

NATHÁLIA PAIVA PEREIRA

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) NA
ESPERMATOGÊNESE DE TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA:
REDUVIIDAE)**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas (IBILCE/UNESP)
– São José do Rio Preto para
obtenção do título de Mestre em
Biologia Animal.

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

São José do Rio Preto – SP

2015

NATHÁLIA PAIVA PEREIRA

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) NA
ESPERMATOGÊNESE DE TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA:
REDUVIIDAE)**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Titulares:

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE-UNESP.
(Presidente e Orientadora)

Profa. Dra. Grasiela Dias de CamposSeveri-Aguiar
Centro Universitário Hermínio Ometto FHO-UNIARARAS.

Profa. Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE-UNESP.

São José do Rio Preto, 06 de Março de 2015

Pereira, Nathália Paiva.

Influência da contaminação por *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) na espermatogênese de tristomíneos (Hemiptera: Reduviidae) / Nathália Paiva Pereira. – São José do Rio Preto, 2015
100 f. : il., tabs.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia. 2. Citogenética. 3. Barbeiro (Inseto) 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. Stress (Fisiologia) 6. Espermatogênese. I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
III. Título.

CDU – 576.3:575

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular, junto ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE), com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.

Ao meu pai, Paulo Sérgio Pereira,
e a minha mãe, Ivone Paiva da Silva Pereira
os gigantes sobre os quais eu me apoio.

Agradecimentos

Nesse momento especial, algumas pessoas merecem ser lembradas:

Aos meus pais, Paulo Sérgio Pereira e Inove Paiva da Silva Pereira, pois não consigo imaginar minha vida sem eles. A dedicação em minha criação mesmo com tantas dificuldades é uma lição de vida a ser seguida. O apoio de vocês foi essencial para que eu esteja aqui neste momento.

Ao meu namorado, Flávio Dias da Silveira, pois eu não poderia encontrar um companheiro melhor. Nesses quase seis anos amadureci ao seu lado e sei que você me apoiará em qualquer decisão que eu tomar, estando sempre ao meu lado.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Terecilia, a que eu me orgulho de dizer que sou sua orientada. Obrigada por todos os ensinamentos, a compreensão, os elogios, as críticas sempre gentis e a disponibilidade em me atender para qualquer problema. Sempre me lembrar-sei da acolhida no Laboratório de Biologia Celular, logo no

primeiro mês de graduação, e da oportunidade de me tornar uma bolsista por mérito acadêmico.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e a CAPES, por todo o apoio em minha carreira acadêmica. O orgulho que possuo ao dizer que sou formada pela Unesp Câmpus de São José do Rio Preto é a maior prova do meu amor por este local.

A minha co-orientadora de iniciação científica Dra. Priscila Pasquetto Mendonça, que confiou em mim, sempre me ensinou como ser uma profissional, que me viu crescer em vários sentidos e que além de tudo sempre será uma grande amiga.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular, em especial ao Msc. Raio César Chaboli Alvi e Msc. Ana Letícia Guerra.

Ao Raio pela ajuda nos aspectos científicos, pelas conversas estimulantes, pelo brilho nos olhos perante a ciência e pelo incentivo sempre. Além disso, obrigada pelas risadas, pelas viagens, pelas festas, pelas bobagens faladas e pela diversão na bancada do laboratório.

A Ana Letícia, obrigada pelo companheirismo, pela cumplicidade, pelas fofocas e desabafos que tornaram os dias mais leves. Pelos passeios nos shoppings, pelas conversas pelo celular e por estar presente em tantos momentos.

A Msc. Glaucia G. Basso e Midori Cristina Okubo, pelo
companheirismo no ambiente de trabalho e pelo apoio durante o
mestrado.

Para meus amigos da faculdade e de antes dela. Gostaria de
agradecer principalmente a Keila Dantas, pela companhia na moradia
estudantil, a Ana Beatriz Bortolozo, pela amizade sincera, a Nayara
Cattozatto, por ser a melhor conselheira, a Anna Claudia Campaner,
pelos momentos divertidos na Atlética, ao Vinicius Armelin, pelas
discussões científicas, ao Tayron Perçira, pelos trabalhos mais
divertidos, ao Rafael Daltro, pelas conversas inteligentes, a Nathalia
Rossigali, por ser a melhor companheira de festas, a Jullienne
Hespportz, pelas conversas do whatsapp e a Faila Santos e Vania
Sabion pela presença desde sempre e para sempre. Obrigada a todos
por fazer meus últimos anos tão divertidos.

Para todos os professores que passaram pelo meu caminho, desde o
jardim de infância até o último ano de graduação. Nenhum
profissional pode chegar a qualquer lugar sem antes passar por
diversos professores.

São tantos momentos nestes seis anos de São José do Rio Preto, que
é difícil colocar todos aqui. Mas quero agradecer a todos que fizeram
parte desses anos. Obrigada!

If I have seen further it is by
standing on the shoulders of Giants

Isaac Newton

Sumário

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO	16
1.1. Doença de Chagas	17
1.2. Biologia e evolução da subfamília Triatominae	20
1.3. Os efeitos da doença de Chagas nos triatomíneos.....	22
1.4. Estresse Fisiológico	24
1.5. Citogenética dos Triatomíneos	26
1.6. As variações do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
OBJETIVOS	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Obtenção e procedência dos insetos	36
3.2. Manutenção e alimentação dos insetos.....	36
3.3. Infecção dos insetos	37
3.4. Órgão analisado.....	38
3.5. Dissecção dos insetos.....	38
3.6. Fixação dos túbulos seminíferos.....	39
3.7. Preparação das lâminas.....	39
3.8. Técnicas citogenéticas convencionais.....	40
3.8.1. Orceína lacto-acética	40
3.8.2. Impregnação por íons prata.....	41
3.8.3. Reação de Feulgen	42
3.8.4. Fotodocumentação dos resultados	43
3.9. Quantificação celular.....	43
RESULTADOS	45
4.1. Orceína Lacto-Acética	46
4.1.1. <i>Triatoma brasiliensis</i>	46
4.1.2. <i>Rhodnius neglectus</i>	48
4.1.3. <i>Panstrongylus megistus</i>	50
4.2. Impregnação por íons prata.....	52
4.2.1. <i>Triatoma brasiliensis</i>	52
4.2.2. <i>Rhodnius neglectus</i>	54
4.2.3. <i>Panstrongylus megistus</i>	56
4.3. Reação de Feulgen.....	58
4.3.1. <i>Triatoma brasiliensis</i>	58

4.3.2. <i>Rhodnius neglectus</i>	61
4.3.3. <i>Panstrongylus megistus</i>	63
4.4. <i>Quantificação celular</i>	65
4.4.1. <i>Triatoma brasiliensis</i>	65
4.4.2. <i>Rhodnius neglectus</i>	67
4.4.3. <i>Panstrongylus megistus</i>	68
DISCUSSÃO.....	70
CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXO	92

Resumo

Os insetos da subfamília Triatominae, também conhecidos como barbeiros, possuem uma grande importância na parasitologia humana, pois são vetores do *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas. Além da importância médico-sanitária, esses insetos destacam-se na citogenética, por apresentarem características peculiares como cromossomos holocêntricos, e uma meiose incomum, na qual os autossomos segregam-se de maneira regular, enquanto que os cromossomos sexuais apresentam a primeira divisão equacional e a segunda reducional. Além disso, diversos estudos são realizados para identificar os efeitos do estresse fisiológico no organismo desses insetos. Entretanto, não há estudos avaliando a influência da contaminação de triatomíneos pelo *Trypanosoma cruzi* na reprodução desses indivíduos. Para isso foram analisadas as características citogenéticas durante a espermatogênese de três espécies de triatomíneos: *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius neglectus* e *Panstrongylus megistus*, que foram infectadas em laboratório, pelo *T. cruzi*. Posteriormente, foram confeccionadas lâminas com os testículos desses insetos e coradas por técnica citogenéticas convencionais e, também, realizada contagem celular para verificar quantitativamente as células presentes nos testículos. Foi possível observar um aumento no tamanho celular dos núcleos poliploides, células nutritivas presentes nos túbulos seminíferos, e de todas as células durante a espermatogênese, além de uma desorganização no material nuclear e nucleolar durante a divisão celular. Além disso, foi observado um decréscimo nas quantidades celulares de indivíduos contaminados, com aumento no número de núcleos poliploides e células em intérfase, e uma diminuição de células em divisão. Essas alterações podem ter ocorrido devido ao estresse fisiológico que a infecção por *T. cruzi* causou ao organismo desses insetos. Além disso, as células em intérfase e em início de condensação cromossômica apresentaram corpúsculos heteropicnóticos maiores nos organismos contaminados do que naqueles que estavam livres do protozoário causador da doença de Chagas demonstrando que o estresse fisiológico pode ser o principal motivo para essa mudança nos padrões celulares, ocasionando uma remodelação no organismo para que este possa suportar a infecção e gerando alterações na gametogênese.

Palavras-chave: Triatomíneos, estresse fisiológico, espermatogênese, *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

The insects of the Triatominae, also known as barbers, have a great importance in human parasitology, as are vectors of *Trypanosoma cruzi* protozoan that causes Chagas disease. In addition to medical and health importance, these insects stand out in cytogenetics, due to peculiar characteristics as holocentric chromosomes, and an unusual meiosis, in which the autosomes segregate regularly, while the sex chromosomes present the first equational division and the second reductive. In addition, several studies are conducted to identify the effects of physiological stress in the body of these insects. However, there are no studies evaluating the influence of contamination of insects *Trypanosoma cruzi* in the reproduction of these individuals. For this, we analyzed the cytogenetic characteristics during spermatogenesis three triatomine species: *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius neglectus* and *Panstrongylus megistus*, which were infected in the laboratory with *T. cruzi*. Later blades were made with the testicles of these insects and stained by conventional cytogenetic technique and performed cell counts to quantitatively determine these cells in the testes. It was possible to observe an increase in cell size of polyploid nuclei, nutritional cells present in the seminiferous tubules and all cells during spermatogenesis, plus a disruption in nuclear and nucleolar during cell division. Furthermore, there was a decrease in cell quantities given infected individuals, an increase in the number of polyploid cells and nuclei in interphase, and a decrease in cell division. These changes may be due to physiological stress that infection with *T. cruzi* caused to the body of these insects. In addition, cells in interphase and early chromosome condensation had higher heteropycnotic corpuscles in contaminated than in those who were free of protozoan that causes Chagas disease showing that the physiological stress organisms may be the main reason for this change in cellular standards, causing a reshuffle in the body so that it can withstand infection without suffering losses.

Key-words: Triatomines, physiological stress, spermatogenesis, *Trypanosoma cruzi*.

1.1. Doença de Chagas

Os triatomíneos possuem grande importância para a parasitologia humana, pois são transmissores do *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado causador da doença de Chagas. Esses insetos são hematófagos e pertencem à ordem Hemiptera e à família Reduviidae. Transmitem a doença por seu hábito de defecar, após a hematofagia, sobre os olhos, nariz, boca e outras áreas próximas, visto que esses insetos sugam sangue até a saciação. Nesse momento ocorre a passagem das fezes do artrópode para a circulação sanguínea do hospedeiro - o que também pode ocorrer por meio de micro cortes causados pelo ato de coçar o local por onde o barbeiro sugou o sangue. Os insetos da ordem Hemiptera podem ser organismos fitófagos (família Pentatomidae), predadores e hematófagos, sendo os dois últimos características da família Reduviidae (SCHOFIELD, 2000).

Os indivíduos pertencentes à subfamília Triatominae desenvolveram-se a partir de vários grupos da família Reduviidae. Primeiramente, apresentavam hábito alimentar predador nos ninhos de aves e mamíferos onde residiam há 50 milhões de anos quando passaram, então, a fases de hematofagia facultativa até atingirem a hematofagia obrigatória (SCHOFIELD et al., 1999).

O *T. cruzi* é um parasito de muitos hospedeiros, capaz de infectar dezenas de espécies de mamíferos silvestres e domésticos pertencentes a oito diferentes ordens. As aves e os vertebrados de sangue frio são refratários ao parasito. Esse flagelado encontra-se distribuído em todas as regiões fitogeográficas do país, sendo encontrado nos mais diversos nichos ecológicos, contribuindo, em cada tipo de ecótopo, para formar modalidades distintas de focos naturais de transmissão. Como

parasito de animais silvestres, podemos encontrar diferentes espécies de mamíferos sustentando distintos ciclos de transmissão que podem estar isolados ou conectados. Este caráter é particular e único para cada localidade. Alguns mamíferos silvestres como quatis, gambás e tatus aproximam-se das casas, frequentando galinheiros, currais e depósitos na zona rural e periferia das cidades. De fato os gambás são atualmente considerados como uma espécie sinantrópica, muito mais do que silvestre. Outros animais, como os morcegos, compartilham ambientes com o homem e animais domésticos. Deste modo, essas espécies podem servir como fonte de infecção aos triatomíneos que ocupam os mesmos habitat dos humanos (NOIREAU et al., 2009).

Inicialmente, a doença de Chagas foi considerada uma doença exclusiva das Américas (CHAGAS, 1909; MONCAYO, 2003). Atualmente porém, diversos casos da doença de Chagas já foram relatados nos Estados Unidos (BERN; MONTGOMERY, 2009), Canadá (STELLE et al., 2007), países europeus tais como Suíça (JACKSON et al., 2008), Espanha, França e Itália (SCHMUNIS, 2007; BERN; MONTGOMERY, 2009; GASCÓN et al., 2010; SCHMUNIS; YADÓN, 2010; STRASEN et al., 2014) e também em alguns países do Pacífico como a Austrália, Nova Zelândia (JACKSON et al., 2014) e Japão (UENO et al., 1995; GASCÓN et al., 2010). Dessa forma, o índice de imigração de indivíduos chagásicos para regiões não endêmicas ajuda a explicar o motivo pelo qual a doença de Chagas pode ser encontrada pelo mundo inteiro (LUQUETTI, 1995; GUERRI-GUTEMBERG, 2008; DEVELOUX, 2009; MILEI et al., 2009).

A contaminação com o parasita pode ocorrer de diversos modos, tais como: *i*) transmissão congênita, *ii*) transfusão sanguínea, transplantes de órgãos de pacientes infectados e a *iii*) forma oral que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente caldo de cana de açúcar e açaí. Entretanto, a principal forma de contágio

ainda é a transmissão do protozoário pelos triatomíneos, vetores conhecidos como “barbeiros” (WHO, 2007; MONCAYO; RASSI JR et al., 2009; SILVEIRA, 2009).

A doença de Chagas é a parasitemia que ocasiona o problema de saúde humana de maior impacto sócio-econômico na América Latina (MOREL, 2003; GUERRI-GUTTEMBERG, 2008; BENCHIMOL-BARBOSA, 2009). Estima-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, principalmente nas Américas Central e do Sul onde a doença de Chagas é endêmica. Mais de 25 milhões de pessoas correm o risco de contrair a doença e estima-se que, em 2008, a doença de Chagas matou mais de 10 000 pessoas (WHO, 2011). No território brasileiro, o número de infectados é estimado em dois milhões e meio de indivíduos (NETO, 2009). Devido à falta de medicamentos *anti-trypanosomal*, o principal método de controle da doença tem sido o controle de vetores (WHO, 2011), o que demonstra a importância de estudos que auxiliem no controle da doença de Chagas.

Para a profilaxia da doença de Chagas, temos que associar dados biológicos dos reduvídeos, que fornecem informações 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, como por exemplo ensaios citogenéticos que comparam padrões cromossômicos que podem ser aplicados ao estudo da filogenia dos triatomíneos (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1996; TARTAROTTI, 1999).

