas teloméricas *Alu* I positivas, enquanto todas as bandas-C positivas teloméricas apareceram bem digeridas em *Gorilla*. Estes dados demonstram que esta cromatina C-positiva nos dois gêneros devem conter diferentes classes de DNA (Ferrucci et al., 1987).

Analizando o complemento cromossômico do peixe *Muraena helena* ( $2n=42$ ) através do bandamento-C e aplicação de endonucleases de restrição, observou-se que o bandamento-C revela a presença de heterocromatina constitutiva nos centrômeros de todos os cromossomos, bem como, na maior parte dos telômeros dos cromossomos acrocêntricos. A digestão com as endonucleases de restrição *Hae* III, *Mbo* I e *Dde* I produziu um padrão de clivagem específico para cada enzima indicando a presença de no mínimo duas diferentes classes de DNA altamente repetido. A banda-C centromérica mostrou-se sensível à digestão com *Mbo* I ou *Dde* I, mas foi resistente ao tratamento com *Hae* III. Esta última enzima produziu bandas localizadas correspondentes embora menores do que as bandas-C. Então *M. helena* contém DNA repetido nos centrômeros, indicando que tal DNA possui poucos sítios de reconhecimento da enzima *Hae* III, mas contém sítios para *Mbo* I e *Dde* I que freqüentemente permitem a extração de DNA. Os telômeros da maior parte dos cromossomos acrocêntricos, ao contrário, possuem DNA repetido resistente a ação das três enzimas. Isto dá suporte a hipótese que os DNAs teloméricos são freqüentemente compostos de uma seqüência repetida particular e demonstra a existência de diferentes classes de DNA altamente repetido nestas espécies, localizados nos centrômeros e telômeros (Cau et al., 1988).

Foi aplicado bandamento por enzimas de restrição em duas espécies de salmão, *Salmo solar* (salmão do Atlântico) e *Salmo trutta* (truta parda). Um padrão semelhante ao do bandamento-C foi produzido em ambas espécies pelas endonucleases *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III e *Mbo* I. *Alu* I revelou bandas cromossômicas extra na truta parda, enquanto as outras três endonucleases de restrição produziram padrões idênticos ao do bandamento-C. No salmão do



Atlântico, com a endonuclease *Dde* I foram reveladas bandas teloméricas em adição a convencional banda-C (Hartley, 1991).

Em *Tinca tina* (tench,  $2n=48$ ) a digestão com as endonucleases de restrição *Alu* I, *Taq* I e *Hae* III induziram padrão de bandamento específico que permitiram a identificação dos pares de cromossomos homólogos e revelaram características sobre composição das seqüências de várias regiões heterocromáticas cromossômicas. A endonuclease *Alu* I, em geral, produz bandas centroméricas. Comparado com os resultados do bandamento-C convencional, esta enzima de restrição permite uma mais meticulosa definição do cariótipo. Os telômeros aparecem bem corados em alguns pares cromossômicos. O par cromossômico 2, apresentou uma área intercalar totalmente não corada, indicando grande número de sítios alvos da endonuclease de restrição *Alu* I. A *Taq* I produz bandas em algumas regiões centroméricas enquanto a *Hae* III tem sítio alvo na maioria das regiões centroméricas. Estes resultados indicam que a heterocromatina centromérica de alguns cromossomos desta espécie tem diferente composição de bases de DNA. A região intercalar no par cromossômico 2, que foi completamente digerida pela endonuclease de restrição *Alu* I, permaneceu fortemente corada após digestão com *Hae* III. Após tratamento com *Taq* I, entretanto, esta região não mostrou coloração diferencial, possibilitando a detecção de diferenças na constituição da heterocromatina desta região (Padilla et al., 1993).

Metáfases mitóticas dos cromossomos da linhagem L 301 de centeio foram tratadas com as enzimas de restrição *Alu* I, *Dra* I e pelos isoquimômeros (mesma seqüência de reconhecimento) *Hpa* II e *Msp* I. Após tratamento com ERs houve redução das bandas teloméricas C-positivas. Em menor grau, as bandas centroméricas em alguns indivíduos foram ausentes dependendo do tratamento enzimático e o número de bandas intercalares também foi menor (Stober et al., 1993).

Também foi estudada a digestão *in situ* dos cromossomos de cevada. Todas as cinco endonucleases de restrição utilizadas *Mbo* II, *Rsa* I, *Hae* III, *Hinf* I e *Dra* II exibiram vários padrões de bandas. Nas bandas-N utilizadas como controle, todos os cromossomos apresentaram bandas centroméricas e pericentroméricas; alguns cromossomos também apresentaram bandas em regiões intersticiais. Bandas pericentroméricas distintas e grandes apareceram em quase todas os cromossomos tratados com as endonucleases *Mbo* II, *Rsa* I e *Hinf* I. Pequenas bandas centroméricas foram apresentadas pelas



endonucleases *Hae* III e *Dra* II. Estes resultados sugerem que há estruturas específicas nas seqüências de DNA do centrômero que são afetadas pela digestão com endonucleases de restrição, revelando diferenças adicionais entre as bandas centroméricas que não podem ser diferenciadas pela banda-N (Kamisugi et al., 1992).

Inúmeros são os exemplos do emprego de endonucleases de restrição nos mais diversos tipos de organismos, tais como, vegetais, artrópodos, primatas, cobaias e também seres humanos. O padrão proporcionado pelas endonucleases de restrição possibilita desde a comparação dos subconjuntos de heterocromatina entre espécies relacionadas, como nos Heteroptera *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreri* analisados neste trabalho, até a construção de hipóteses sobre derivação cromossômica, origem dos cromossomos B, distribuição da heterocromatina nas regiões cromossômicas homólogas e até mesmo a simples caracterização de uma determinada espécie.

De uma maneira geral as endonucleases de restrição aplicadas a preparações citológicas são um importante instrumento de análise citogenética, possibilitando a classificação de subtipos de heterocromatina além daqueles obtidos pelos bandamentos convencionais e proporciona ainda uma fonte de estudos e questionamentos sobre sua forma de atuação. Técnicas mais sofisticadas, como por exemplo, a utilização de ERs em DNA purificado e *nick translation* possibilitam uma aplicação ainda mais abrangente das endonucleases de restrição.

## 5. CONCLUSÕES



O estudo citogenético das espécies *Paratrangyia megista* e *Paratrangyia haren* revelou a existência de diferenças significativas entre as espécies estudadas, especialmente no que diz respeito ao número de cromossomos e ao comportamento dos cromossomos durante a meiose.

As análises citogenéticas realizadas com *Paratrangyia megista* e *Paratrangyia haren* revelaram que ambas as espécies possuem um cariótipo com 2n=14 cromossomos, sendo que os cromossomos são morfologicamente semelhantes. No entanto, o comportamento dos cromossomos durante a meiose é diferente, o que pode ser utilizado como critério para a identificação das espécies.