Todas as 148 espécies de triatomíneos reconhecidas atualmente (ABADFRANCH et al., 2013; ALEVI et al., 2013; JURBERG et al., 2013; MONTE GONÇALVES et al., 2013) são encontradas principalmente nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009),

sendo todas potenciais vetores da doença de Chagas. Os adultos de ambos os sexos e os cinco ínstares das espécies pertencentes a esta subfamília de hematófagos que necessitam, pelo menos, de uma refeição de sangue total em cada muda. Portanto, essas espécies são potenciais vetores de *T. cruzi*, a partir de seus estágios iniciais, uma vez que podem adquirir a infecção desde a sua primeira alimentação. Sendo assim, existem inúmeras espécies de hábitos peridomiciliar ou silvestre que também são competentes vetores de *T. cruzi*, e, ocasionalmente, são encontradas dentro ou ao redor das habitações humanas (LENTI; WYGODZINSKY, 1979; SCHOFIELD, 1988; SAINZ et al., 2004).

1.2. Biologia e evolução da subfamília Triatominae

Os triatomíneos estão inseridos na ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae (LENTI; WYGODZINSKY, 1979). Classificados principalmente em relação a sua morfologia externa, as espécies desse grupo se encontram organizadas em seis tribos composta por 18 gêneros (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; ALEVI et al., 2013).

Além da classificação taxonômica clássica, os triatomíneos também foram agrupados em complexos e subcomplexos de acordo com sua morfologia e distribuição geográfica (LENTI; WYGODZINSKY, 1979; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009) e, mais recentemente, a partir da filogenia molecular (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009).

Além do grande interesse epidemiológico, outras importantes questões em torno da sistemática e filogenia desses insetos também precisam ser estudadas. É relevante

ressaltar que essas questões não são apenas importantes na sistemática, mas também na compreensão e controle da doença de Chagas (SCHAEFER, 2003).

Devido às grandes diferenças entre as duas principais tribos Triatomini e Rhodniini, Schofield (1988) considera que esses insetos derivaram de ancestrais distintos. Essa hipótese é suportada devido aos hábitos alimentares de certos triatomíneos e suas relações estreitas com determinados hospedeiros, indicando a origem independente desse grupo (CARCAVALLO et al., 1999). A origem polifilética também é apoiada pela morfologia desses insetos (LENT; WYGODZINSKY, 1979), por marcadores bioquímicos (DUJARDIN et al., 1999) e padrões de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (GARCÍA et al., 1998). Análises de genes mitocondriais (STOTHARD et al., 1998; LYMAN et al., 1999) e nucleares (MARCILLA et al., 2000, 2002; DE PAULA et al., 2005) também corroboram a origem polifilética dos triatomíneos.

Devido a baixa quantidade de espécies e de número de indivíduos analisados, a origem polifilética é questionável (HYPSA et al., 2002; SCHAEFER, 2003), e alguns estudos suportam a hipótese de que a origem dos triatomíneos a partir de um único ancestral seja a mais provável (USINGER, 1944; LENT; WYGODZINSKY, 1979; GAUNT; MILES, 2000; HYPSA et al., 2002; SCHAEFER, 2003; WEIRAUCH; MUNRO, 2009; JUSTI et al., 2014). Baseado no hábito de hematofagia compartilhado pelo grupo sugere-se que essa subfamília tenha se originado como um grupo monofilético a partir de insetos hematófagos facultativos da subfamília Physoderinae (USINGER, 1944; LENT; WYGODZINSKY, 1979; HYPSA et al., 2002). A adaptação à hematofagia pode ter ocorrido uma única vez e, dessa forma, todas as espécies compartilhariam um ancestral comum (LENT; WYGODZINSKY, 1979; GAUNT; MILES, 2000; HYPSA et al., 2002). Essa hipótese é baseada em caracteres apomórficos

como o rostro reto e fino, antenas inseridas lateralmente e ausência de glândulas abdominais dorsais (HYPSA et al., 2002). Apesar dos inúmeros estudos realizados, ainda não há um consenso entre os autores em relação à origem dos triatomíneos e a origem filogenética de muitas tribos e gêneros de triatomíneos continua a ser discutida (HWANG; WEIRAUCH 2012).

1.3. Os efeitos da doença de Chagas nos triatomíneos

Os peptídios antimicrobianos (AMP) estão amplamente distribuídos em diversos organismos, tanto animais como plantas. Apesar de partilhar algumas características comuns, tais como um tamanho pequeno (normalmente abaixo de 10kDa) e um caráter catiônico, a maioria dos AMPs diferem na sua sequência de aminoácidos e modo de ação (FOGAÇA et al., 2004). Dentro desta família, as defensinas (*defs*) constituem uma das principais famílias que têm sido caracterizadas (BULET et al., 2002).

Este peptídeo pode ser encontrado em diferentes organismos, tais como plantas, fungos, moluscos, escorpiões, insetos e aves, e também em diferentes células de diversas espécies de mamíferos. Nos seres humanos, insetos e plantas, as defensinas contribuem de forma significativa para a defesa do hospedeiro contra a invasão de microorganismos (RAJ; DENTINO, 2002). Em insetos, os AMPs são sintetizados principalmente no corpo gorduroso e a transcrição de seu gene é fortemente induzida após uma lesão e / ou infecção (BULET et al., 2002).

As defensinas foram isoladas e caracterizadas como parte da resposta imune inata a partir da hemolinfa de diferentes espécies investigadas, pertencentes às ordens como Odonata, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Acari e Hemiptera

(BARTHOLOMAY et al., 2004). Em triatomíneos, as defensinas foram investigadas em *R. prolixus*, sendo isoladas, purificadas e sequenciadas (LOPEZ et al., 2003). Esses AMPs são reguladores da resistência no intestino de *T. brasiliensis*, observados durante a infecção de *T. cruzi* (WANIEK et al. 2011).

A expressão de *def1* é induzida por organismos que habitam o intestino, levando a uma gama ampla e a maior abundância da proteína. Assim a quantidade elevada de RNAm *def1* presente no intestino pode ser uma resposta a infecção por *T. cruzi*, sendo possivelmente, uma molécula de sinalização na cascata imune (BOULANGER et al 2006). Entretanto, se *def1* é ativa contra tripanossomas, sua função pode ser restrita para controlar a população de parasitos e não ser responsável por sua eliminação (WANIEK et al. 2009).

Com o aumento da atividade antimicrobiana no organismo dos triatomíneos foram observados níveis aumentados na produção de peptídios antimicrobianos endógenos (defensina e lisozima) no intestino / gordura corporal após a infecção por *T. cruzi* ou bactérias (ARAÚJO et al., 2006; URSIC-BEDOYA; LOWEMBERGER, 2007). Waniek e colaboradores em 2011 demonstraram um aumento significativo da transcrição da defensina em *T. brasiliensis* em resposta à infecção pelo *T. cruzi*, sugerindo uma função potencial de defensina no controle da população de parasitos intestinais. Uma vez infectado, os triatomíneos apresentam altas densidades parasitárias no intestino, que só são reduzidos após longos períodos de fome (KOLLIEN; SCHAUB, 2000; ARAÚJO et al. 2007).

De acordo com análises de Real Time-PCR feitas por Araújo et al. (2006), o nível de expressão do gene da defensina encontrada no intestino, é 500-2500 vezes mais elevada do que no estômago. Na região cardíaca, a expressão é baixa. O curso do tempo

de expressão segue o mesmo padrão do gene da lisozima, onde há um aumento após a alimentação e uma diminuição entre 5 e 10 dias após a alimentação.

Sendo assim, o organismo dos barbeiros passa por períodos de estresse fisiológico extremo, no qual todo o organismo reage à infecção causada pelo *T. cruzi*. Considerando que o organismo infectado priorize a defesa do indivíduo, alocando recursos para atuar na síntese de *def1*, procurou-se verificar o estado fisiológico e as características reprodutivas dos testículos dos triatomíneos, por meio da citogenética.

1.4. Estresse Fisiológico

Os seres vivos sobrevivem graças à manutenção de um equilíbrio complexo, dinâmico e harmonioso, denominado homeostase, que é ameaçado quando os organismos são expostos a situações adversas. Nestas situações ocorre uma série de respostas adaptativas que se contrapõem aos efeitos dos estímulos estressantes, na tentativa de restabelecer a homeostasia (CASSEB-HASSAN, 2001).

O efeito negativo do estresse sobre o desempenho reprodutivo é bem conhecido, entretanto os exatos mecanismos que controlam esse efeito não estão bem esclarecidos (RAZDAN et al., 2002).

Células de todos os organismos respondem a uma variedade de condições estressantes por meio de uma rápida transcrição e subsequente tradução de uma série de proteínas altamente conservadas, denominadas genericamente de proteínas de estresse (LOCKE et al., 1990). O termo “proteína de estresse” tem caráter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular (WELCH, 1993).

Quando ocorre um súbito aumento na temperatura, todas as células desde a bactéria mais simples até o neurônio mais altamente diferenciado aumentam a produção da classe de moléculas que as protegem dos danos. Foi observado o fenômeno pela primeira vez há mais de trinta anos, chamado de resposta ao choque de calor (*heat shock response*). Estudos subsequentes revelaram que a mesma resposta ocorre quando as células são submetidas a uma ampla variedade de alterações ambientais, incluindo metais tóxicos, álcoois e muitos venenos metabólicos. Devido ao fato de que muitos diferentes estímulos promovem o mesmo tipo de mecanismo de defesa celular, os pesquisadores referem-se comumente a ele como “resposta ao estresse” e as moléculas expressas neste fenômeno como “proteínas de estresse” (WELCH, 1993).

Na procura pelo entendimento da estrutura e das funções das “proteínas de estresse”, tem-se aprendido que são muito mais do que apenas moléculas defensivas. Ao longo do ciclo de vida de uma célula, muitas dessas proteínas participam de processos metabólicos essenciais incluindo as etapas pelas quais todas as outras proteínas celulares são sintetizadas e agrupadas. Algumas proteínas de estresse parecem orquestrar as atividades das moléculas que regulam o crescimento e a diferenciação celular (WELCH, 1993).

O acúmulo de evidências confirmou que as “proteínas de estresse” podem desempenhar um papel ativo na defesa celular. Foram identificados e isolados os genes que codificam para as proteínas de estresse individuais. Mutações nestes genes produzem interessantes anormalidades celulares. Por exemplo, bactérias que portam mutações nos genes que codificam muitas das proteínas de estresse, exibem defeitos na síntese de DNA e RNA, perdem sua habilidade de sofrer divisão celular normal e parecem incapazes de crescer em temperaturas mais elevadas (WELCH, 1993).

Muitos dos genes que codificam para proteínas de estresse são notavelmente similares em todos os organismos e muitas proteínas de estresse são também expressas em muitas células normais e não estressadas e não apenas traumatizadas. Consequentemente, as proteínas de estresse foram subdivididas em dois grupos: as constitutivamente expressas sob condições normais de crescimento e aquelas induzidas somente em células que sofrem estresse (CASSEB-HASSAN, 1997).

Uma vez estabelecido um papel para algumas proteínas de estresse como associadas a nível molecular nas células saudáveis e não estressadas, os investigadores tem voltado sua atenção para a determinação de porque essas proteínas são expressas em níveis mais altos em células sob estresse e como esses fatores influenciam as diferentes partes do organismo (WELCH, 1993).

Diversas alterações são ocasionadas ao organismo dos insetos quando estes não estão em seu estado fisiológico perfeito. O estudo de Holland e Whitl, em 1982, demonstrou o efeito de alguns metais pesados, principalmente o cobre, como agentes espermicidas, onde a motilidade dos espermatozoides foi alterada irreversivelmente. No caso da contaminação, percebe-se que as alterações ocorrem desde os estágios iniciais da espermatogênese.

1.5. Citogenética dos Tritatomíneos

Citogeneticamente, o interesse sobre os triatomíneos está em seus cromossomos com cinetócoros difusos (UESHIMA et al. 1966; PANZERA et al. 1995), ou seja, com distribuição ao longo do cromossomo ao invés da localização na região centromérica. A meiose desses insetos também merece destaque, pois na primeira divisão (anáfase I) os

autossomos são quiasmáticos e segregam-se regularmente e os cromossomos sexuais são aquiasmáticos e dividem-se equacionalmente, com segregação desses na segunda divisão (anáfase II), ou seja, com segregação dos cromossomos sexuais pós-reducional (UESHIMA, 1966; SOLARI, 1979).

Estudos citogenéticos revelam que o número diplóide de cromossomos nos machos de Triatominae varia de $2n = 20$ a $2n = 25$ sendo, $2n = 22$ ($20A + XY$) o número cromossômico frequentemente encontrado (UESHIMA, 1966). Entretanto, existem as seguintes exceções para o número de autossomos: *Triatoma nitida* e *Panstrongylus megistus*, $2n = 21$ ($18A + X_1X_2Y$) e *Triatoma rubrofasciata* $2n = 25$ ($22^a + X_1X_2Y$), caracterizando, assim, a heterogeneidade cromossômica (PANZERA et al., 1996).

O sistema sexual de determinação do sexo nos machos da subfamília Triatominae varia entre XY, X_1X_2Y ou $X_1X_2X_3Y$. Desta maneira, as variações de 21 a 25 que ocorrem no conjunto diplóide desses insetos devem-se, principalmente, ao arranjo desses cromossomos. De acordo com Schrader (1947) e White (1973), a hipótese mais aceita para explicar a origem desses múltiplos cromossomos sexuais, é a presença de diferentes eventos de fissão, originando uma fragmentação do cromossomo X original do macho.

No Brasil, as análises citogenéticas de triatomíneos foram iniciadas quando Schreiber e Pellegrino (1948) estudaram o cariótipo de onze espécies. Desde então, estudos citogenéticos com esses vetores têm sido concentrados em técnicas convencionais de coloração cromossômica (SCHREIBER; PELLEGRINO, 1951; UESHIMA, 1966; SOLARI, 1979; PANZERA et al., 1995; SEVERI-AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2005; BARDELLA et al., 2008).

Estudos citogenéticos também se mostram de grande importância devido às observações de alterações na estrutura das células germinativas. A impregnação por íons prata promove uma impregnação nucleolar nas seguintes proteínas: a C23 indicando a presença da cromatina descondensada, ligada à Região Organizadora Nucleolar (RON), e a B23 que indica a localização dos precursores ribossomais (OSCH; BUSH, 1984) as quais, quando alteradas, sugerem modificações em nível proteico. Com a técnica de bandamento-C, o DNA da heterocromatina constitutiva não é totalmente extraído, uma vez que sua associação com as proteínas, nesta estrutura, é mais resistente que na eucromatina (GUERRA, 1988). Alterações no padrão de bandamento podem indicar alterações estruturais nos cromossomos.

Outro alvo de estudo para vários autores têm sido as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) em Hemiptera (CAMACHO et al., 1985; FOSSEY; LIEBENBERG, 1995; PAPESCHI; CATTANI, 2004, SEVERI-AGUIAR & AZEREDO-OLIVEIRA, 2005). Essas regiões com as quais os nucléolos se associam e que são responsáveis pela reorganização desses, no final da divisão celular, também abrigam o DNA ribossômico, que é transcrito em RNA ribossômico, componente fundamental dos ribossomos. Estudos das RONs de insetos, bem como outros eucariotos, mostram que essas regiões são diversos quanto a vários aspectos tais como número, localização, quantidade e organização do conteúdo do DNAr e mecanismos reguladores em seu controle. Em cromossomos metafásicos monocêntricos as RONs são identificadas como regiões de constrição secundária (BICUDO, 1985).

O número de nucléolos está somente em parte, relacionado ao número de constrições secundárias. Enquanto na mitose as RONs podem ser localizadas em regiões de constrições secundárias dos cromossomos mitóticos, no cromossomo meiótico ela é distinguida como uma região condensada e vista como um grânulo de cromatina (*knob*).

A desagregação do nucléolo ocorre durante o final da prófase e a reorganização na telófase precoce. No entanto, vários exemplos em diferentes espécies de animais e plantas demonstram que especialmente o material fibrilar, mas às vezes o granular, pode persistir ao longo do ciclo celular, incluindo metáfase e anáfase. Essas evidências apoiam a possibilidade de que o material nucleolar não é totalmente sintetizado na RON associada ao cromossomo, mas que um material pré-existente também é necessário e utilizado como já foi referido por Ashraf e Godward (1988) e por outros autores, como Severi Aguiar e Azeredo-Oliveira (2005).

Em triatomíneos, em geral, o número e a localização das RONS são espécies específicas. Como em outros grupos animais, os cromossomos são marcadores importantes que facilitam a realização de estudos comparativos para melhor compreensão dos mecanismos evolutivos destes importantes insetos hematófagos (MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2007).

Estudos realizados com células somáticas e meióticas de várias espécies de triatomíneos demonstraram claramente esta associação estrutural e funcional entre heterocromatina e o nucléolo (AZEREDO-OLIVEIRA; MELLO, 1986; SEVERI AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2005; ALEVI et al. 2014). Utilizando-se da técnica de impregnação pela prata, no estudo do ciclo nucleolar de triatomíneos mostrou a presença de regiões organizadoras nucleolares (RONS) em cromossomos metafásicos de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2008).

Por meio dessa mesma técnica, também foi possível observar a persistência nucleolar durante o ciclo meiótico em espécies do gênero *Triatoma* (TAVARES;

AZEREDO OLIVEIRA, 1997), *Panstrongylus* (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999) e *Rhodnius* (MORIELLE, 2000; ALEVI et al. 2014).

Em outro trabalho realizado com túbulos testiculares de *Triatoma melanosoma*, notou-se a presença de pequenos corpúsculos arginofílicos dispersos na área nuclear no início do “estágio difuso”. No mesmo estudo, também foram observados corpúsculos nucleolares dispersos nos mais avançados estágios da meiose, como metáfase I e II e anáfase I e II, relatando o fenômeno da persistência nucleolar em triatomíneos (BARDELLA et al., 2008). Apesar dos diversos estudos com esses insetos, novas investigações com diferentes espécies devem ser feitas a respeito da estrutura nucleolar e da localização das RONS em seus cromossomos holocêntricos (MORIELLE-SOUZA; AZEREDO- OLIVEIRA, 2008).

Aspectos como atividade nucleolar na intérfase e em células meióticas também foram analisadas em *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma delpontei*, *Triatoma lecticularia*, *Triatoma rubrovaria* e em *Triatoma sordida*. Nessas espécies, vários blocos nucleolares foram observados nos núcleos poliplóides dos túbulos testiculares, enquanto somente um único corpo nucleolar foi evidente no estágio difuso de *T. brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia* e *T. rubrovaria*, sendo que em *T. sordida* foram observadas duas marcações nucleolares. O número de corpúsculos nucleolares presentes nas espermatídes variou dentre as espécies, sugerindo uma adicional provisão de informação para a 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 nesses núcleos. Além disso, o fato do núcleo espermatoγονial possuir vários blocos nucleolares parece refletir tanto diferenças funcionais como metabólicas (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997).

1.6. As variações do *Trypanosoma cruzi*

Mais de dez espécies de triatomíneos são consideradas alvos relevantes para o controle vetorial pelo seu papel na transmissão da doença (MONTEIRO, 2002; DUJARDIN, 1998), e é com base nesses dados que as espécies do presente estudo foram escolhidas, sendo duas delas vetores altamente eficientes (*Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus*) e uma que possui menos registros de infecção (*Rhodnius neglectus*) (SILISTINO-SOUZA et al. 2013). Todas as espécies utilizadas nesses estudos foram infectadas pelo protozoário *T. cruzi*, pertencente à cepa Y, a qual foi isolada de um caso agudo humano, em 1950, e caracterizada por Silva e Nussenzweig, em 1953.

Cepas de *T. cruzi* são complexas populações multiclonais que diferem em suas características genéticas e biológicas e no seu comportamento no hospedeiro vertebrado, inclusive na capacidade de entrar nas células hospedeiras e podem apresentar diferenças significativas em formas metacíclicas entre as cepas de *T. cruzi* (RAMIREZ, et al. 1993). O que determina essa variabilidade não é claro. A ação patogênica variável do parasita para o hospedeiro, segundo Andrade e colaboradores, em 1970, se deve a vários fatores, dentre eles as características morfológicas do agente, além de evidências circunstanciais que sugerem expressão diferencial de moléculas na superfície das diferentes estirpes (RAMIREZ, et al. 1993).

Cepas de *T. cruzi* representam subespécies com base em características intrínsecas, tais como ação antigênica, composição, morfologia, susceptibilidade a quimioterapia e padrões isoenzimáticos bem como no relacionamento parasito-hospedeiro (ANDRADE; MAGALHÃES, 1997).

A existência de cepas de *T. cruzi* com tropismo por diferentes tecidos foi relatada por trabalhadores precoces (VIANNA, 1911; CAMPOS, 1927). Foram encontradas diferenças entre várias estirpes em relação à morfologia, virulência, patogenicidade e ao tropismo de tecido (BRENER; ANDRADE, 1979).

A Cepa Y foi isolada de um caso humano de doença de Chagas, com base em xenodiagnóstico, por Freitas (1950), e caracterizada por Silva e Nussenzweig (1953). Essa estirpe apresenta elevado porcentual de mortalidade, alta patogenicidade e parasitemias baixas (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953). Observa-se edema e paralisia nos membros dos animais inoculados. De acordo com Andrade (1974), a cepa Y classifica-se como Tipo I, pela rápida multiplicação, altos e curtos picos de parasitemia e mortalidade, predominância de formas finas e macrofagotropismo na fase inicial da infecção.

Com base na importância dos triatomíneos em diversos estudos, como médico-sanitária, taxonômica e citogenética, o presente trabalho pretende realizar um estudo comparativo entre as seguintes espécies contaminadas pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*: *Triatoma brasiliensis*; *Panstrongilus megistus* e *Rhodnius neglectus*, com base nas técnicas citogenéticas convencionais deorceína lacto-acética, impregnação por íons prata, bandamento-C e reação de Feulgen.

Objetivo geral

Avaliar os efeitos da infecção por *T. cruzi* na meiose dos triatomíneos de 3 espécies vestras do parasita, tracndo parâmetros comparativos entre os indivíduos e as diferentes espécies.

Objetivos Específicos

- a) Analisar detalhadamente o comportamento meiótico, a espermiogênese e a estrutura cromatínica, observando as diversas fases da espermatogênese de todas as espécies e caracterizar as regiões heteropicnóticas, por meio do esmagamento celular de túbulos seminíferos dos testículos de machos adultos corados com orceína lacto-acética e pela Reação de Feulgen;
- b) Obter informações sobre o comportamento nucleolar durante a espermatogênese e observar as possíveis Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) nos cromossomos holocêntricos das espécies citadas, por meio da técnica de impregnação por íons prata;
- c) Quantificar os tipos celulares em lâminas coradas pela técnica de orceína lacto-acética e traçar um perfil comparativo entre os indivíduos contaminados e não contaminados.
- d) Utilizar os dados obtidos para estabelecer parâmetros comparativos entre as espécies contaminadas e não contaminadas, para confrontar com os dados descritos na literatura.

3.1. Obtenção e procedência dos insetos

As espécies de *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius neglectus* e *Panstrongylus megistus* foram cedidas pelo insetário do Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara, sob a coordenação do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa.

Para os estudos citogenéticos, foram utilizados 10 indivíduos de cada espécie, os quais não estavam contaminados pelo protozoário *T. cruzi* e 10 indivíduos de cada espécie contaminados pela cepa Y do parasito. Todas as espécies são provenientes de colônias iniciadas a partir de espécimes coletados pelo grupo de pesquisa da UNESP Araraquara.

3.2. Manutenção e alimentação dos insetos

No insetário de Triatominae do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Câmpus de Araraquara, as espécies são separadas em colônias de acordo com suas origens, constituindo no geral, a “Colônia de Triatomíneos de Araraquara” (CTA). Os espécimes são mantidos em cristalizadores contendo repartições internas de papelão (para reduzir a luminosidade), fechados em sua parte superior com uma malha fina e guardados em estantes de madeira, cujos pés ficam imersos em vasilhas contendo óleo queimado, para evitar o ataque de formigas e o apodrecimento da madeira, em salas com pouca iluminação e com temperatura e umidade relativa do ar ambiente.

Esses insetos são alimentados inicialmente após oito dias da eclosão (ninha de primeiro estadio) e, posteriormente, em períodos quinzenais com sangue de pato, a fim de se eliminar qualquer possibilidade de contaminação pelo *Trypanosoma cruzi*, pois as aves não são reservatórios naturais destes protozoários.

Durante os experimentos, realizados no laboratório de Biologia Celular, do Departamento de Biologia (IBILCE/UNESP), esses insetos foram mantidos em frascos cobertos por uma malha fina amarrada com o auxílio de elásticos para possibilitar a entrada do ar. Cada pote comportou, no máximo, dez indivíduos, para evitar o estresse e o risco de acidentes no manuseio com estes hematófagos. No momento da utilização, os triatomíneos foram retirados com o maior cuidado possível para que deste modo não houvesse a possibilidade de fuga dos mesmos.

3.3 Infecção dos insetos

As espécies foram infectadas pela cepa Y de protozoários de *T. cruzi*, no estágio de tripomastigotas, a partir de cultura da cepa. Os protozoários de *T. cruzi* foram cultivados em meio LIT (Tabela 1), em estufa própria para cultura a 25° C.

Tabela 1: Composição do meio de LIT

Componentes	Massa (g) ou ml
NaCl	4,0
KCl	0,4
Na₂HPO₄	8,0
Tryptose	5,0
Infuso de fígado	5,0
H₂O destilada	880 ml
Soro bovino	100 ml
Hemoglobina de sangue bovino	20 ml

A infecção foi realizada por meio de seringa Hamilton. Foi injetado no abdômem dos insetos 10µm de meio LIT contendo o protozoário (HENRIQUES et al. 2012). Os insetos contaminados foram mantidos separados dos demais para evitar contaminação desnecessária e, após 5 dias, os indivíduos foram dissecados e as técnicas foram realizadas. A dissecação após 5 dias se deve a otimização da curva de infecção desses indivíduos.

3.4. Órgão analisado

Foram analisados os túbulos seminíferos de machos adultos de triatomíneos das três espécies citadas (*Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius neglectus* e *Panstrongylus megistus*), sendo observadas as mitoses espermatogoniais, os diferentes estágios da meiose e da espermiogênese das espécies estudadas.

3.5. Dissecação dos insetos

Os insetos adultos foram eterizados e fixados com alfinetes pela região posterior do cefalotórax (escutelo) em placa de Petri contendo parafina sólida. Em seguida, asas e patas foram retiradas com o auxílio de uma pinça. Sob o microscópio estereoscópico (lupa), as laterais do abdome e os conexivos foram cortados com uma tesoura pontiaguda. Com a ponta dos estiletes, pôde-se abrir a região antero-dorsal do exoesqueleto abdominal, que foi, então, rebatido e, posteriormente, preso com alfinete na placa, expondo o interior da região abdominal. Neste momento, foi gotejada solução fisiológica (Demerec) sobre o abdome exposto e procedeu-se à retirada dos testículos que estavam localizados na porção anterior do hemocele. Esses órgãos foram depositados em uma lâmina contendo uma gota de solução fisiológica para a retirada dos túbulos seminíferos.

3.6. Fixação dos túbulos seminíferos

Após a dissecação, os túbulos seminíferos foram limpos e individualizados. Posteriormente, foram fixados em solução metanol-ácido acético (3:1) e armazenados no *freezer* à -20°C.

3.7. Preparação das lâminas

Os túbulos seminíferos mantidos na solução fixadora foram colocados, individualmente em uma lâmina limpa, e receberam dois banhos de água destilada, por cinco minutos cada. Após a eliminação de toda a água da lâmina, acrescentou-se uma gota de ácido acético 45%, durante 10 minutos. Posteriormente, o excesso de ácido acético 45% foi retirado e, sob o microscópio estereoscópico, o túbulo seminífero foi

dilacerado com a ajuda de estiletes e colocou-se, então, uma lamínula para a realização do esmagamento celular. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e, depois, as lâminas foram secas ao ar.

3.8. Técnicas citogenéticas convencionais

3.8.1. Orceína lacto-acética (DE VAIO et al., 1985, com modificações)

Princípio da técnica: Esta técnica citoquímica diferencia a eucromatina da heterocromatina, corando a segunda mais fortemente que a primeira. Isto ocorre porque na heterocromatina, além de se encontrar maior compactação, a quantidade de proteínas é bem maior que na eucromatina (VIDAL; MELLO, 1987). O mecanismo dessa coloração compreende, de forma simplificada, a ligação das moléculas do substrato carregado positivamente (catiônico) dos grupos amina de resíduos dos aminoácidos protéicos ($-NH_3^+$), com as moléculas do corante (orceína) que possuem cargas negativas (aniônicas).

A técnica citogenética específica com orceína lacto-acética foi realizada seguindo-se os procedimentos seguintes:

- a) Pingar uma gota de orceína sobre a lâmina anteriormente fixada com o túbulo seminífero;
- b) Colocar uma lamínula sobre a gota de orceína e aguardar por 5 minutos;

- c) Lavar a lâmina em água destilada até que a lamínula se desprenda;
- d) Deixar secar ao ar e realizar a montagem total com verniz para observação ao microscópio.

3.8.2. Impregnação por íons prata (HOWELL; BLACK, 1980, com modificações)

Princípio da técnica: A técnica de impregnação por íons prata é um dos métodos clássicos para a identificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), nos cromossomos metafásicos, e das áreas nucleolares, nos núcleos interfásicos. Duas proteínas nucleolares podem ser reduzidas por íons prata: C23 (nucleolina) e B23 (numatrina). Dessas proteínas, somente a C23 está associada ao DNAr, sugerindo ser a “verdadeira proteína AgNOR”. O padrão de marcação por íons prata sugere que essas duas proteínas acídicas sejam responsáveis pela impregnação nucleolar: a C23 indica a presença da cromatina descondensada ligada à RON e a B23 indica a localização dos precursores ribossomais (OSCH; BUSH, 1984; CASSEB-HASSAN; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

A técnica citogenética de impregnação por íons prata foi realizada segundo a técnica abaixo descrita:

- 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 com a ajuda de uma lamínula;
- c) Cobrir com lamínula;
- d) Colocar as lâminas em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada, e incubar em estufa a mais ou menos 60o C, até a mistura das soluções tornarse marrom dourada, cerca de 8 minutos;
- e) Lavar a lâmina em água destilada até que a lamínula desprenda-se, deixar secar ao ar;
- f) Montar em verniz para observação ao microscópio.

3.8.3. *Reação de Feulgen* (MELLO; VIDAL, 1980, com modificações)

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

A técnica citogenética de reação de Feulgen compreende duas etapas: uma hidrólise ácida em HCl 4N que provoca a depurinação do DNA, e a exposição do

material hidrolisado ao reativo de Schiff que cora somente os aldeídos livres das pentoses.

Esta técnica citoquímica foi realizada de acordo com os seguintes procedimentos:

- a) Realizar a hidrólise ácida com a utilização de HCl 4N, durante uma hora e cinco minutos;
- b) Retirar o HCl 4N e colocar HCl 0,1N gelado para um rápido banho;
- c) Retirar o HCl 0,1N e adicionar o reativo de Schiff, por 40 minutos em local escuro;
- d) Dar três banhos com água destilada por 5 minutos;
- e) Secar ao ar e montar a lâmina no dia seguinte em verniz cristal.

3.8.4. Fotodocumentação dos resultados

O material submetido às técnicas citogenéticas convencionais foi analisado por meio e observação das lâminas ao microscópio de luz (*Zeiss Jenaval*), com sistema analisador de imagem *Axio Vision LE 4.8* (Copyright ©2006-2009 Carl Zeiss Imaging Solutions Gmb H).