Os resultados da análise citogenética de *Paratrangyia megista* e *Paratrangyia haren* corroboram a hipótese de que ambas as espécies são espécies distintas, apesar de apresentarem um cariótipo semelhante. Essa conclusão é baseada nas diferenças observadas no comportamento dos cromossomos durante a meiose.

O estudo citogenético realizado com *Paratrangyia megista* e *Paratrangyia haren* revelou que ambas as espécies possuem um cariótipo com 2n=14 cromossomos. No entanto, o comportamento dos cromossomos durante a meiose é diferente, o que pode ser utilizado como critério para a identificação das espécies. Essa conclusão é baseada nas diferenças observadas no comportamento dos cromossomos durante a meiose.

Os resultados da análise citogenética de *Paratrangyia megista* e *Paratrangyia haren* revelaram que ambas as espécies possuem um cariótipo com 2n=14 cromossomos. No entanto, o comportamento dos cromossomos durante a meiose é diferente, o que pode ser utilizado como critério para a identificação das espécies. Essa conclusão é baseada nas diferenças observadas no comportamento dos cromossomos durante a meiose.

## 5. CONCLUSÕES

Observou-se que as análises citogenéticas realizadas com *Paratrangyia megista* e *Paratrangyia haren* revelaram que ambas as espécies possuem um cariótipo com 2n=14 cromossomos. No entanto, o comportamento dos cromossomos durante a meiose é diferente, o que pode ser utilizado como critério para a identificação das espécies.



O estudo citogenético das espécies *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreni*, realizado no presente trabalho, através das técnicas citogenéticas de coloração com orceína lacto-acética, impregnação com nitrato de prata, bandamento-C e endonucleases de restrição (*Hae* III e *Alu* I), permitiram evidenciar as seguintes conclusões:

- A. *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreni* apresentaram cariótipo  $2n=18+X_1X_2Y$  e  $2n=20+X_1X_2Y$ , respectivamente. Em Heteroptera, as espécies mais primitivas pertencem a família Pentatomidae com  $2n=14$  cromossomos e sistema sexual XY para machos. A maior parte dos outros heterópteros possui um complemento cromossômico relativamente mais alto sendo considerados mais recentes. Evolutivamente, *P. herreni* é uma espécie mais derivada que *P. megistus*.
- B. Os cromossomos de *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreni* não apresentaram constrição primária sugerindo serem holocinéticos e corroborando a hipótese de cromossomos holocêntricos em Heteroptera. Experimentos encontrados na literatura por irradiação dos cromossomos com raios X também comprovam esta hipótese.
- C. O sistema de cromossomos sexuais em *Panstrongylus* é tipo  $X_1X_2Y$  e os experimentos com bandamento-C e endonucleases de restrição indicam que os dois cromossomos X, de *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreni*, possuem comportamento semelhante quanto ao grau de digestibilidade e regiões banda-C positivas e negativas, sugerindo uma origem em comum, por fragmentação de um único X, hipótese melhor aceita encontrada na literatura. Os cromossomos X são mais frágeis que o Y, e a sobrevivência dos fragmentos é facilitada pelo mecanismo de meiose pós-reducional e holocentricidade destes cromossomos.
- D. Em *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herreni* os cromossomos sexuais foram positivamente heteropicnóticos no início da prófase I e mantiveram-se juntos no estágio confuso. Na metáfase I, os heterocromossomos localizaram-se periféricamente, individualizados e isopicnóticos como os demais autossomos. Na metáfase I, também observou-se bivalentes autossômicos e univalentes sexuais. Na metáfase II, os heterocromossomos encontraram-se unidos no centro do anel de autossomos sugerindo a formação de um pseudo-trivalente, reforçando assim, a hipótese do comportamento pós-reducional destes cromossomos.
- E. Observou-se formações de cistos celulares na espermatogênese, pois em triatomíneos a meiose é cística. As células são contidas em um invólucro de origem mesodérmica e permanecem neste estado até sua diferenciação, posteriormente sendo liberadas na testicolínfa. Os espermátócitos sofrem grande



quantidade de multiplicações no interior do cisto, tais multiplicações causam a redução do seu volume, este problema é solucionado através do fornecimento de energia pelas células nutritivas.

- F. *Panstrongylus megistus* e *Panstrongylus herrei* apresentaram núcleos poliplóides com único corpúsculo heterocromático. Estes núcleos estão relacionados à nutrição dos espermátócitos refletindo um processo adaptativo no qual as células economizam tempo e energia fisiológica.
- G. Na impregnação pelos íons prata, os heterocromossomos de *P. megistus* e *P. herrei* exibiram atividade organizadora nucleolar com forte impregnação na prófase I meiótica; também foram observadas ligações de um ou dois autossomos à região nucleolar. Os dados sugerem fragmentação do nucléolo, pois a partir da metáfase I são notados corpúsculos e fragmentos nucleolares no interior celular. Também verificou-se que nestes Heteroptera ocorre reativação de síntese de RNAr pós-meiótica, provavelmente relacionada à diferenciação celular.
- H. No bandamento-C, as duas espécies apresentaram bandas intersticiais e terminais nos autossomos, padrão comum em Heteroptera. As bandas terminais corroboram a hipótese que nos cromossomos holocêntricos a heterocromatina é preferencialmente localizada próxima aos telômeros. Os cromossomos sexuais em *P. herrei* comportaram-se de forma totalmente heterocromática na espermatogênese e em *P. megistus* os cromossomos X alternaram entre bandamento positivo e negativo. Houve coincidência entre regiões banda-C+ e RON nos cromossomos sexuais e nas espermátides no início da diferenciação.
- I. As endonucleases de restrição, *Hae* III e *Alu* I, em *P. megistus* e *P. herrei*, apresentaram grande parte dos padrões enzimáticos semelhantes ao bandamento-C, sugerindo a presença de um mesmo tipo de heterocromatina nas regiões coincidentes. Entretanto alguns padrões de digestão da heterocromatina foram distintos: no núcleo poliplóide de *P. megistus* (*Hae* III), prófase I de *P. herrei* (*Hae* III) e no paquíteno de ambas espécies (*Hae* III e *Alu* I). Os cromossomos X de *P. herrei* tratados com *Hae* III apresentaram-se digeridos sugerindo presença de heterocromatina diferente daquela do bandamento-C. Já em *P. megistus* estes cromossomos apresentaram-se heterocromáticos também exibindo padrão distinto do encontrado na banda-C, em que os cromossomos X mostraram-se alternativamente heterocromáticos. Este trabalho sugere que outros elementos além da presença de sítios de reconhecimento, tais como grau de empacotamento da cromatina e interação DNA-proteína, atuam nos resultados das ERs, pois, *P. megistus* e *P. herrei*, apresentaram certo padrão de digestão nos estádios iniciais da espermatogênese, porém os cromossomos metafásicos foram praticamente inacessíveis à atuação das endonucleases.



ALQUEZAR, A., DORLHAC, P. E., CHAMONE, D. F., GOLDENBERG, S.  
Chagasic disease diagnosis: evaluation of several tests and blood donor  
screening. *Transfusion*, v. 33, p. 830-834, 1993.