3.9. Quantificação celular

A contagem das células foi realizada a partir de lâminas previamente confeccionadas e coradas pela técnica de orceína lacto-acética. As lâminas foram observadas em microscópio de luz (*Olympus BX60*) em objetiva de 100 vezes. Todas as células presentes na lâmina foram contadas e, para evitar a contagem de células repetidas, foi usada a técnica de observação sequencial como no modelo abaixo:

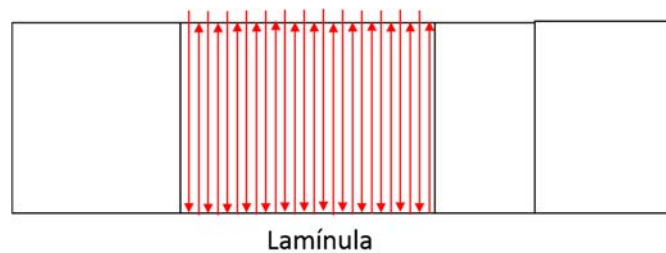


Figura 1: Esquema representativo da análise das lâminas para a contagem celular. As setas representam a sequência de movimentação da lâmina no microscópio.

Durante a contagem, as células foram agrupadas em suas respectivas fases e a porcentagem, médias e desvios padrões foi realizada.

4.1. Orceína Lacto-Acética

A técnica de Orceína Lacto-acética possibilitou analisar as estruturas meióticas das células dos túbulos seminíferos durante a divisão celular. Como houve a comparação entre os indivíduos não contaminados e contaminados pelo agente parasitário, foi possível observar as diferenças nas estruturas das células e traçar padrões comparativos.

4.1.1. *Triatoma brasiliensis*

Nos indivíduos não contaminados pelo *T. cruzi*, foi possível observar núcleos poliploides de tamanhos compatíveis com a literatura e em número relativamente estável. A figura 2a exemplifica um típico núcleo poliploide de *T. brasiliensis*, o qual apresenta um cromocentro mais fortemente corado pela orceína, com a presença de alguns pontos dispersos pelo núcleo. As células em estágio difuso (Figura 2 c, e) apresentaram conformações normais durante a divisão, evidenciando a condensação cromatínica usual.

Já os indivíduos contaminados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentaram configurações disformes durante a divisão celular. Os núcleos poliploides estavam com seu tamanho aumentado se comparados aos dos indivíduos não contaminados (Figura 2 b). O aumento no tamanho celular também foi identificado nas demais células durante a divisão (Figura 2d, f). Outra característica observada nos insetos contaminados foi a redução no número de metáfases em estágios mais organizados, evidenciando uma possível diminuição do número dessas células.

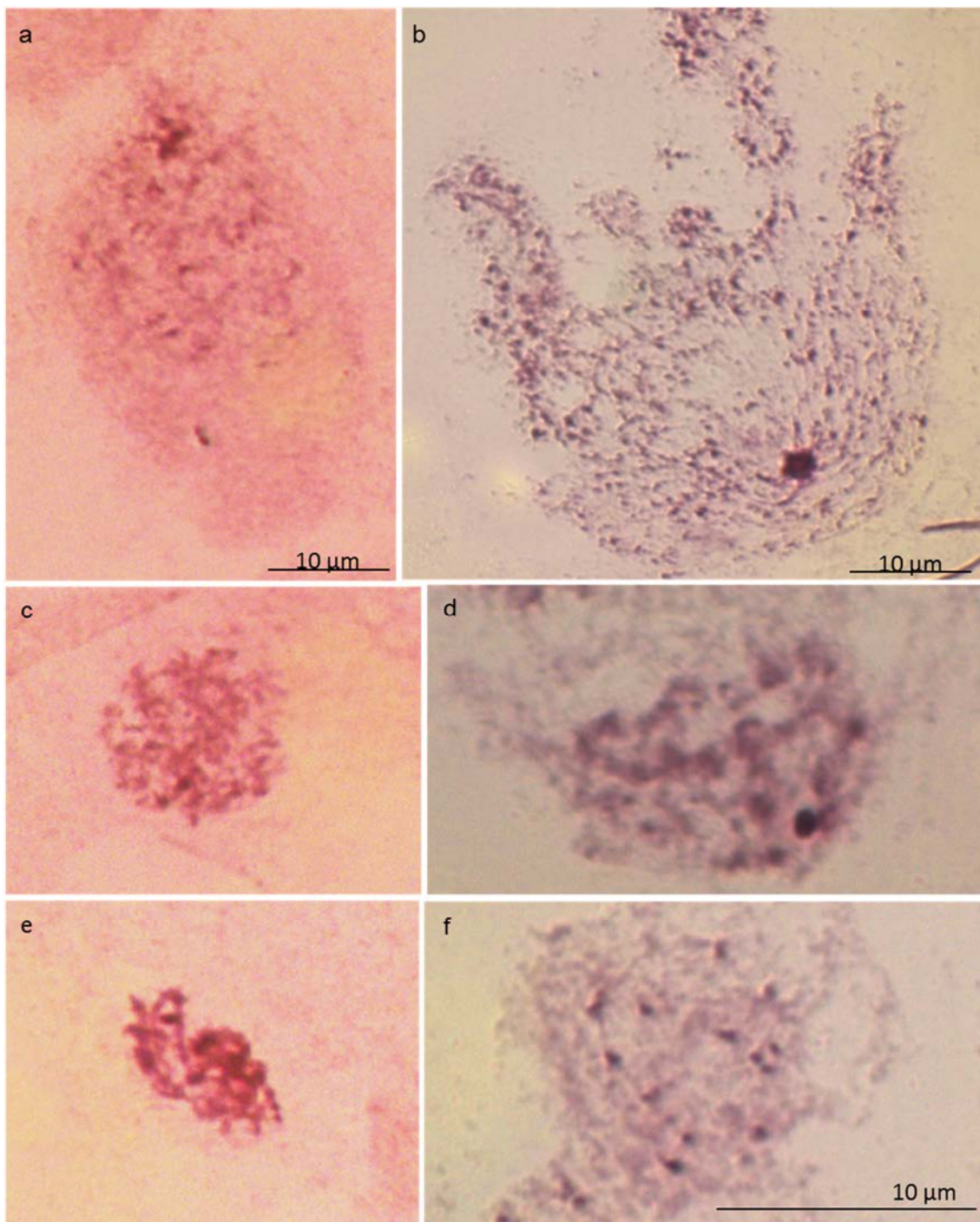


Figura 2. Células dos túbulos seminíferos de *Triatoma brasiliensis* coradas com orceína lacto-acética. **(a-b)** Núcleo poliploide. **(c-d)** Estágios difusos iniciais. **(e-f)** Estágios difusos. **(a) (c) (e)** Indivíduos não contaminados. **(b) (d) (f)** Indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*.

4.1.2. *Rhodnius neglectus*

Também durante a divisão celular dos indivíduos não contaminados pertencentes à espécie *Rhodnius neglectus* foram observadas células de acordo com o padrão relatado na literatura. O núcleo poliploide apresentou corpúsculo tripartido (Figura 3 a). Nos núcleos das células em estágio difuso (Figura 3c), da fase inicial à final, observou-se o processo de condensação da cromatina e a presença de corpúsculos heteropicnóticos. No estágio de metáfase foram observados 10 autossomos bivalentes dispostos na placa metafásica em formato circular e 2 cromossomos sexuais centrais (Figura 3 e).

Os indivíduos que foram submetidos à contaminação pelo *T. cruzi* tiveram alterações celulares durante a espermatogênese. O núcleo poliploide possuía tamanho aumentado (Figura 3 b), assim como as células em estágio difuso (Figura 3d), as quais também apresentaram conformação disforme. Em *Rhodnius neglectus* foi possível observar algumas metáfases circulares (Figura 3 f), entretanto, estas apresentaram tamanho aumentado além de serem poucas as encontradas.

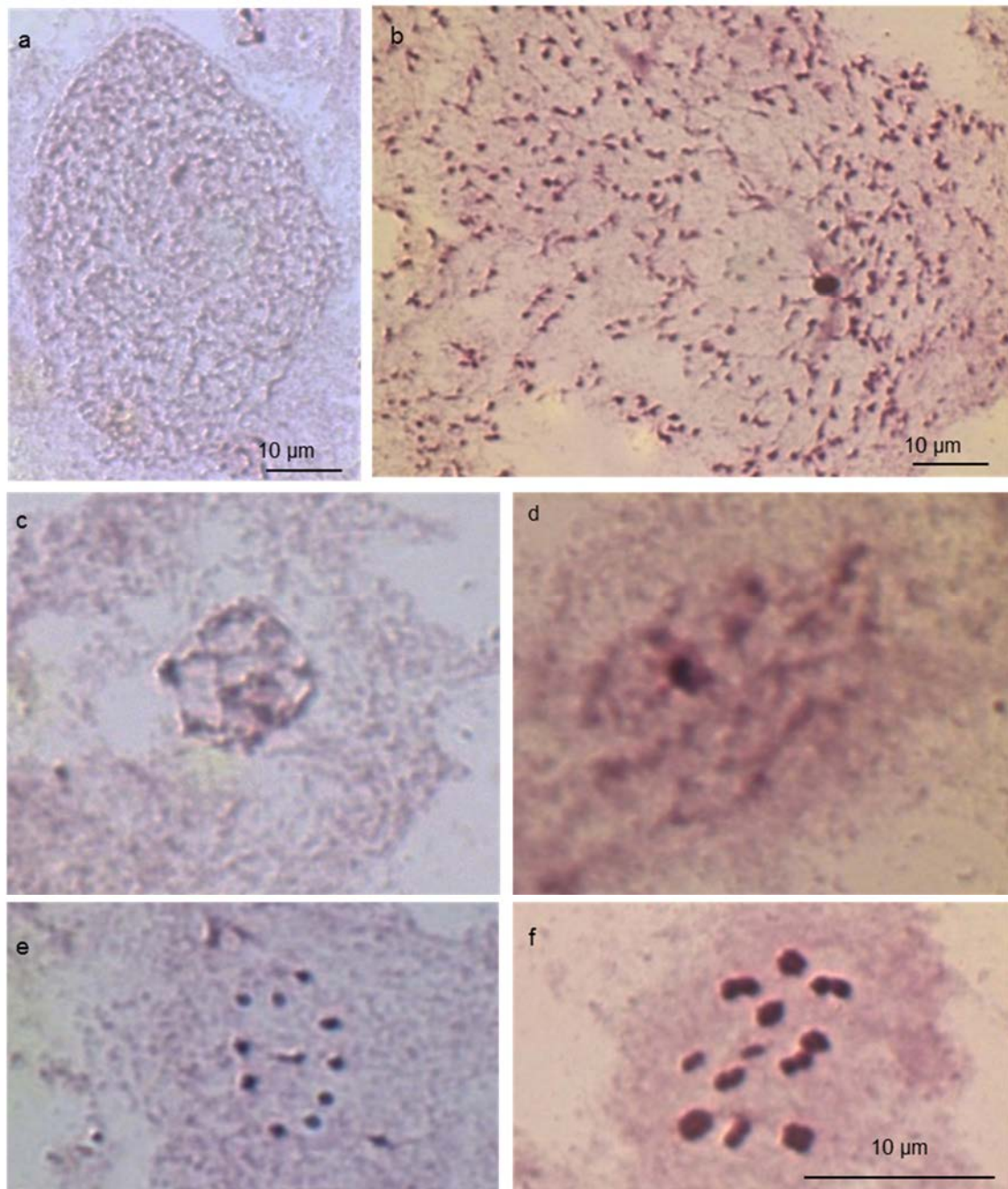


Figura 3. Células dos túbulos seminíferos de *Rhodnius neglectus* coradas com orceína lacto-acética. **(a-b)** Núcleos poliploides. **(c-d)** Estágios difusos iniciais. **(e-f)** metáfases meióticas. **(a) (c) (e)** Indivíduos não contaminados. **(b) (d) (f)** Indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*.

4.1.3. *Panstrongylus megistus*

Assim como nas espécies anteriores, foi possível observar as diferenças entre os indivíduos contaminados e não contaminados pelo *T. cruzi* em *P. megistus*.

O núcleo poliploide apresentou-se de tamanho usual, com um único corpúsculo mais corado pela orceína lacto-acética (Figura 4 a). As células em intérfase apresentaram-se abundantes nas lâminas analisadas (Figura 4c) e mostraram conformação normal. Durante a prófase (Figura 4 e) foi possível observar pontes cromatínicas ligando todos os cromossomos.

Os insetos que foram contaminados pelo *T. cruzi* apresentaram configuração celular disforme. O núcleo poliploide apresentou diversos corpúsculos heteropicnóticos, ao invés de apenas 1 como visualizado nos indivíduos sem infecção (Figura 4 b). As células em intérfase (Figura 4 d) também apresentaram um aumento nuclear, assim como aquelas em estágio difuso (Figura 4 f). Foram encontradas poucas células em estágio de divisão mais avançado, e quando encontradas, essas estavam sem um padrão de organização cromossômica. Nenhuma metáfase foi encontrada nesses insetos contaminados.

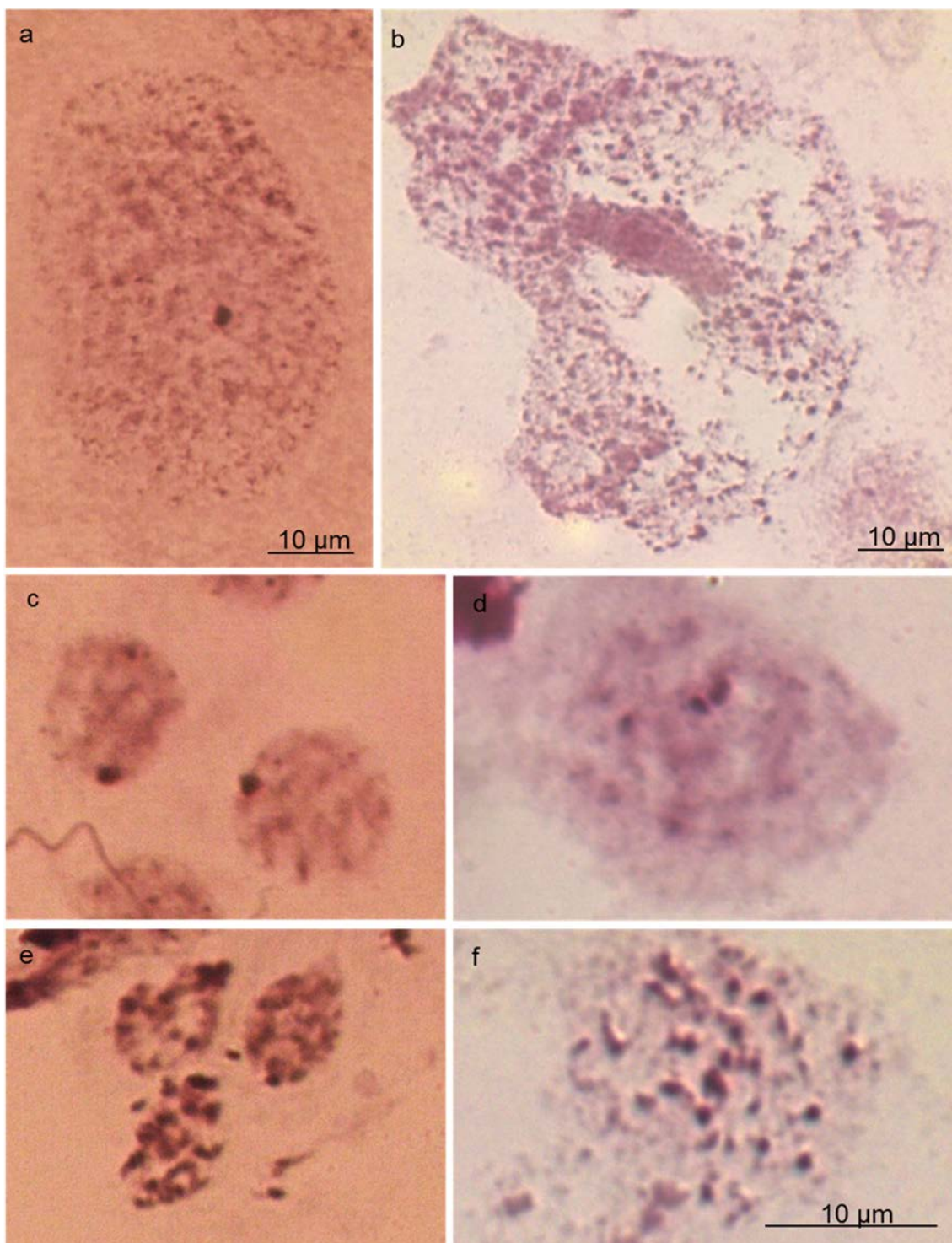


Figura 4: Células dos túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus* coradas com orceína lacto-acética. **(a-b)** Núcleo poliplóide. **(c-d)** Prófase. **(e-f)** Estágios difusos. **(a) (c) (e)** Indivíduos não contaminados. **(b) (d) (f)** Indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*.

4.2. Impregnação por íons prata

A técnica de impregnação por íons prata proporcionou a visualização dos padrões nucleolares das células germinativas dos túbulos seminíferos das espécies estudadas. A comparação entre os indivíduos contaminados e não contaminados possibilitou observar as diferenças nucleolares e assim intuir sobre o efeito do estresse fisiológico causado pela contaminação a reprodução desses insetos.

4.2.1. *Triatoma brasiliensis*

Nos organismos sem a presença do protozoário *T. cruzi*, a espermatogênese ocorreu como o padrão descrito na literatura. O núcleo poliploide (Figura 5 a) apresentou diversos pontos impregnados pela prata e tamanho proporcional. As células em intérfase (Figura 5c) apresentaram alguns corpúsculos marcados pelos íons prata, os quais foram impregnados uniformemente. Durante a divisão celular, as células nos diferentes estágios da prófase (Figura 5 e, g) possuíam diversos corpúsculos nucleolares.

Os indivíduos contaminados apresentaram corpúsculos mais fortemente corados e células mais disformes. Foi evidenciado um núcleo poliplóide (Figura 5 b) com tamanho muito aumentado, entretanto a variação dos corpúsculos se mostrou adequada. As células em estágio difuso (Figura 5 d, f, h) estavam ligeiramente disformes, e não foram encontradas células em estágio mais avançado da espermatogênese.

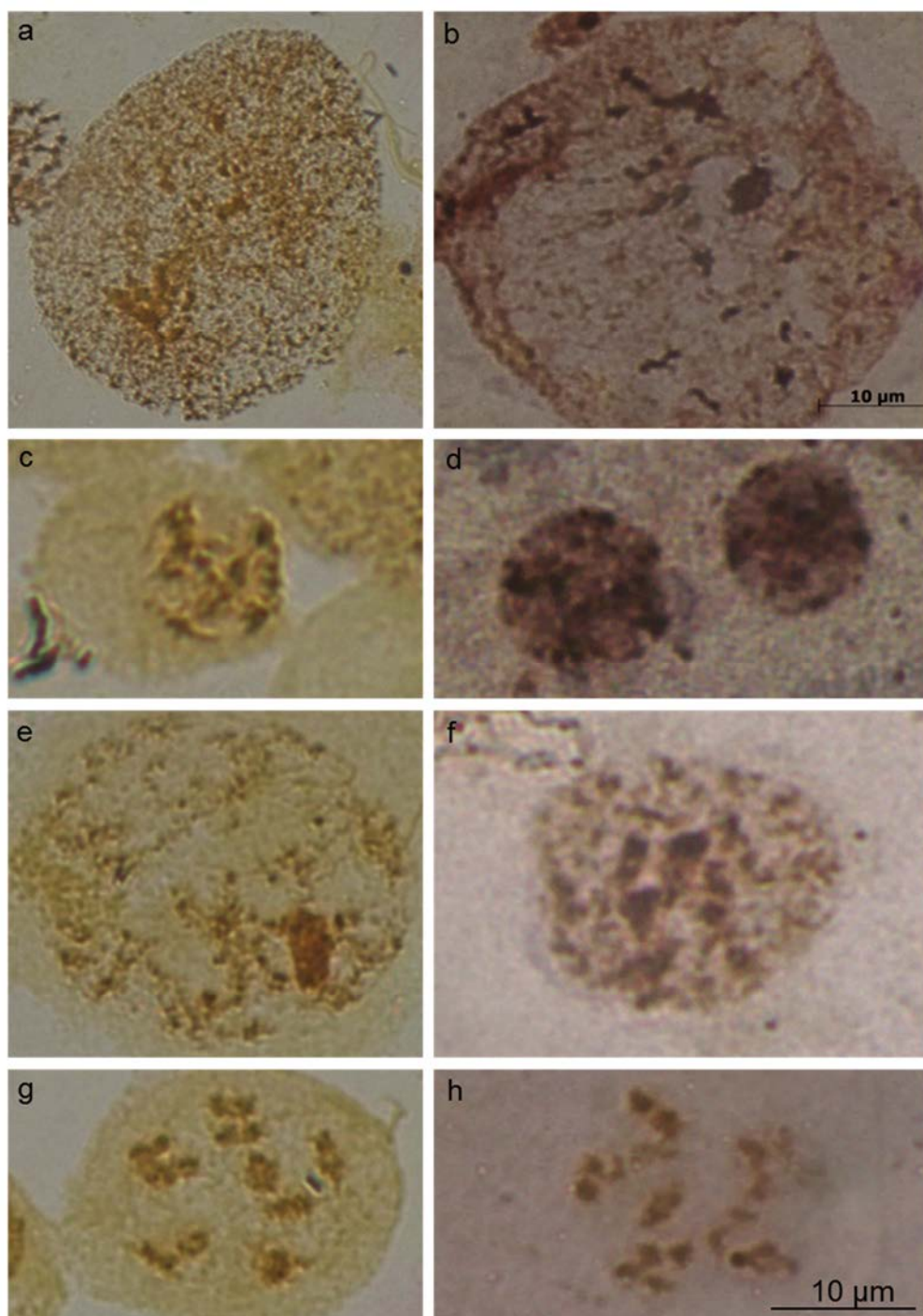


Figura 5: Células dos túbulos seminíferos de *Triatoma brasiliensis* submetidas à técnica de impregnação por íons prata. **(a-b)** Núcleos poliploides. **(c-f)** Estágios difusos. **(g-h)** Diplóteno. **(a) (c) (e) (g)** Indivíduos não contaminados. **(b) (d) (f) (h)** Indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*.

4.2.2. *Rhodnius neglectus*

Nos indivíduos sem contaminação, cada núcleo poliploide (Figura 6 a) apresenta um corpúsculo mais fortemente marcado. As células em interfase (Figura 6 c) apresentaram um único nucléolo marcado pelos íons prata. Os núcleos em estágio difuso (Figura 6e) também apresentaram uma região nucleolar nitidamente mais impregnada pelos íons prata.

Os organismos que sofreram contaminação pelo *T. cruzi* não apresentaram células em formatos convencionais, sendo difícil a identificação das fases em que se encontravam algumas células. Os núcleos poliplóides (Figura 6 b) foram identificados visualmente maiores do que os presentes nos túbulos seminíferos de indivíduos não contaminados. As células em intérfase (Figura 6 d) apresentavam de um a dois corpúsculos marcados pela prata. Já as células em divisão celular (Figura 6 f), apresentavam-se disformes e com tamanho aumentado.

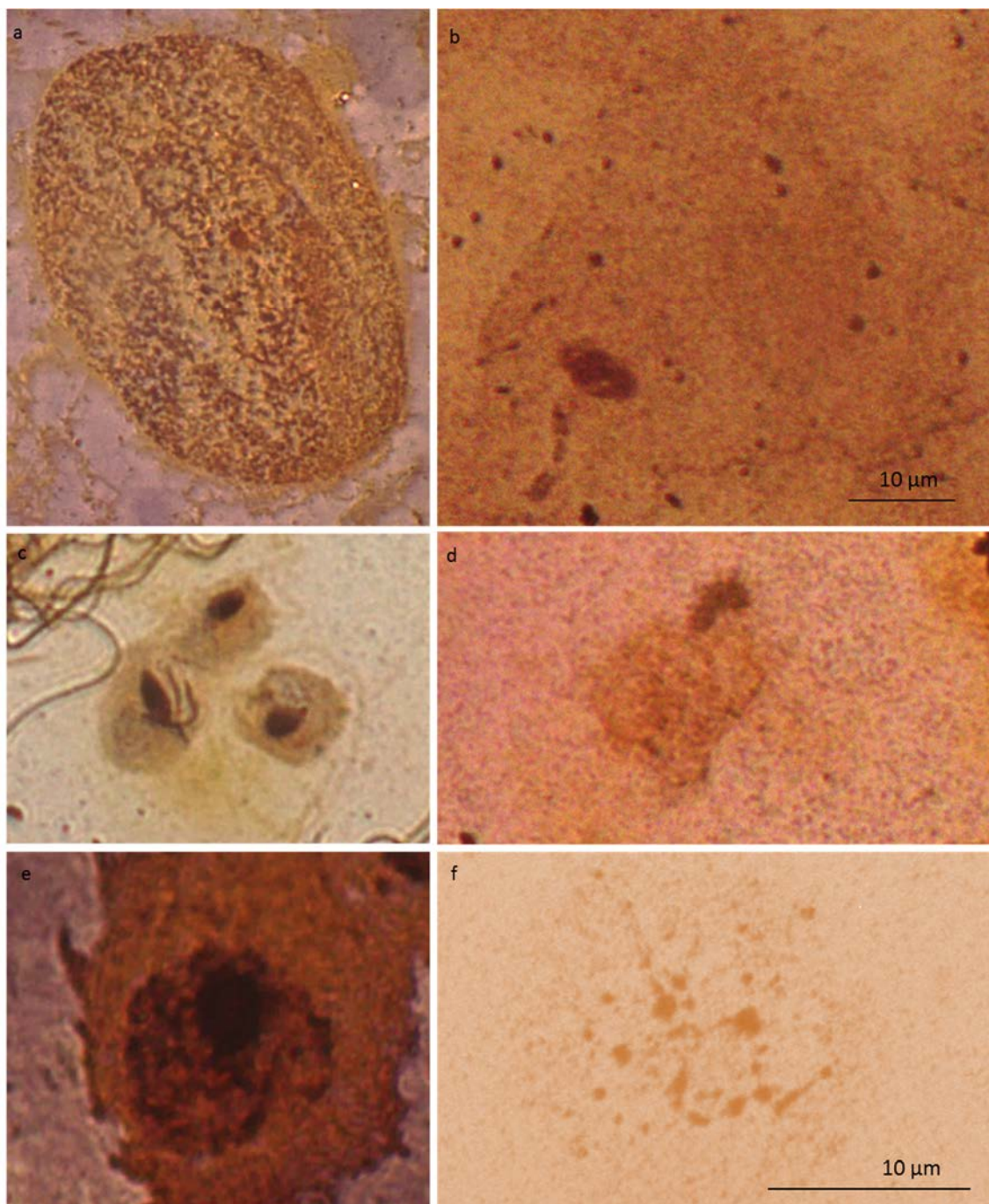


Figura 6: Células dos túbulos seminíferos de *Rhodnius neglectus* submetidas à técnica de impregnação por íons prata. (a-b) Núcleos poliplóides. (c-d) Células em intérfase. (e-f) Estágios difusos. (a) (c) (e) Indivíduos não contaminados. (b) (d) (f) Indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*.

4.2.3. *Panstrongylus megistus*

Assim como nos demais resultados das outras espécies apresentados anteriormente, foi possível observar uma variação entre os indivíduos da espécie *P. megistus* que sofreram alterações celulares com a presença do *T. cruzi* em seu organismo e os que tiveram as condições estruturais e fisiológicas preservadas.

Os núcleos poliploides (Figura 7 a) apresentaram um único corpúsculo marcado pelos íons prata e algumas marcações distribuídas pelo núcleo. Os núcleos em intérfase (Figura 7 c) possuíam um cromocentro marcado, que persistia naqueles em início de prófase. Foi possível observar algumas células em metáfase no formato circular usual.

Os indivíduos contaminados apresentaram células muito maiores que os insetos controle. O núcleo poliploide (Figura 7 b) possuía um tamanho maior do que o observado na figura 6 a, além disso, as células em intérfase (Figura 7 d) apresentaram um número variado de corpúsculos nucleolares, sendo encontrados núcleos com um, dois, três e quatro corpúsculos, assim como as células em estágios difusos (Figura 7 f).

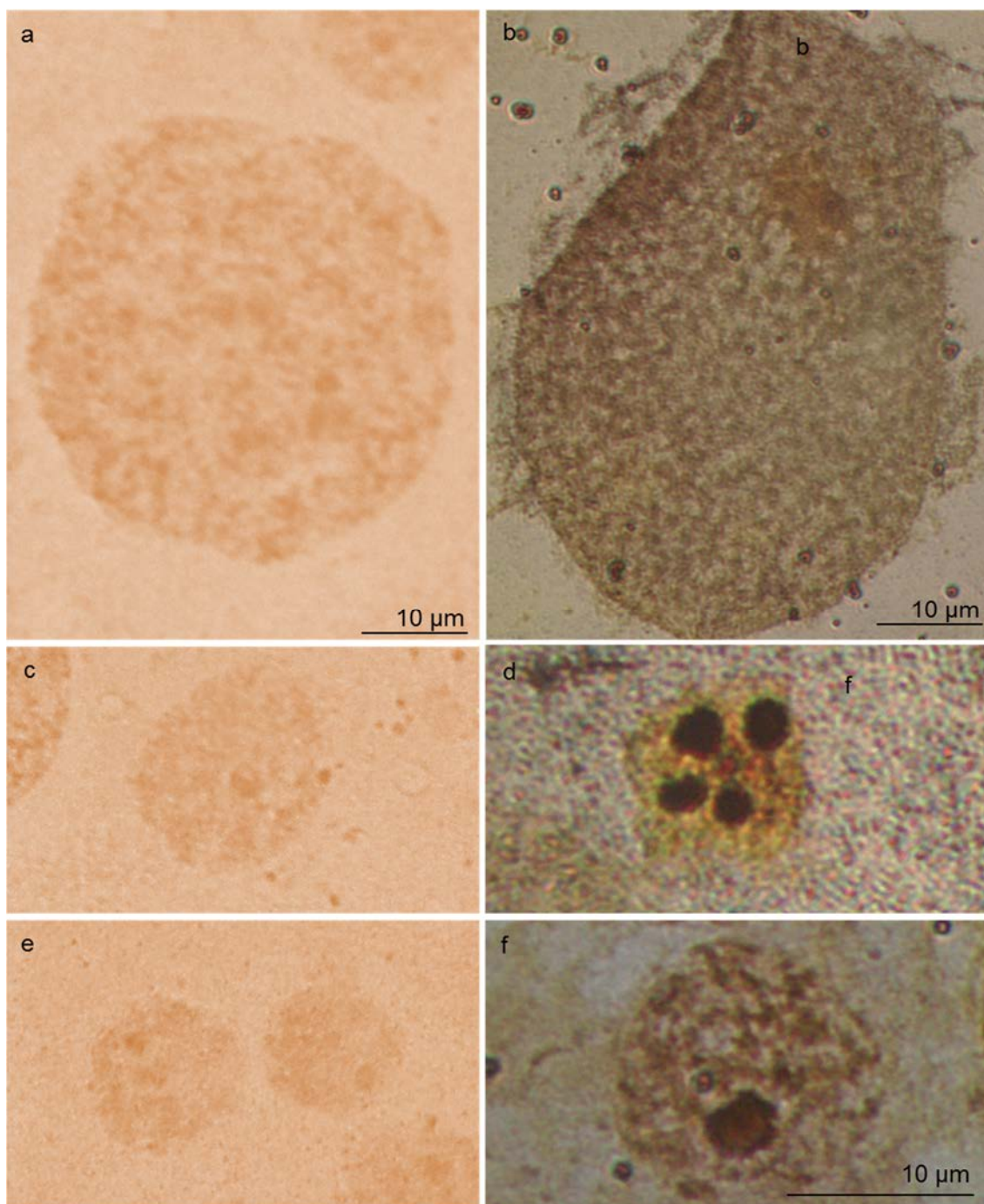


Figura 7: Células dos túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus* corados com impregnação por íons prata. **(a-b)** Núcleo poliplóide apresentando corpúsculos marcados pelos íons prata. **(c-d)** Células em intérfase.. **(e-f)** Estágios difusos. **(a) (c) (e)** Indivíduos não contaminados. **(b) (d) (f)** Indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*.