ALTJLAS, J., JAIMOVICH, G., MILOVIC, V., KLEIN, F., FELDMAN, L.  
Chagas disease after bone marrow transplantation. *Bone Marrow  
Transplantation*, v. 18, p. 447-448, 1995.

ALFREDO-OLIVEIRA, M. T. V. *Estudo citogenético em túbulos de Malpighi,  
glândulas salivares e testículos de Triatomíneos (Triatominae, Heteroptera).*  
São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências  
Exatas UNESP, 1990. 250 p. Tese (Doutoramento em Ciências  
Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São  
José do Rio Preto. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Filho, 1990.

BABU, A., VERMA, R. S. Centrosome structure: euchromatin and  
heterochromatin. *International Review of Cytology*, v. 108, p. 1-50, 1987.

BANERJEE, M. B. A study of chromosomes during meiosis in twenty-eight  
species of Hemiptera (Heteroptera, Homoptera). *Proc. Zool. Soc.*, v. 11, n.  
1, 1932.

BARRETO, M. P., RIBEIRO, R. D. Reservatório silvestres do *Trypanosoma  
cruzi* (Kinetoplastida: Chagasic). 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 39, n. 1,  
p. 29-35, 1979.

BARTH, R. Estudos anatómicos e fisiológicos sobre a subfamília Triatominae  
(Heteroptera, Reduviidae). V parte: Anatomia do testículo e  
espermatozoogênese de *Engelmannia infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo  
Cruz*, v. 14, n. 1, 1955.

BARTH, R. Estudos anatómicos e fisiológicos sobre a subfamília Triatominae  
(Hemiptera, Reduviidae). VI parte: Análise comparativa sobre a  
espermatozoogênese das espécies mais importantes. *Memórias do Instituto  
Oswaldo Cruz*, v. 14, n. 2, p. 259-276, 1955.

BARTON, M. B., BRIDGMAN, G. P., WILSON, G. C., WILSON, S. The  
mechanism and site of recombination in human spermatogenesis.  
*Chromosome*

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ALQUÉZAR, A, DORLHIAC, P. E., CHAMONE, D. F., GOLDENBERG, S. Chagas'disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*, v. 33, p. 830-834, 1993.
- ALTCLAS, J., JAIMOVICH, G., MILOVIC, V., KLEIN, F., FELDMAN, L. Chagas disease after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, v. 18, p. 447-448, 1996.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. *Estudo citogenético em túbulos de Malphighi, glândulas salivares e testículos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera)*. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas.UNESP, 1990, 250 p. Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 1990.
- BABU, A, VERMA, R. S. Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. *International Review of Cytology*. v. 108, p. 1-60, 1987.
- BANERJEE, M. R. A study of chromosomes during meiosis in twenty-eight species of Hemiptera (Heteroptera, Homoptera). *Proc. Zool Soc.*, v. 11, n. 1, 1958.
- BARRETO, M. P., RIBEIRO, R. D. Reservatórios silvestres do *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *Cruzi* Chagas. 1909. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 39, n. 1, p. 25-36, 1979.
- BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), V parte: Anatomia do testículo e espermiocitogênese do *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo cruz*, v. 54, n. 1, 1955.
- BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). VI parte: Estudo comparativo sobre a espermiocitogênese das espécies mais importantes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 54, n. 3, p. 599-616, 1956.
- BIANCHI, M. S., BIANCHI, N. O, PANTELAS, G. E., WOLFF, S. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases. *Chromosoma*, v. 91, p. 131-136, 1985.



- BICUDO, H. E. M. C. Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos nos eucariotos. *Ciência e Cultura*, v. 37, n. 3, p. 440-447, 1984.
- BRABIN, L. The epidemiological significance of Chagas' disease in women. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, n. 1, p. 73-79, 1992.
- BROWN, S. W., NUR, U. Heterochromatin chromosomes in the Coccids. *Science*, v. 145, p. 130-136, 1964.
- CAMACHO, J. P. M., BELDA, J., CABRERO, J. Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezea viridula* (Insecta, Heteroptera) analysed by C-banding and silver impregnation. *Can. J. Genet Cytol.*, v. 27, p. 490-497, 1985.
- CARDOSO, M. A. G., MARTINS, G. A., ALIBERTI, J. C. S., SILVS, J. S. Relação hospedeiro-parasita na doença de Chagas. *Medicina Ribeirão Preto*, v. 28, n. 3, p. 284-303, 1995.
- CARVALHO, V. B., SOUSA, E. F. L., VILA, A. J. H., SILVA, J. P., CAIADO, M. R., ARAÚJO, S. R., R., MACRUZ, R., ZERBINI, E. J. Heart transplantation in Chagas'Disease 10 years after the initial experience. *Circulation*, v. 94, p. 1815-1817, 1996.
- CAU, A, SALVADORI, S., DEIANA, J. L., MEZZANOTTE, R. The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: Karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions, and in situ digestion with restriction endonucleases. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 47, p. 223-226, 1988.
- CELIS, V. E. R., GASSEN, D. N., SANTOS-COLARES, M. C., OLIVEIRA, A. K., VALENTE V. L. S. Chromosome studies in southern brazilian wheat pest aphids *Sitobion avenae*, *Schizaphis graminum*, and *Methopolophium dirhodum* (Homoptera: Aphididae). *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20, p. 3, 415-419, 1997.
- COLLET, C. WESTERMAN, M. Interspersed distribution patterns of C-bands and satellite DNA in the holocentric chromosomes of *Luzula flaccida* (Juncaceae). *Genetica*, v. 63, p. 175-179, 1984.
- COMINGS, D. E., OKADA, T. A. Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. *Chromosoma*, v. 37, p. 177-192, 1972.



- COOK, K. R., KARPEN, G. H. A rosy future for heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 91, p. 5219-5221, 1994.
- COSTA, M. A, RODRIGUES DE MELO, G. A, POMPOLO, S. G., OLIVEIRA CAMPOS, L. A. Karyotypes and heterochromatin distribution (C-band patterns) in three species of *Microstigmus* wasps (Hymenoptera, Sphecidae, Pemphredoninae). *Rev. Bras. Genet.*, v. 16, n. 4, p. 923-926, 1993.
- CZAKER, R. Relative position of constitutive heterochromatin and of nucleolar structures during mouse spermiogenesis. *Anat. Embryol.*, v. 175, p. 467-475, 1987.
- DE VAIO, E. S., GRUCCI, B., CASTAGNINO, A. M. Meiotic differences between three triatomines species (Hemiptera, Reduviidae). *Genetica*, Netherlands, v. 67, p. 185-191, 1985.
- DESSEN, E. M. B. Nucléolo: estrutura e função. In: AMABIS J. M., MORGANTE, J. S., SIMÕES, L. C. G. Textos de Genética: Ação gênica: aspectos básicos de genética molecular. 1. ed. São Paulo: moderna, 1981, v.1, cap. VI.
- DIAS, J. C. P. Diálogo médico: Doença de Chagas. ano 5, v. 4, 1978.
- DIAS, J. C. P. Aspectos clínicos, sociais e trabalhistas da doença de Chagas em área endêmica sob controle do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 26, n. 2, p. 93-99, 1993.
- DIAS, J. C. P., SCHOFIELD, C. J., WANDERLEY, D. M. V., GARCIA DA SILVA, I., DIOTAIUTI, L., SALVATELLA, R. Papel dos vetores secundários na transmissão da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, n. 1, p. 59, 1994.
- DODD, R. Y. Scaling the heights. *Transfusion*, v. 35, n. 3, 1995.
- FAKAN, S., HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biology of the Cell*, v. 56, p. 189-206, 1986.
- FENERICH, P. C., HOSAKI-KOBAYASHI, M., K. Aspectos do núcleo interfásico de túbulos de Malphigui de larvas e adultos de formiga-leão