4.3. Reação de Feulgen

A Reação de Feulgen é responsável por corar apenas os aldeídos livres do DNA que são liberados durante a hidrólise do material genético promovida pela aplicação de concentrações variadas de HCl.

Nas lâminas coradas com essa técnica, foi possível observar uma diferença em relação às outras lâminas de indivíduos contaminados. Nessa coloração, o material genético apresenta um grau de degradação menor, o que pode indicar que a degradação está nas estruturas do arcabouço cromossômico.

4.3.1. *Triatoma brasiliensis*

Nas lâminas de indivíduos não contaminados pelo protozoário *T. cruzi* as células apresentavam estruturação normal, com células em início de estágio difuso (Figura 8 a) apresentando um corpúsculo mais fortemente corado e marcações menores pelo restante do núcleo. As células em estágio difuso mais avançado (Figura 8 c, e) evidenciaram pontes cromatínicas entre o material genético.

Nas lâminas dos indivíduos contaminados, as células apresentaram um tamanho aumentado em comparação com aquelas dos indivíduos não contaminados. O núcleo poliploide (Figura 8 b) representa a célula de maior aumento celular e, além disso, também a mais numerosa na lâmina, comparativamente maior que nas dos indivíduos sem contaminação. As células em estágio difuso (Figura 8 d, f) apresentaram

conformação aparentemente normal, quanto a sua estrutura, mas com tamanho nuclear aumentado.

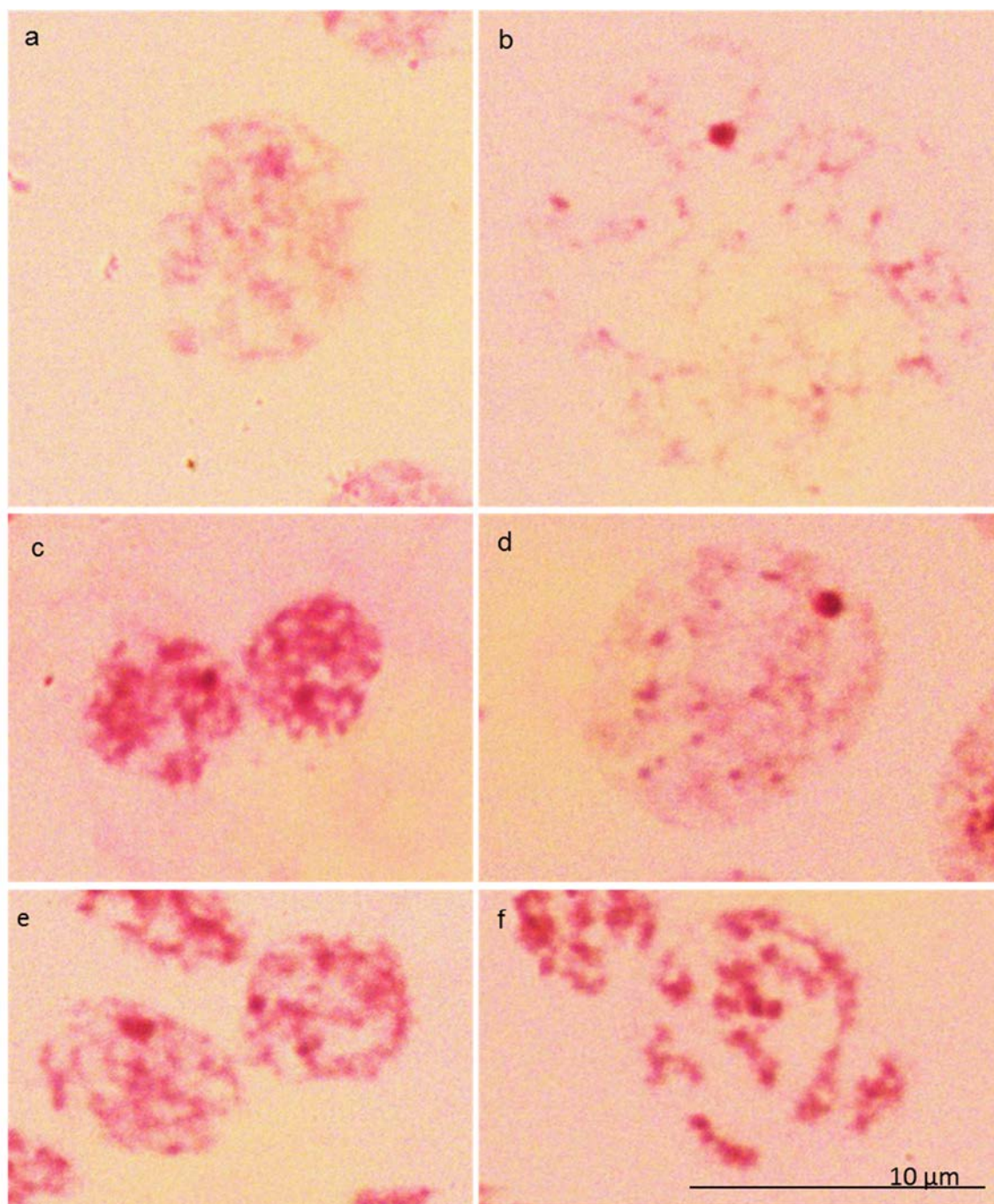


Figura 8: Células dos túbulos seminíferos de *Triatoma brasiliensis* coradas pela Reação de Feulgen. **(a-b)** Núcleos em início de estágio difuso. **(c-f)** Células em estágio difuso. **(a) (c) (e)** Indivíduos não contaminados. **(b) (d) (f)** Indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*.

4.3.2. *Rhodnius neglectus*

Os indivíduos contaminados da espécie *Rhodnius neglectus* (Figura 9) possuíam as células com conformações mais adequadas e características para a espécie. As células apresentaram um tamanho ligeiramente aumentado, entretanto, ainda dentro dos padrões. Nessa espécie foi possível encontrar células em metáfases mitóticas, mesmo não sendo encontradas células na mesma fase nos indivíduos não contaminados, e sendo a única com a presença de células em estágio mais avançado de divisão celular.

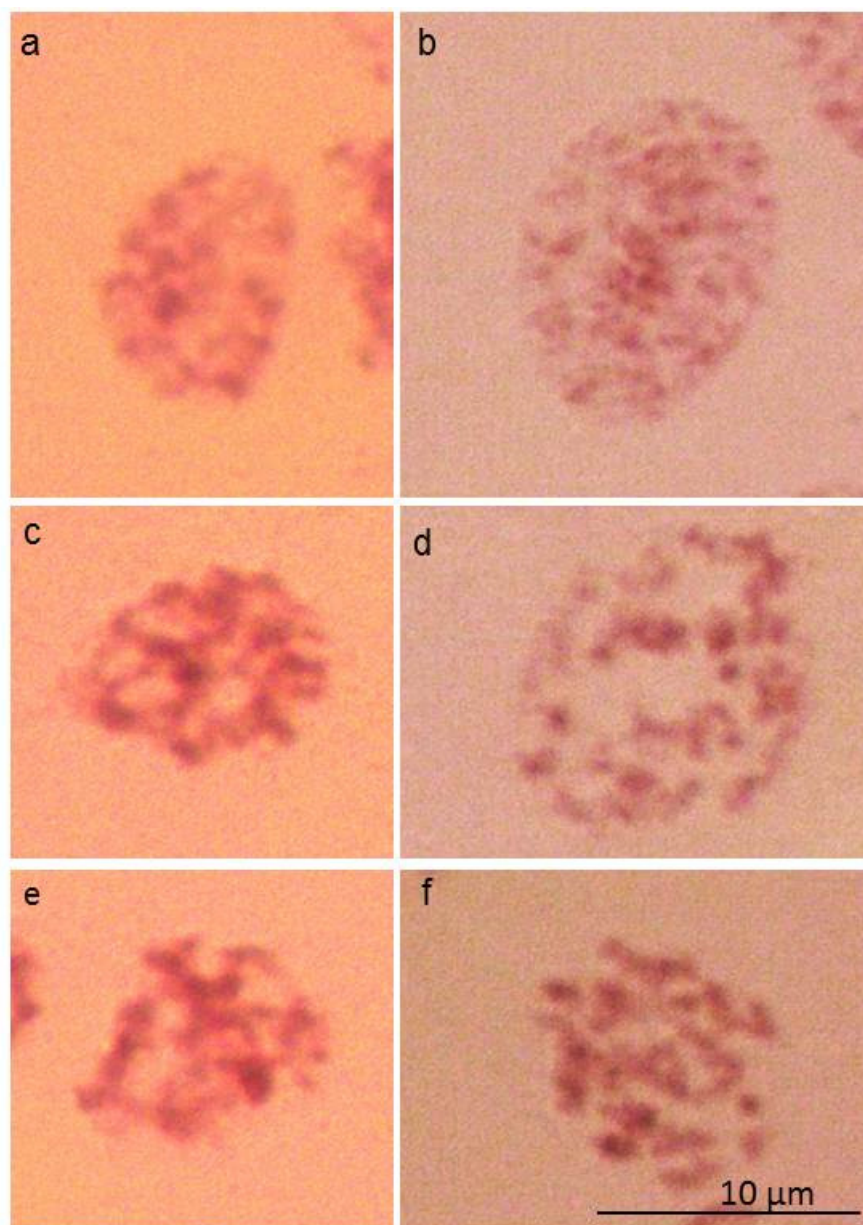


Figura 9: Células dos túbulos seminíferos de *Rhodnius neglectus* coradas pela Reação de Feulgen. **(a-b)** Células em estágio difuso inicial. **(c-f)** Células em estágio difuso. **(a)** **(c)** **(e)** Indivíduos não contaminados. **(b)** **(d)** **(f)** Indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*.

4.3.3. *Panstrongylus megistus*

As evidências levantadas pelas lâminas submetidas à Reação de Feulgen revelam a diversidade de células presentes nos túbulos seminíferos.

Nos indivíduos não contaminados, a espermatogênese seguiu o padrão descrito na literatura. O núcleo poliploide (Figura 10 a) apresentou um grande corpúsculo central mais fortemente corado, com pequenas regiões também marcadas por todo o núcleo. Nas células em intérfase (Figura 10 c) foi evidenciado de um a três corpúsculos heteropicnóticos. As células em estágio difuso (Figura 10 e) também apresentaram três corpúsculos corados, representando os cromossomos sexuais dessa espécie.

Já nos indivíduos contaminados, o núcleo poliploide (Figura 10 b) apresentou tamanho muito maior que nos indivíduos sem contaminação, além de haver uma numerosa quantidade dessas células nas lâminas analisadas. Já as células em estágio difuso (Figura 10 d, f) apresentaram uma variação em suas conformações, algumas com estruturas normais e outras alteradas. Entretanto, todas apresentaram tamanho aumentado do núcleo em divisão.

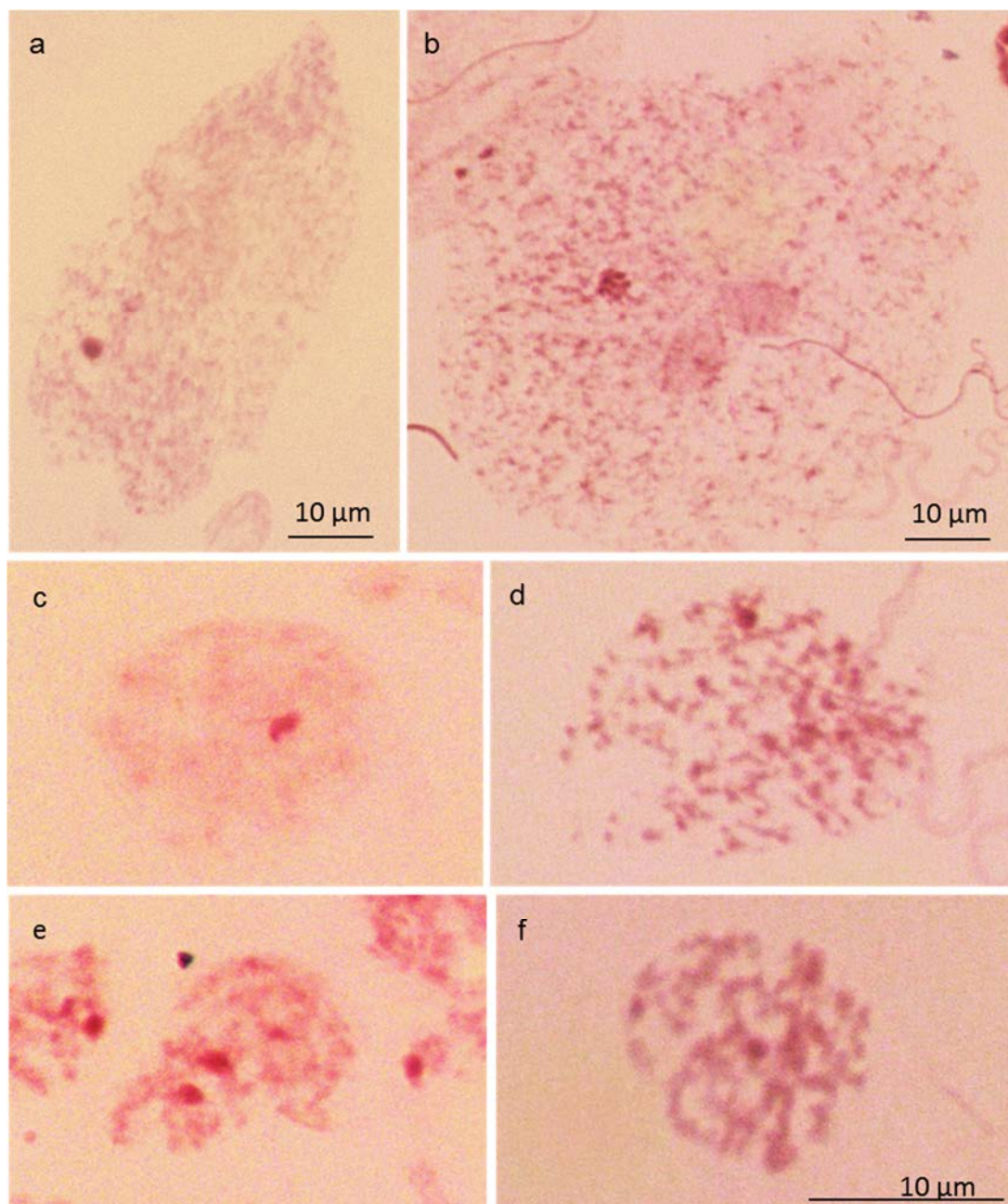


Figura 10: Células dos túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus* submetidas à técnica de Reação de Feulgen. **(a-b)** Núcleos poliplóides. **(b-f)** Células em estágio difuso. **(a) (c) (e)** Indivíduos não contaminados. **(b) (d) (f)** Indivíduos contaminados pelo *T. cruzi*.

4.4. Quantificação celular

Durante as contagens celulares foram utilizadas apenas as lâminas coradas com a técnica de orceína lacto-acética, que proporciona um padrão convencional para as observações nucleares.

4.4.1. Triatoma brasiliensis

Na Tabela 2 pode ser constatada uma diminuição no número total de células nas lâminas de indivíduos contaminados, assim como os tipos celulares que passavam pelo processo de divisão celular. Entretanto, as células em intérfase e os núcleos poliploides apresentaram número aumentado nos indivíduos contaminados.