- (Myrmeleontidae, Neuroptera). *Brazilian Journal of Genetics*, v. 17, n. 3 supplement, 1994.
- FERNANDEZ-PIQUERAS, J., LOZANO, R., SENTÍS, C., RUIZ REJÓN, M. Restriction endonucleases digestion of meiotic chromosomes of *Allium subvillosum* L.. *Genetica*, v. 87, p. 165-168, 1992.
- FERRUCCI, L., ROMANO, E., STEFANO, G. F. The *Alu* I-induced bands in great apes and man: implication for heterochromatin characterization and satellite DNA distribution. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 44, p. 53-57, 1987.
- FISCHER, D., WEISENBERGER, D., SCHEER, U. Assigning functions to nucleolar structures. *Chromosoma*, v. 101, p. 133-140, 1991.
- FOSSEY, A., LIEBENBERG, H. Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Calisys wahlberg* Stal (Coreidae: Heteroptera). *Cytobios*, v. 81, p. 7-15, 1995.
- GAGE, L. P. Polyploidization of the silk gland of *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.*, v. 86, p. 87-108, 1973.
- GALEL, S. A., KIRCHHOFF, L. V. Risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in California blood donors. *Transfusion*, v. 36, p. 227-231, 1996.
- GALIÁN, J., SERRANO, J., DE LA RÚA, P., PETITPIERRE, E., JUNAN, C. Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelinae). *Heredity*, v. 74, p. 524-530, 1995.
- GARCÍA, M., BORRELL A., MUDRY, M., EGOZCUE, J., PONSÁ, M. Prometaphase karyotype and restriction-enzyme banding in squirrel monkeys, *Saimiri boliviensis boliviensis* (Primate:Platyrrhini). *Journal of mammalogy*, v. 76, n. 2, p. 497-503, 1995.
- X GOSÁLVEZ, J., BELLA, J. L., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., MEZZANOTE, R. Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arcyptera tornosi* (Orthoptera). *Heredity*, v. 59, p. 173-180, 1987.



- GONZÁLEZ-GARCÍA, J. M., RUFAS, J. S., ANTONIO, C., SUJA, J. A. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. *Chromosoma*, v. 104, p. 287-297, 1995.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, J. M., ANTONIO, C., SUJA, J. A., RUFAS, J. S. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Research*, v. 4, p. 124-132, 1996.
- GOSALVEZ, J., LÓPEZ-FÉRNANDEZ, C., FERRUCI, L., MEZZANOTTE, R. DNA base sequence is not the only factor for restriction endonuclease activity on metaphase chromosomes: evidence using isochizomers. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 50, p. 142-144, 1989.
- GRIJALVA, M. J., ROWLAND, E. D. , POWELL, M. R. Blood donors in a vector-free zone of ecuador potentially infected *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 52, n. 4, p. 360-363, 1995.
- GUERRA, M. S. Cromossomos metafásicos e o ciclo mitótico. In: \_ Introdução à citogenética geral. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988, cap. 1, p. 1-12.
- GUHL, F., SCHOFIELD, C. J. Population genetics and control of Triatominae. *Parasitology Today*, v. 12, n. 5, 1996.
- HARTLEY, S. E. Restriction enzyme banding in Atlantic salmon (*Salmo solar*) and brown trout (*Salmo trutta*). *Genet. Res. Camb.*, v. 57, p. 273-278, 1991.
- HERNÁNDEZ-VERDÚN, D., DERENZINI, M. BOUTEILLE, M. Relationship between the Ag-NOR proteins and ribossomal chromatin in situ during drug-induced RNA syntesis inhibition. *J. Ultrastruct.*, v. 88, p. 55-65, 1984.
- HERNÁNDEZ-VERDÚN, D. The nucleolus today. *Journal of Cell Science*. v. 99, p. 465-471, 1991.
- HIRAI, H., SHONO Y., ROJAS DE ARIAS, G. A. Constitutive heterochromatin polymorphism of a *Triatoma infestans* strain, a main vector insect of Chagas' disease. *Jpn. J. Sanit. Zool.*, v. 42, n. 4, p. 301-303, 1991.



- HOFGARTNER, F. J., SCHMID, M., KRONE, W., ZENZES, M. T., ENGEL, W. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in Mammals as analyzed by Silver-Staining. *Chromosoma*, v. 71, p. 197-216, 1979.
- HOWELL, W. M., BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia*, v. 36, p. 104-105, 1980.
- HUGHES-SCHRADER, S., SCHRADER, F. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma*, v. 12, p. 327-350, 1961.
- \* IÑIGO, E. R., BELLA, J. L., DE LA VEGA, G. Heterochromatin differentiation between two species of the genus *Dociostaurus* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity*, v. 70, p. 458-465, 1993.
- JOHN, B., MIKLOS, G. L. G. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *International Review of Cytology*, v. 58, p. 1-114, 1979.
- JUAN, C. GOSÁLVEZ, J., PETITPIERRE, E. Improving beetle karyotype analysis: restriction endonuclease banding of *Tenebrio molitor* chromosomes. *Heredity*, v. 65, p. 157-162, 1990.
- KAELBLING, M., MILLER, D. A., MILLER, J. O. Restriction enzyme banding of mouse metaphase chromosomes. *Chromosoma*, v. 90, p. 128-132, 1984.
- KAMISUGI, Y., IKEDA, Y., OHNO, M. *In situ* digestion of barley chromosomes with restriction endonucleases. *Genome*, v. 35, p. 793-798, 1992.
- KASAHARA, S., ZAMPIERI SILVA, A P., HADDAD, F. B. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). *Brazilian Journal of Genetics*, v. 19, n. 2, p. 237-242, 1996.
- KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas'disease) - A tropical disease now in the United States. *Current Concepts*, v. 329, n. 9, p. 639-644, 1993.
- \* LENT, H., WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas'disease. *Bulletin*



- of the American Museum of Natural History, New York, v. 163, n. 3, 1979.
- LEWIN, L. Organization of simple sequence DNA. In: Genes V. Oxford: Oxford University Press, 1994, cap. 26, p. 749-763.
- \* LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., GOSÁLVEZ, J., SUJA, J. A., MEZZANOTTE, R. Restriction endonuclease digestion of meiotic and mitotic chromosomes in *Pyrgomorpha conica* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *Genome*, v. 30, p. 621-626, 1988.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., GOSÁLVEZ, J., MEZZANOTTE, R. Heterochromatin heterogeneity in *Oedipoda germanica* (Orthoptera) detected by *in situ* digestion with restriction endonucleases. *Heredity*, v. 62, p. 269-277, 1989.
- \* LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., GOSÁLVEZ, J., FERRUCI, L. et al. Restriction endonucleases in the study of eucaryotic chromosomes. *Genetica*, Netherlands, v. 83, p. 257-274, 1991.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., MEZZANOTTE, R., GOSÁLVEZ, J. Autosomal, sex and B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera) viewed with restriction endonuclease *in situ* digestion. *Heredity*, v. 68, p. 365-372, 1992.
- LUCENA, D. T. Ecologia dos Triatomíneos do Brasil. *Revista Bras. de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 11, n. 4, 1959.
- LUQUETTI, A., O. Practical Aspects of chagas Disease. *Parasitology Today*, v. 10, n. 8, p. 287-288, 1994.
- LUQUETTI, A. O. Chagas Disease - A recent meeting on practical aspects applied meeting of Chagas Disease 4-6 november 1993, Uberaba, Brazil. *International Journal for Parasitology*, v. 25, n. 7, p. 869-874, 1995.
- MACE, M. L., TEVETHIA, S. S., BRINKLEY, B. R. Differential immunofluorescent labelling of chromosomes with antisera specific for single strand DNA. *Experimental Cell Research*, v. 75, p. 521-523, 1972.
- MANARESI, S., MARESCALCHI, O., SCALI, V. Ag-detected NOR and C-banding in *Bacillus rossius* (Insecta Phasmatodea) from Sicily. *Caryologia*, v. 44, n. 3-4, p. 265-286, 1991.



- MANICARDI, G. C., BIZZARO, D. GALLI E., BIANCHI, U. Heterochromatin heterogeneity in the holocentric X chromatin of *megoura viciae* (Homoptera, Aphididae). *Genome*, v. 39, p. 465-470, 1996.
- MANNA, G. K. Multiple sex-chromosome mechanism in a reduvid bug, *Conorhinus rubrofasciatus* (de Geer). *Proceedings of the zoological society of Bengal*, v. 3, p. 155- 161, 1950.
- MANNA, G. K. Chromosomes in evolution in Heteroptera. In: *Chromosomes in evolution in eukaryotic groups*. Florida:Boca Raton, 1995, cap. 8, p. 189-225.
- MARCHI, A., MEZZANOTTE, R. Restriction endonuclease digestion and chromosome banding in the mosquito, *Culiseta longiareolata*, (Diptera: Culicidae). *Heredity*, v. 60, p. 21-26, 1988.
- MARTELLI, C. M. T., ANDRADE, A. L. S. S., SILVA, S. A., ZICKER, F. Risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection blood donors in central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 87, n. 3, p. 339-343, 1992.
- MARTÍNEZ-LAGE, A., GONZÁLEZ-TIZÓN, A., MÉNDEZ, J. Characterization of different chromatin types in *mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity*, v. 72, p. 242-249, 1994.
- MEDINA, F. J., SOLANILLA, E. L., SÁNCHEZ-PINA, M. A., FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M. E., RISUEÑO, M. C. Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining. *Chromosoma*, v. 94, p. 259-266, 1986.
- MÉLÈSE, T., XUE, Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 7, p. 319-324, 1995.
- MELLO, M. L. S. Somatic polyploid in insects. *Ciência e Cultura*, v. 22, n. 4, 1970.
- MELLO, M. L. S. Heterocromatina. *Ciência e Cultura*, v. 30, n. 3, p. 290-303, 1977.



- MELLO, M. L. S. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. *Acta Histochem.*, v. 28, n. 2, p. 149-154, 1995.
- MEZZANOTTE, R., BIANCHI, U., VANNI, R., FERRUCI, L. Chromatin organization and restriction endonuclease activity on human metaphase chromosomes. *Cytogenet. Cell. Genet.*, v. 36, p. 562-566, 1983.
- MEZZANOTTE, R., FERRUCI, L. Alterations induced in mouse chromosomes by restriction endonucleases. *Genetica*, v. 64, p. 123-128, 1984.
- MEZZANOTTE, R., MANCONI, P. E., ROZZO, C., ENNAS, M. G., FERRUCCI, L. The banding pattern produced by restriction endonucleases in mouse chromosomes. *Bas. Appl. Histochem.*, v. 29, p. 115-120, 1985.
- MEZZANOTTE, R., BIANCHI, U., MARCH, A. In situ digestion of *Drosophila virilis* polytene chromosomes by *Alu* I and *Hae* III restriction endonucleases. *Genome*, v. 29, p. 630-634, 1987.
- MILLER, D. A., GOSDEN, J. R., HASTIE, N. D., EVANS, H. J. Mechanism of endonuclease banding of chromosomes. *Exp. Cell Res.*, v. 155, 1984.
- MOLA, L. M., PAPESCHI, G. Meiotic studies in *Largus rufipennis* (Castelnau) (Largidae, Heteroptera): frequency and behaviour of ring bivalents, univalents and B chromosomes. *Heredity*, v. 71, p. 33-40, 1993.
- MOLA, L. M. Post-reductional meiosis in *Aeshna* (Aeshnidae, Odonata). *Hereditas*, v. 122, p. 47-55, 1995.
- MUDRY, M., PONSÁ, M., BORREL, A., EGOZCUE, J., GARCIA GIBE, M. Prometaphase chromosomes of the howler Monkey (*Aloutta caraya*): G, C, NOR, and Restriction Enzyme (REs) banding. *American Journal of Primatology*, v. 33, p. 121-132, 1994.
- MURAMOTO, N. A study of the C-banded chromosomes in some species of Heteropteran insects. *Proc. Japan. Acad.*, v. 56, n. 31, p. 125-130, 1980.
- NEVES, D. P. *Trypanosoma cruzi*. In: *Parasitologia médica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, cap. 10, p. 59-95.