Tabela 2: Comparação entre as quantidades de tipos celulares presentes em lâminas de túbulos seminíferos de *Triatoma brasiliensis* não contaminados e submetidos à contaminação por *Trypanosoma cruzi*.

	<i>Triatoma brasiliensis</i> não contaminado (n / %)	<i>Triatoma brasiliensis</i> contaminado (n / %)
Núcleo poliplóide	19 / 7,66%	28 / 24,77%
Intérfase	70 / 28,22%	39 / 34,51%
Prófase	97 / 39,11%	27 / 23,89%
Metáfase	15 / 6,04%	2 / 1,76%
Anáfase	4 / 1,9%	0 / 0%
Telófase	0 / 0%	0 / 0%
Demais tipos celulares	43 / 17,33%	17 / 15,04%
Total (n)	248 / 100%	113 / 100%

4.4.2. *Rhodnius neglectus*

Em *R. neglectus* foram observadas as mesmas características de *T. brasiliensis*, onde houve uma diminuição na quantidade geral dos tipos celulares nos túbulos seminíferos dos indivíduos contaminados, entretanto, houve um aumento no número de núcleos poliplóides presentes, células em intérfase e demais tipos celulares que não se encontravam em meiose ou mitose (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação das quantidades dos tipos celulares presentes em lâminas de túbulos seminíferos de *Rhodnius neglectus* não contaminados e submetidos à contaminação por *Trypanosoma cruzi*.

	<i>Rhodnius neglectus</i> não contaminado	<i>Rhodnius neglectus</i> contaminado
Núcleo poliploide	10 / 5,22%	17 / 17,34%
Intérfase	56 / 29,16%	38 / 38,77%
Prófase	88 / 45,83%	30 / 30,61%
Metáfase	13 / 6,77%	1 / 1,02%
Anáfase	7 / 3,64%	0 / 0%
Telófase	0 / 0%	0 / 0%
Demais tipos celulares	18 / 9,37%	12 / 12,24%
Total	192 / 100	98 / 100%

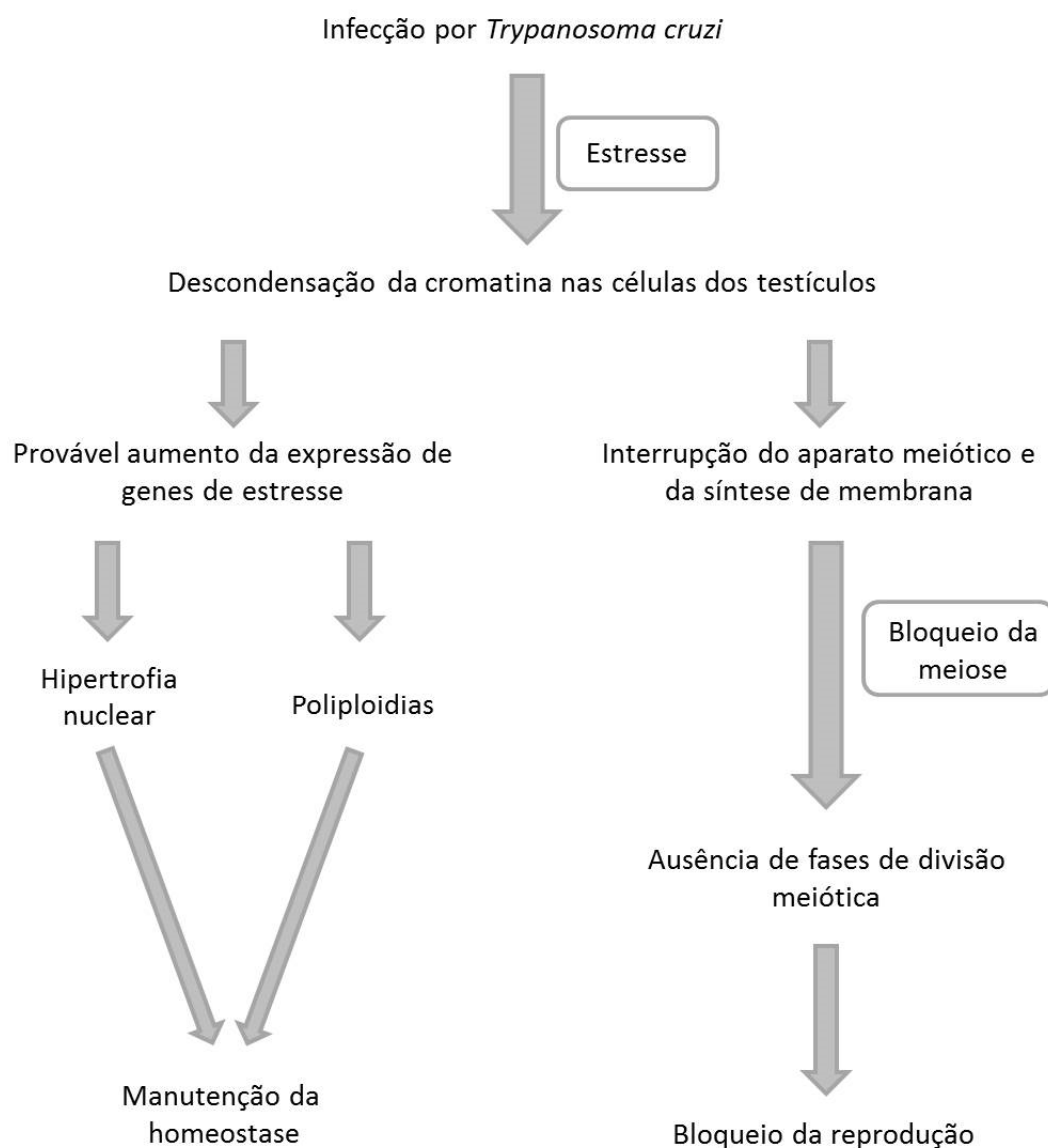
4.4.3. *Panstrongylus megistus*

Na Tabela 4 pode ser verificado que assim, como as demais espécies analisadas, *P. megistus* também apresentou uma diminuição no número de células presentes na lâmina, entretanto, esta foi a diferença mais discreta entre as espécies, sendo evidenciado ainda, o aumento da quantidade de núcleos poliplóides, células em intérfase e demais tipos celulares.

Tabela 4: Comparação entre as quantidades dos tipos celulares presentes em lâminas de túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus* não contaminados e submetidos à contaminação por *Trypanosoma cruzi*.

	<i>Panstrongylus megistus</i> não contaminado	<i>Panstrongylus megistus</i> contaminado
Núcleo poliplóide	18 / 13,84%	20 / 19,6%
Intérfase	30 / 23,07%	35 / 34,31%
Prófase	42 / 32,3%	26 / 25,49%
Metáfase	10 / 7,69%	1 / 0,98%
Anáfase	6 / 4,61%	0 / 0%
Telófase	0 / 0%	0 / 0%
Demais tipos celulares	24 / 18,46%	21 / 20,58%
Total	130 / 100%	102 / 100%

Concluindo,



Assim:

↑ Intérfase e ↓ células em divisão = parada do ciclo celular

Figura 11: Esquema dos efeitos da contaminação no organismo dos triatomíneos.

A coloração orceína lacto-acética evidenciou diferenças na distribuição da cromatina, bem como mudanças na área nuclear em todas as espécies objetos desse estudo. É possível que isso seja decorrente do estresse induzido pela infecção parasitária.

Pode ser sugerido que a contaminação pelo *T. cruzi* afeta o organismo dos triatomíneos de tal maneira, que as defesas celulares são ativadas para a proteção do organismo, colocando em segundo plano a espermatogênese e, conseqüentemente, a reprodução. Dessa forma, avalia-se que a contaminação por este protozoário pode ser comparada aos estresses de jejum e choques térmicos, os quais estão entre as várias condições de tensão fisiológica que induzem à descondensação da cromatina, possivelmente devido à ativação do mesmo sistema gênico nas três situações.

Nos insetos livres de contaminação, a cromatina apresentou-se compactada, mas naqueles contaminados, foi visível a descondensação cromatínica e a desorganização nuclear. Tal situação fisiológica é, provavelmente, devido a uma interação entre o DNA, as proteínas básicas e a síntese de RNA.

Devido à ausência de estudos em triatomíneos relacionados à contaminação por *T. cruzi* e as suas conseqüências nos organismos desses insetos, na presente discussão foram utilizadas como referências os trabalhos relacionados aos estresses fisiológicos de ausência de alimentação, por contaminação de metais pesados e por alteração de temperatura (choques térmicos). Nesses estudos pode-se observar não só a descondensação da heterocromatina e a degeneração de alguns núcleos, mas também os processos de fusão nuclear que ocorreram em resposta ao estímulo de fome

(WIGGLESWORTH 1967a, b, 1982; MELLO e RAYMUNDO 1978). Assim como em outros estudos foi relatada uma variação considerável no número de núcleos envolvidos, indicando possivelmente um mecanismo de sobrevivência da célula em condições metabólicas extremamente baixas (WIGGLESWORTH 1967; MELLO e VIDAL 1979).

Resposta semelhante são encontradas na literatura onde foram analisados os túbulos de Malpighi, foi possível observar alterações celulares notáveis derivadas do estresse fisiológico (jejum e alteração de temperatura) ao qual as espécies foram submetidas, tais como mudanças em áreas nucleares, bem como descondensação cromatínica nos diversos fenótipos nucleares (CASSEB-HASSAN; SANTOS; AZEREDO-OLIVEIRA, 2001).

Variações no período de infecção não foram abordadas neste presente estudo, devido a evidências que indicam que após 5 dias sem alimentação, o organismo dos triatomíneos começa a sofrer efeitos fisiológicos relativos ao jejum. Entretanto, já relatado (CASSEB-HASSAN; SANTOS; AZEREDO-OLIVEIRA, 2001) que de acordo com o período de jejum, há alterações na distribuição da cromatina, que se tornam mais descondensadas ao longo do processo.

De acordo com Mello (1989), a mudança que ocorre no estado da condensação da heterocromatina facultativa em resposta à estressores fisiológicos pode representar uma tentativa de ativar genes que normalmente estão "silenciados".

Nesse contexto, apresenta-se o gene *def1*, que codifica um peptídeo que é encontrado nos mais diversos organismos, incluindo diferentes células de diversas espécies de mamíferos. Nos seres humanos, em insetos e plantas, as defensinas contribuem de forma significativa para a defesa do hospedeiro contra invasão de microorganismos (RAJ; DENTINO, 2002). Supõe-se que esse seja um dos genes

responsáveis pela cascata imune inata nos organismos durante a infecção por *T. cruzi*. O aumento da taxa metabólica leva a descondensação cromatínica e hipertrofia nuclear.

Semelhantemente como observado por Dantas e Mello, em 1992, que constataram a presença de núcleos gigantes, após um período em que os túbulos de Malpighi foram submetidos a choques térmicos, no presente estudo também foi possível observar um aumento celular nas células dos túbulos seminíferos dos triatomíneos, submetidas à Reação de Feulgen. Esse aumento pode ser verificado nas escalas das imagens das fotomicrografias, comparando-se os volumes celulares de forma qualitativa.

Outro evento interessante, relatado por Casseb-Hassan (1997), é o aumento da poliploidia, provavelmente representado pelas fusões de corpúsculos nucleolares como consequência da impregnação diferencial pelos íons prata. No presente estudo também foram evidenciadas as mesmas características de aumento da ploidia, principalmente, nas células císticas, conhecidas como núcleos poliploides. Essas células apresentaram, em uma comparação visual, um volume nuclear aumentado e um padrão de corpúsculos alterado, quando comparado aos indivíduos não contaminados.

A reunião de corpúsculos nucleolares sugere aumento da necessidade metabólica celular para uma mais rápida transcrição de moléculas de RNA ribossômico. Essa demanda transcricional deve estar ligada à indução de síntese de proteínas de estresse que são importantes para manter a taxa de sobrevivência dos insetos (CASSEB-HASSAN, 1997). Este fenômeno possivelmente desencadeia um aumento da atividade transcritiva, permitindo não só a recuperação das atividades celulares normais, mas também estimulando o metabolismo, como em outros casos já relatados (ATIKINSON & WALDEN, 1985).

Fakan e Hernandez-Verdum (1986) relacionaram o formato nucleolar variável com alterações da atividade transcricional dessa estrutura nuclear, de acordo com a fase do desenvolvimento do inseto e/ou ritmo circadiano. Sobre esse aspecto no presente estudo, poderíamos acrescentar mais uma justificativa para a alteração do formato nucleolar, ou seja, a contaminação pelo parasito *T. cruzi*.

Corroborando essa suposição, encontramos a observação de Mello e Raymundo (1980), em que a poliploidia em células com atividade aumentada pode refletir, como em outros casos, a grande demanda para produção de RNAs pelas células. É um processo adaptativo em que as células economizam tempo fisiológico e síntese protéica, isto é, não havendo a formação do aparelho mitótico e membrana nuclear necessários para uma divisão celular.

A observação no presente estudo de núcleos altamente poliploides, com grande número de corpúsculos nucleolares, pode ser explicada também pela brusca alteração do metabolismo do inseto. A resposta a esses estresse leva ao aumento dos componentes nucleoprotéicos com a finalidade de promover maior transcrição de RNAr e, conseqüentemente, de síntese de “proteínas do estresse”. Como já mencionado anteriormente, esse mecanismo leva à manutenção da taxa de sobrevivência dos triatomíneos após períodos de estresse.

A análise da quantificação celular, em todas as espécies analisadas, evidenciou uma diminuição do número de células presentes nas lâminas confeccionadas com túbulos seminíferos de indivíduos previamente contaminados (KARABAY & OGUZ, 2005). Esse método é usada em diversos estudos, principalmente de caráter toxicológico, sendo que a diminuição ocorre principalmente pela interferência no ciclo

celular, muitas vezes levando as células à apoptose (REIMANN & MILTENBURGER, 1983; DADA et al., 1984; GUERRA, 2002; KARABAY & OGUZ, 2005).

Isso justificaria a redução do número de célula em divisão observada em nosso estudo, indicando que a contaminação pelo protozoário ocasionaram uma desestruturação celular nos testículos dos triatomíneos e uma variação do número de nucléolos, essas alterações podem ser atribuídas a uma oscilação das funções fisiológicas no órgão.

Sendo assim, os resultados do presente estudo evidenciaram que o parasito *T. cruzi* foi capaz de interferir diretamente na divisão meiótica e, por consequência, na espermatogênese do vetor, bloqueando esse processo e disparando mecanismos de síntese de proteínas para controlar o estresse induzido pela infecção.

Os resultados obtidos com o presente estudo proporcionaram a visualização de características celulares diferentes em indivíduos contaminados e não contaminados pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, nos túbulos seminíferos dos triatomíneos

Dessa forma, sugere-se que o estresse fisiológico provocado pela presença do parasito alterou os túbulos seminíferos dos triatomíneos, ocasionando uma remodelação (Fig. 11) nesses organismos, visando suprir os prejuízos ocasionados pela infecção e a interrupção da gametogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F.; PAVAN, M. G.; JARAMILLO, N.; PALOMEQUE, F. S.; DALE, C.; CHAVERRA, D.; MONTEIRO, F. A. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from western Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 92-99, 2013.

ALEVI, K. C. C.; CASTRO, N. F. C.; LIMA, A. C. C.; RAVAZI, A.; MORIELLE-SOUZA, A.; DE OLIVEIRA, J.; DA ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Nucleolar persistence during spermatogenesis of the genus *Rhodnius* (Hemiptera, Triatominae). **Cell Biology International**, v. 38, n. 8, p. 977-80, 2014.

ALEVI, K. C. C.; MENDONÇA, P. P.; PEREIRA, N. P.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Is there post-meiotic transcriptional activity during hemipteran spermiogenesis? **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 58, n. 3, p. 1-6, 2014.