- PADILLA, J. A., FERNANDEZ- GARCÍA, J. L., RABASCO, A., MARTÍNEZ-TRANCÓN, M., RODRIGUEZ DE LEDESMA, I., PÉREZ-REGADERA, J. J. Characterization of the karyotype of the tench (*Tinca tinca* L.) and analysis of its chromosomal heterochromatic regions by C-banding, Ag-staining, and restriction endonucleases banding. *Cytogenet Cell Genet*, v. 62, p. 220-223, 1993.
- PANZERA, F., ALVARES, F., SANCHES-RUFAS, J. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans*, (Hemiptera: reduviidae). *Genome*, v. 35, n. 6, p. 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). *Chromosome Research*, v. 3, p. 143-150, 1995.
- PANZERA, F., PÉREZ, R., HORNOS, S., PANZERA, Y., CESTAU, R., DELGADO, V., NICOLINI, P. Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera- Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 4, p. 515-518, 1996a.
- PANZERA, F., GIMENEZ-ABIÁN, M. I., LÓPEZ-SÁEZ, J. F., GIMÉNEZ-MARTÍN, G., CUADRADO, A., SHAW, P. J., BEVEN, A. F., CÁNOVAS, J. L., DE LA TORRE, C. Nucleolar organizer expression in *Allium cepa* L. chromosomes. *Chromosoma*, v. 105, p. 12-19, 1996b.
- PAPESCHI, A. G., BIDAÚ, C. J. Chromosome complement and male meiosis in four species of *Belostoma* Latreille (Heteroptera-Belostomatidae). *Rev. Brasil. Genet.*, v. 8, n. 2, p. 249-261, 1985.
- PAPESCHI, A. G. C-banding and DNA content in three species of *Belostoma* (Heteroptera) with large differences in chromosome size and number. *Genetica*, v. 76, p. 43-51, 1988.
- PAPESCHI, A. G. DNA content and heterochromatin variation in species of *Belostoma* (Heteroptera, Belostomatidae). *Hereditas*, v. 115, p. 109-114, 1991.



- PAPESCHI, A. G. Chromosome rearrangements in *Belostoma plebejum* (Stal) (Belostomatidae, Heteroptera). *Caryologia*, v. 47, n. 3-4, p. 223-231, 1994.
- PAPESCHI, A. G. Correspondence between C-banding and Ag-NOR in the sex chromosomes of *Belostoma oxyurum* (Belostomatidae, Heteroptera). *Cytologia*, v. 60, p. 291-295, 1995.
- PARISE, P. P., AVANCINI, R. M. P., RECCO-PIMENTEL, S. M. Karyotypic characterization of *Muscina stabulans* (Fallen) (Diptera: Muscidae) using conventional staining, silver staining and C-banding. *Caryologia*, v. 49, n. 1, p. 13-20, 1996.
- PENALVA DA SILVA, F. SCHREIBER, G. Morphology of spermatogenic tubes as taxonomic character in Triatominae (Reduviidae, Hemiptera). *Rev. Bras. de Biol.*, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 97-102, 1969.
- PEREZ, R., PANZERA, Y., SCAFIEZZO, S., MAZZELA, M. C., PANZERA, F., DUJARDIN, J. P., SCVORTZOFF, E. Cytogenetics as a tool for triatomine species distinction (Hemiptera-Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, n. 3, P. 353- 361, 1992.
- PÉREZ, R., PANZERA, F., PAGE, J., SUJA, J. A., RUFAS, J. S. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research*, v. 5, p. 47-56, 1997.
- PESSOA, S. B., MARTINS, A. V. Gênero *Trypanosoma*, Doença de Chagas. In: \_\_\_\_ *Parasitologia médica: segunda parte protozoologia*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, cap. 12, 13, 14, p. 125-177.
- ✶ PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. *Int. J. Insect Morphol & Embryol*, v. 25, n. 1/2, p. 115-133, 1996.
- PIECZARKA, J. C., NAGAMACHI, C. Y., BARROS, R. M. S., MATTEVI, M. S. Analysis of constitutive heterochromatin by fluorochromes and in situ digestion with restriction enzymes in species of the group *Callithrix argentata* (Callitrichidae, Primates). *Cytogenet Cell Genet*, v. 72, p. 325-330, 1996.



- PIZA JOR. S. T. Comportamento dos cromossomos na meiose de *Euryophthalmus rufipennis* Laporte (Hemiptera- Pyrrhocoridae). *An. Esc. Supl. Agr. Luiz de Queiroz*, v. 3, p. 27-54, 1946.
- PIZA JOR., S. T. Provas cruciais da dicentricidade dos cromossômios dos hemipteros. *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"*, p. 155-185, 1952.
- PRASAD, R., THOMAS, K. I. C-band pattern homogeneity in dragonflies (Odonata). *Caryologia*, v. 45, n. 1, p. 57-68, 1992.
- RASKA, I. Nuclear ultrastructures associated with the RNA synthesis and processing. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 59, p. 11-26, 1995.
- RAY, J. H., VENKETESWARAN, S. Constitutive heterochromatin distribution in monocentric and polycentric chromosomes. *Chromosoma*, v. 66, p. 342-350, 1978.
- REICHE, E. M. V., INOUE, M. M. Z., PONTELLO, R., MORIMOTO, H. K., ITOW JANKEVICIUS, S., MATSUO, T., JANKEVICIUS, J. V. Seropositivity for anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donors of the "Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná", Londrina, Brazil (1). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 38, n. 3, p. 233-240, 1996.
- \*ROBERTS, R. J. Restriction endonucleases. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, v. 4, n. 2, 1976.
- RODRIGUES, E., COLLARES-PEREIRA, M. J. NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces: Cyprinidae). *Genetica*, v. 98, p. 59-63, 1996.
- ROSSI, M. A., BESTETTI, R. B. The challenge of Chagasic Cardiomyopathy. *Cardiology*, v. 86, p. 1-7, 1995.
- ROZEK, M., NADACHOWSKA, M. A. Studies on C-banding Karyotype and meiosis of *Harpalus affinis* (Schränk, 1781) (Coleoptera, Carabidae). *Caryologia*, v. 44, n. 3-4, p. 317-323, 1991.
- ROZEK, M. C-banding patterns in Chromosomes of three species of Carabid Beetle (Coleoptera, Carabidae). *Folia biologica*, v. 43, n. 1-2, p. 35-40, 1995.



- RUFAS, J. S., GOSÁLVEZ, J. Development of silver stained structures during spermatogenesis of *Schistocerca gregaria* (Forsk) (Orthoptera: Acrididae). *Caryologia*, v. 35, n. 2, p. 261-267, 1982.
- SANCHEZ, V., CONFALONIERI, V. Chromosome banding pattern in *Trimerotropis pallidipennis* (Orthoptera: Acrididae). *Cytobios*, v. 73, p. 105-110, 1993.
- SCHEER, U., WEISENBERGER, D. The nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 6, p. 354-359, 1994.
- SCHMID, M., LOSER, C., SCHMIDTKE, J., ENGEL, W. Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma*, v. 86, p. 149-178, 1982.
- SCHRADER, H. S., SCHARADER, F. Polyteny as a factor in chromosomal evolution of the *Pentatomini* (Hemiptera). *Chromosoma*, v. 8, p. 135-151, 1956.
- SCHREIBER, G., PELLEGRINO, J. Cytogenetical studies on Brazilian Hemiptera. *Hereditas*, 1949. (VIII Internacional Congress of Genetics - Stockholm 1948).
- SCHREIBER, G., PELLEGRINO, J. Eteropicrosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione. *Scientia Genetica*, v. 3, p. 215-226, 1950.
- SCHREIBER, G., PELLEGRINO, J. Análise citológica e cariométrica da ação da colchicina sobre a espermatogênese dos hemípteros. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*, v. 49, p. 513-542, 1951.
- SCHREIBER, G., PENALVA DA SILVA, F. RESENDE, E. S., CAVENAGHI, T. M., CARVALHO, H. C. DNA synthesis in the spermatogenesis of triatomids. *Rev. Bras. de Pesquisa Med. Biol.*, v. 1, n.5-6, p. 245-252, 1968.
- SCHREIBER, G., BOGLIOLO, A. R., COELHO DE PINTO, A. Cytogenetics of triatominae: caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes. *Rev. Bras. Biol.*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 255-263, 1972.



- SCHREIBER, G., COELHO DE PINHO, A., PARENTONI R., SALGADO, A., B., GODOY Jr., T.L. Cytogenetics of Triatominae: II spermatogenesis in hibrid between *Triatoma infestans* and *Triatoma pseudomaculata* ( Hemiptera, Reduviidae). *Rev.Bras. de Biol.*, v. 34, n. 1, p. 1-9, 1974.
- SCHUETZ, M. J. C. Estudo da espermatogênese em *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 (Hemiptera, Reduviidae). São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. USP, 1989, 71p. Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas)-Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo, 1989.
- SCHWARZACHER, H. G., MIKELSAAR, A. V., SCNEDL, W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet. Cell. Genet.*, v. 20, p. 24-39, 1978.
- SCHWARZACHER, H. G., WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum. Genet.*, v. 63, p. 89-99, 1983.
- SCHWARZACHER, H. G., WACHTLER, F. The nucleolus. *Anat. Embryol.*, v. 188, p. 515-536, 1993.
- SENTÍS, C., SANTOS, J., FERNÁNDEZ-PIQUERAS, Breaking up the chromosomes of *Baetica ustulata* by in situ treatments with restriction endonucleases. *Genome*, v. 32, p. 208-215, 1988.
- SHAW, P. J., BEVEN A. F., WELLS, B., HIGHETT, M. I., JORDAN E. G. The organization of nucleolar activity in plants. *Journal of Microscopy*, v. 181, n. 2, p. 178-185, 1995.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A, MARCONDES, C. B., GUEDES, L. A, SIQUEIRA, G. S., BARONE, A., A., DIAS, J. C. P., AMATO NETO, V., TOLEZANO, J. E., PERES, B. A., ARRUDA Jr., E. R., LOPES, M. H., SHIROMA, M., CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas'disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 33, n. 3, p. 351-357, 1991.
- SILVEIRA, C. A . Epidemiologia e controle da doença de Chagas. *A saúde no Brasil*, v. 1, n. 4, p. 212-218, out./dez. 1983.
- SILVEIRA, A. C., REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical*. v. 27, supl III, p. 11-22, 1994.



- SOLARI, A. J. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma*, v. 72, p. 225-240, 1979.
- SOUSA, M., CARVALHEIRO, J. A cytochemical study of the nucleolus and nucleolus-related structures during human spermatogenesis. *Anatomy and Embryology*, v. 190, p. 479-487, 1994.
- SOUZA, M. J., KIDO, L. M. H. Variability of constitutive heterochromatin in karyotypes of representatives of the family Romaleidae (Orthoptera). *Brazilian Journal of Genetics*, v. 18, n. 4, p. 517-520, 1995.
- STEINDEL, M., TOMA, H. K., CARVALHO PINTO, C. J. GRISARD, E. C., SCIILEMPER JR., B. R., Colonização de ecótopos artificiais pelo *Panstrongylus megistus* na ilha de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 36, n. 1, p. 43-50, 1994.
- STÖBER, T., GÜNTHER, T., HESEMANN, C. U. Banding of rye (*Secale cereale*) chromosomes using the restriction enzymes *Alu* I, *Dra* I, *Hpa* II, *Msp* I. *Genome*, v. 36, p. 998-1002, 1993.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.*, v. 75, p. 304-306, 1972.
- SUMNER, A. T. The nature and mechanisms of chromosome banding. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, v. 6, p. 59-87, 1982.
- SUMNER, A. T. Banding with nucleases. In: Chromosome banding. Boston: Unwin Hyman, 1990, cap. 12, p. 253-271.
- SUMNER, A. T. Nucleolar organizers ( NORs). In: Chromosome banding. Boston: Unwin Hyman, 1990, cap.09, p.187-205.
- \* SUMNER, A. T. C-banding and related methods. In: Chromosome banding. Boston: Unwin Hyman, 1990, cap. 04, p.39-68.
- TAVARES, M. G. *Estudo citogenético em espécies do gênero Triatoma, com ênfase a estrutura dos cromossomos e região organizadora nucleolar*. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas.UNESP 1996, 141 p. Dissertação (Mestrado em Ciências



- Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 1996.
- TAVARES, M. G., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Aspectos Biológicos e Medico-Sanitários dos Triatomíneos. *HB Científica*, v. 3, n. 2, p. 137-144, 1996.
- TAVARES M. G., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Cytogenetic studies on holocentric chromosomes of five species of triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Cytobios*, v. 89, p. 51-61, 1997a.
- TAVARES M. G., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Pattern of nucleolar activity during spermiogenesis in triatomines (Heteroptera, Reduviidae) as analysed by silver staining. *Cytobios*, v. 89, p.93-103, 1997b.
- TOMBESI, M. L., PAPESCHI, A. G. Meiosis in *Haematopinus suis* and *Menacanthus stramineus* (Phthiraptera, Insecta). *Hereditas*, v. 119, p. 31-38, 1993.
- TORRE, J., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. In situ nick translation of meiotic chromosomes to demonstrate homologous heterochromatin heterogeneity. *Genome*, v. 36, p. 268-270, 1993.
- UESHIMA, N. Cytotaxonomy of the Triatominae ( Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma*, v. 18, p. 97-122, 1966.
- UESHIMA, N. Hemiptera II: Heteroptera. In: *Animal cytogenetics*. Berlim: Gebrüder Borntraeger, 1979, v. 3, Insecta: 6, p.1-117.
- VELASCO-HERNÁNDEZ, J. X. An epidemiological model for the dynamics of Chagas'disease. *Biosystems*, v. 26, p. 127-134, 1991.
- VENDRAME, M. R., CELLA, D. M. C bands and nucleolar organizer regions (NORs) in *Peruvia nigromarginata* ( Orthoptera, Acrididae, Gomphocerinae). *Naturalia*, v. 18, p. 207-219, 1993.
- VERMA, R. ,S. A biology of heterochromatin. In: *Heterochromatin*. New York: Cambride University Press, 1988, cap. 1, p. 1-25.



- VIÑAS, A., GÓMEZ, C., MARTÍNEZ, P., SÁNCHEZ, L. Induction of G-banding on *Anguilla anguilla* chromosomes by the restriction endonucleases *Hae* III, *Hinf*I, and *Mse*I. *Cytogenet Cell Genet*, v. 65, p. 79-81, 1994.
- VIRKKI, N., DENTON, A. Silver staining of the elements of spermatogenesis in *Oedionychina* (Chrysomelidae:Alticinae). *Hereditas*, v. 106, p. 37-49, 1987.
- WACHTLER, F., STAHL, A. The nucleolus: A structural and functional interpretation. *Micron.*, v. 24, n. 5, p. 473-505, 1993.
- WANDERLEY, D. M. V., CARVALHO, M. E., MANTEGAZZA, E., YASUMARU, S. BARATA, L. C. B. Infecção chagásica transfusional detectada no programa de controle da doença de Chagas no Estado de São Paulo (Brasil). *Rev. Saúde Pública*, v. 26, n. 3, p. 203-205, 1992.
- WANDERLEY, D. M. V., GONZALES, T. T., PEREIRA, M. S. C. A., NASCIMENTO, R. D., MORAES-SOUZA, H. Controle da hemoterapia e da doença de Chagas transfusional: 1988 e 1990. *Rev. Saúde Pública*, v. 27, n. 6, p. 403-405, 1993.
- WARCHALOWSKA-SLIWA, E., MARYANSKA-NADACHOWSKA, A. Karyotype, C-bands, and NORs locations in spermatogenesis of *Isophya brevipennis* Brunner (Orthoptera:Phaneropteridae). *Caryologia*, v. 45, n. 1, p. 83-89, 1992.
- WARCHALOWSKA-SLIWA, E., BUGROV, A. G., NADACHOWSKA, M. Kariotypes, C-banding pattern, and NORs of the Genus *Montana zeuner* 1941 (Orthoptera, Tettigonioidea, Decticinae). *Folia Biologica (Kraków)*, v. 42, n. 3-4, 1994.
- WHITE, M. J. D. Endomitosis and endopolyploidy. In: *Animal cytology and evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1973, cap. 3, p. 75-86.
- WOLF, K. W. The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. *Int. J. Insect. Morphol. & Embryol.*, v. 25, n. 1/2, p. 37-62, 1996.



### ABSTRACT

The object of the present work was to realize a comparative study between two species of the genus *Panstrongylus* (*P. herrei* and *P. megistus*), through the analysis of the different phases of spermatogenesis, nucleolar cycle accompaniment, nucleolar organizer region (NOR) localizations, study of heterocromatic pattern arrangement on meiotic chromosomes and correlation of cytogenetical differences and similarities between *P. herrei* and *P. megistus*, all aiming to corroborate the understanding of the evolutive process which has occurred between these species.

The cytologic preparations of the testes were obtained by conventional methods of cell smears followed by orcein lacto-acetic staining, silver nitrate impregnation, C-banding and *Hae* III and *Alu* I restriction endonucleasis banding.

*Panstrongylus megistus* and *Panstrongylus herrei* presented, respectively,  $2n=18+X_1X_2Y$  and  $2n=20+X_1X_2Y$  karyotypes. In the Heteroptera the more primitive species belong to the family Pentatomidae, with  $2n=14$  chromosomes and XY sex system for males. Most of the other Heteroptera possess a chromosome complement with more chromosomes and are considered more recent. Thus, evolutionarily, *Panstrongylus herrei* is a more derived species than *Panstrongylus megistus*. The two species, as well as others, do not present primary constrictions, suggesting that the chromosomes are holocentric, which corroborates the hypothesis of holocentric chromosomes in Heteroptera.

The sex chromosome system in *Panstrongylus* is the  $X_1X_2Y$  type and C-banding and restriction endonuclease experiments indicate that the two X chromosomes of *Panstrongylus megistus* and *Panstrongylus herrei* possess similar behaviour as to digestibility degree and positive and negative C-banding regions, suggesting a common origin by single X fragmentation, an hypothesis also well accepted in literature. The X chromosomes are more fragile than the Y, and fragment survival is facilitated by post reductional meiosis and the holocentricity of the chromosomes.

In *Panstrongylus megistus* and *Panstrongylus herrei* the sex chromosomes were positively heteropycnotic at early prophase and maintained themselves together during the confused stage. In metaphase I the heterochromosomes occurred perpherically, individually and isopycnotic, similar to the autosomes. In metaphase II the heterochromosomes occurred within the autosome ring, which suggests pseudotrivalent formation and corroborates the post reductional behaviour of these chromosomes.

During spermatogenesis cellular cyst formations were observed. The cells are enclosed in an involucre of mesodermic origin and continue in this state until their differentiation, subsequently being released in the testicolymph. The spermatocytes suffer great numbers of multiplications in the cyst. These multiplications cause a



volume reduction, which problem is resolved through energy supplied by polyploid nuclei. *Panstrongylus megistus* and *Panstrongylus herrei* presented these nuclei with a single heterochromatic corpuscle.

With silver ion impregnation, the *Panstrongylus megistus* and *Panstrongylus herrei* heterochromosomes showed nucleolar organizer activity with strong impregnations at meiotic prophase I. There were also observed ligations of one or two autosomes with the nucleolar region. The data suggest nucleolar fragmentation, since from metaphase I corpuscles and nucleolar fragments were observed within the cell. Also it was verified that in these Heteroptera reactivation of post meiotic rRNA synthesis occurs, probably related with cell differentiation.

The analysis of meiotic chromosomes with C-banding showed *Panstrongylus megistus* and *Panstrongylus herrei* to present interstitial and terminal bands on autosomes, a common pattern in Heteroptera. The terminal bands corroborate the hypothesis that in the holocentric chromosomes the heterochromatin is preferentially localized close to the telomeres. The sex chromosomes in *P. herrei* behaved totally heterochromatically during spermatogenesis and in *P. megistus* the X chromosomes changed between positive and negative banding. There was coincidence between positive C-bands and NOR in the sex chromosomes and spermatids in early differentiation.

Restriction endonucleases, *Hae* III and *Alu* I, in *P. megistus* and *P. herrei*, presented in great part enzymatic patterns similar to C-banding, suggesting the presence of the same heterochromatin type in the coincidence regions. However some heterochromatin digestion patterns were distinct, for example, in *P. megistus* polyploid nuclei (*Hae* III), *P. herrei* prophase I (*Hae* III) and pachytene of both species (*Hae* III and *Alu* I). The *P. herrei* X chromosomes treated with *Hae* III presented enzymatic digestion which suggests the presence of heterochromatin different from that of C-banding. In *P. megistus* these chromosomes were heterochromatic and also exhibited a distinct pattern from C-banding, in that the X chromosomes were alternatively heterochromatic. This work suggests that other elements besides recognition sites, such as chromatin wrappage degree and protein-DNA interaction, influence REs results, since, *P. megistus* and *P. herrei*, showed a digestion pattern in early spermatogenesis, but metaphase chromosomes were practically inaccessible to the action of endonucleases.