ALEVI, K. C. C.; DA ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Mini Review: karyotypic survey in Triatominae subfamily (Hemiptera, Heteroptera). **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 2, n. 2, p. 1-2, 2013.

ANDRADE S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Rev Patol Trop** v. 3, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and Zymodemes of *Trypanosoma cruzi* Strains: Correlations with Clinical Data and Experimental Pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 30, n. 1, p. 27-35, 1997.

ARAÚJO, C. A. C.; CABELLO, P. H.; JANSEN, A. M. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: In vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. **Acta Tropica**, v. 101, p. 225-231, 2007.

ARAÚJO, C. A. C.; WANIEK, P. J.; STOCK, P.; MAYER, C. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from

the gut of the reduviid bug, *Triatoma brasiliensis*. **Insect Biochem Mol Biol.**; v. 36, p. 547–560, 2006.

ATKINSON, B.G.; WALDEN, D.B. Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. **Orlando Academic Press**, 1985.

BALLAN-DUFRANÇAIS, C.; RUSTE, J.; JEANTET, A.Y. Quantitative electron probe microanalysis on insects exposed to mercury. I. Methods. An approach on molecular form of the stored mercury. Possible occurrence of metallothionein-like protein. **Biol Cellulaire**.v. 39, p. 317-324, 1980.

BARDELLA, V.B.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; TARTAROTTI, E. Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *Triatoma melanosoma* (Reduviidae; Heteroptera). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 326-335, 2008.

BARTHOLOMAY, L. C.; CHO, W. L.; ROCHELEAUD, T. A.; BOYLE, J. P.; BECK, E. T.; FUCHS, J. F.; LISS, P.; RUSCH, M.; BUTLER, K. M.; WU, R. C. C.; LIN, S. P.; KUO, H. Y.; TSAO, I. Y.; HUANG, C. Y.; LIU, T. T.; HSIAO, K. J.; TSAI, S. F.; YANG, U. C.; NAPPI, A. J.; PERNA, N. T.; CHEN, C. C.; CHRISTENSEN, B. M. Description of the Transcriptomes of Immune Response-Activated Hemocytes from the Mosquito Vectors *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 7, p. 4114-4126, 2004.

BENCHIMOL-BARBOSA, P.R. Further comments on oral transmission of Chagas' disease in Brazil: epidemiology, geographical distribution and viability of the infective parasite. **Int. J. Cardiol.** v. 141, n. 2, p. 203-204, 2009.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. e52-4, 2009.

BRENER, Z.; ANDRADE, A. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979.

BULET, P.; CHARLET, M.; HETRU, C. Antimicrobial peptides in insect immunity. **Infectious Disease: Innate Immunity. Humana Press**, p. 89–107, 2002.

CAMPOS, E. S. Estudo sobre uma raça neurotrópica de *Trypanosoma cruzi*. **Ann Fac Med.** v. 2, p. 197-201, 1927.

CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H. Phylogeny of the triatominae. In Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas, Fiocruz, Rio de Janeiro, v. 3, p. 569-925, 1999.

CASSEB-HASSAN, P.M.; SANTOS, A.B.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Analysis of chromatin and nuclear area alterations in triatomines during starvation. **Caryologia.** v. 54, n. 3, p. 245-251, 2001.

CASSEB-HASSAN. **Efeito do estresse nos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de triatomíneos.** 1997, 159 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1997.

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

CLAVAGUERA, A.; QUEROL, E.; COLL, D.; GENESCA, J.; EGOZCUE, J. In silver stainability on nucleolar organizer regions exclusively attributable to proteins. **Cell Mol Biol.**, v. 30, p. 175-177, 1984.

DADA, M.O.; CAMPBELL, G. T.; BLAKE, C.A. Pars distalis cell quantification in normal adult male and female rats. *J Endocrinol.* v. 101, p. 87-NP. 1984.

DE PAULA, A. S.; DIOTAIUTI, L.; SCHOFIELD, C. J. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, p. 712-718, 2005.

DE VAIO, E. S.; CRUCCI, B.; CASTAGNINO, A. M.; FRANÇA, M. E.; MARTINEZ, M. E. Meiotic differences between three triatomine species (Heteroptera, Reduviidae). **Genetica**, v. 67, p. 185-191, 1985.

DUJARDIN, J. P.; PANZERA, P.; SCHOFIELD, C. J. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 223-228, 1999.

DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; ROMANHA, A. J.; DIOTAJUTI, L. Genetic variability of *Triatoma*. **Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 137-143, 1998.

FAKAN, S.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleous and the nucleolar organizer regions. **Biol Cell.**, v. 56: p. 189-206, 1986.

FOGAÇA, A.C.; LORENZINI, D.M., KAKU, L.M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Dev. Comp. Immunol.** v. 28, p. 191–200, 2004.

FREITAS, J. L. P. Observações sobre xenodiagnósticos praticados em reservatórios domésticos e silvestres do *Trypanosoma cruzi* em uma localidade endêmica da moléstia de Chagas no Estado de São Paulo. **Hospital**, v. 38, p. 521–529, 1950.

GARCÍA, B. A.; POWELL, J. R. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 232-238, 1998.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, p. 22–27, 2010.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated Trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 557-565, 2000.

GERNER EW, SCHENEIDER MJ. Induced thermal resistance in HeLa cells. **Nature**. v. 256, p. 500-502, 1975.

GUERRA, M. *Introdução à Citogenética Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.

GUERRI-GUTTEMBERG, R. A.; GRANA, D. R.; AMBROSIO, G.; MILEI, J. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! **Eur. Heart J.**, v. 29, p. 2587-2591, 2008.

HOLLAND, M. K.; WHITL, I. G. Heavy metals and human spermatozoa:II. The effect of seminal plasma on the toxicity of copper metal for spermatozoa. **Int. J Fertil**. v. 27, n. 2, p. 95-99, 1982.

HOWELL, W.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a1-step metod. **Experientia**, v. 36, p. 1014 -5, 1980.

HWANG, W. S.; WEIRAUCH, C. Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45523, 2012.

HYPSA, V.; TIETZ, D. F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R. O. M.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.23, p. 447-57, 2002.

JACKSON, Y.; PINTO, A.; PETT, S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. **Tropical Medicine &International Health**, v. 19, n. 2, p. 212-218, 2014.

JEANTET, A.Y.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C.; RUSTE, J. Quantitative electron probe microanalysis on insects exposed to mercury II. Involvement of the lysosomal system in detoxification processes. **Biol Cellulaire** 1980;39:325-334.

JURBERG, J.; CUNHA, V.; CAILLEAUX, S.; RAIGORDSCHI, R.; LIMA, M. S.; ROCHA, D. S.; MOREIRA, F. F. F. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, p. 43-56, 2013.

JUSTI, S. A.; RUSSO, C. A.; MALLET, J. R.; OBARA, M. T.; GALVÃO, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1-12, 2014.

KARABAY; N.U.; OGUZ, M.G. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genet Mol Res.* v. 4, n. 4, p. 653-662, 2005.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.

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

LI GC, MEYER JL, MAK JY. Heat-induced protection of mice against thermal death. **Cancer Research**. v. 43, p. 5758-5760, 1983.

LOCKE M, NOBLE EG, ATKINSON BG. Exercising mammals synthesize stress proteins. **American Journal of Physiology**. v. 258, p. C723-C729, 1990.

LYMAN, D. F.; MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A.; CORDONROSALES, C.; WESSON, D. M.; DUJARDIN, J. P.; BEARD, C. B. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p.377-386, 1999.

MARCILLA, A.; BARGUES, M. D.; ABAD-FRANCH F.; PANZERA, F.; CARCAVALLO, R. U.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C.; JURBERG, J.; MILES, M. A.; DUJARDIN, J. P.; MAS-COMA, S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly

of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.1, p. 225- 235, 2002.

MARCILLA, A.; CANESE, A.; ACOSTA, N.; LÓPEZ, E.; ROJAS DE ARIAS, A.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Paraguay: a molecular analysis based on the second internal transcribed spacer of the rDNA. **Research and Reviews in Parasitology**, v. 60, p. 99-105, 2000.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. Práticas de Biologia Celular. Campinas: FUNCAMP. Editora Edgard Blcher Ltda, 1980.

MELLO, M.L.S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. **Rev. Bras. Genet.**, v. 12(3): p. 485-498, 1989.

MELLO, M.L.S.; RAIMUNDO, H.H. Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a blood-sucking Hemipteran. **Cytologia**, v. 45: p. 203-209, 1980.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Fusão nuclear e padrões cromatínicos em tubos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug. In: Encontro de Geneticistas Paulistas, 2 São José do Rio Preto, Resumos, p. 26-27, 1979.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17-30, 2009.

MONTE-GONÇALVES, T. C.; TEVES-NEVES, S. C.; SANTOS-MALLET, J. R.; CARBAJAL-DE-LA-FUENTE, A. L.; LOPES, C. M. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 429-437, 2013.

MONTEIRO, F. A.; LAZPSKI, C., NOIREAU, F.; SOLE-CAVA, A. M. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 16, p. 83-90, 2002.

MOREL C. M.; LAZDINS J. Chagas disease. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, p. 14–15, 2003.

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

MORIELLE-SOUZA, A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 713-720, 2007.

NETO, V. A. Centenário da doença de Chagas. **Rev. Saúde Pública**, v. 43, p. 381-382, 2009.

NOIREAU, F.; SANTOS, S. M.; GUMIEL, M.; DUJARDIN, J. P.; SOARES, M. S.; CARCAVALLO, R. U.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogenetic relationships within the *oliveirai* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, p. 11-17, 2009.

OSCH, R. L.; BUSCH, H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110kd/p15, I) is the nucleolar silver staining protein. **Experimental Cell Research**, v. 152, p. 260-265, 1984.

PANZERA, F.; ALVAREZ, F.; SANCHEZ-RUFAS, J.; PÉREZ, R.; SUJA, J.; SCVORTZOFF, E.; ESTRAMIL, E.; DUJARDIN, J. P.; SALVATELLA, R. Cheterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatominae* (Hemiptera-Reduviidae). **Genome**, v. 35, p. 1068-1074, 1992.

PANZERA, F.; PEREZ, R.; PANZERA, Y.; ALVAREZ, F.; SCVORTZOFF, E.; SALVATELA, R. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Heteroptera-Reduviidae). **Chromosome Research**, v. 3, p. 143-150, 1995.

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

PÉREZ, 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). **Memórias do Instituto OswaldoCruz**, v. 87, n. 3, p. 353-361, 1992.

PÉREZ, R.; RUFAS, J.; SUJA, J.; PANZERA, F. Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 8, p. 17-25, 2000.

RAJ, P.A.; DENTINO, A.R. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 206, p. 9–18, 2002.

RAMIREZ, M. I.; RUIZ, R. C.; ARAYA, J. E.; SILVEIRA, J. F.; YOSHIDA, N. Involvement of the Stage-Specific 82-Kilodalton Adhesion Molecule of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes in Host Cell Invasion. **Infection and Immunity**. v. 61, p. 3636-3641, 1993.

RAZDAN, P.; MWANZA, A.M.; KINDAHL, H.; HULTEN, F.; EINARSSON, S. Impact of postovulatory food deprivation on the ova transport, hormonal profiles and metabolic changes in sows. **Acta Vet. Scand.** v. 42, p.15-25, 2001.

REIMANN, R.; MILTENBURGER H. G.; Cytogenetic studies in mammalian cells after treatment with insect pathogenic viruses (Baculoviridae}. II. In vitro studies with mammalian cell lines. *Entomophaga*. v. 28, n. 1, p. 33-44, 1983.

RYAN AJ, GISOLFI CV, MOSELEY PL. Synthesis of 70K stress protein by human leukocytes: effect of exercise in the heat. **Journal of Applied Physiology**. v. 70, p. 466-471, 1991.

SAINZ, A. C.; MAURO, L. V.; MORIYAMA, E. N.; GARCÍA, B. A. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. **Genetica**, v. 121, p. 229–240, 2004.

SCHAEFER, C. W. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): systematic questions and some others. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 1, p. 1-10, 2003.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, p. 14–21, 2010.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of the Triatominae. In: SERVICE, M. W. **Biosystematics of Haematophagous Insects**. Oxford, England, Clarendon Press. p.285-312, 1988.

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

SCHRADER, F. The role of the Kinetochore in the chromosomal evolution of the Heteroptera and Homoptera. **Evolution**, v. 1, n. 3, p. 134-142, 1947.

SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Cytogenetical studies on brazilian Hemiptera. **Hereditas**, v. 656, VIIIth International Congress of Genetics – Stockholm, 1948.

SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Localization of rDNA sites in holocentric chromosomes of three species of triatomines (Heteroptera, Triatominae). **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 4, p. 704- 709, 2005.

SILVA L.H.; NUSSENZWEIG V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin Biol**. v. 20, p. 191-207, 1953.

SOLARI, A. J. Autosomal synaptonemal complexes and sEx chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Heteroptera, Reduviidae). **Chromosoma**, v. 72, p. 225-240, 1979.

STELLE, L. S.; MACPHERSON, D. W.; KIM, J.; KEYSTONE, J. S.; GUSHULAK, B. D. The sero-prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Latin American refugees and immigrants to Canada. **Journal of Immigrant and Minority Health**, v. 9, p. 43-47, 2007.

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

STRASEN, J.; WILLIAMS, T.; ERTL, G.; ZOLLER, T.; STICH, A.; RITTER, O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clinical Research in Cardiology**, v. 103, p. 1-10, 2014.

SUMNER, A. T. Chromosome banding. London:Unwin Hyman, 434p., 1990.

SUMNER, A. T. The nature of mechanisms of chromosome banding. **Cancer Genetics and Cytogenetic**, v. 6, p. 59-87, 1972.

TARTAROTTI, E. *Estudo Citogenético em Triatomíneos do gênero Panstrongylus* (Triatominae, Heteroptera). (Master thesis). IBILCE – UNESP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 1998, 189p.

TAVARES, M. G.; AZEREDO-OLIVEIRA; M. T. V. Aspectos biológicos e médico sanitários dos Triatomíneos. **HB Científica**, v. 3, n. 2, p. 137-144, 1996.

UENO, Y.; NAKAMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; INOUE, T.; ENDO, S.; KINOSHITA, M.; TAKEUCHI, T. A highly suspected case of chronic Chagas's heart disease diagnosed in Japan. **Japanese Circulation Journal**, v. 59, p. 219- 223, 1995.

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

URSIC-BEDOYA, R. J.; LOWENBERGER, C. A. *Rhodnius prolixus*: Identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 31, p. 109-120, 2007.

USINGER, R. L. The Triatominae of North and Central America and the West Indies. **Public Health Bulletin**, v. 88, p. 1-83, 1944.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas": (Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 3, n. 2, p. 276-294, 1911.

VIDAL, B.C; MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes *in vitro*. **Acta Histochem. Cytochem.** v. 22(4): p:471-478, 1989.

VIGH L, MARESCA B, HARWOOD JL. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? **TIBS**. v. 23, p. 369-374, 1998.

WANIEK, P. J.; CASTRO, H. C.; SATHLER, P. C.; MICELI, L. Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): gene expression and peptide-structure modeling. **J Insect Physiol.** v. 55, p. 840–848, 2009.

WANIEK, P. J.; JANSEN, A. M.; ARAÚJO, A. C. *Trypanosoma cruzi* Infection Modulates the Expression of *Triatoma brasiliensis* def1 in the Midgut. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases.** v. 11, n. 7, 2011.

WEIRAUCH, C.; MUNRO, J. B. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, p. 287-299, 2009.

WELCH WJ. How cells respond to stress. **Scientific American.** v. 268, p. 34-41, 1993.

WHITE, M. J. D. Animal cytology and evolution. Cambridge University Press. London, 3 ed., 1973.

WIGGLESWORTH, V.B. The physiology of excretion in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). I Composition of the urine. **J Exp Biol**, v. 8: p. 411-451, 1931

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2011.

World Health Organization. Reporte del grupo de trabajo científico sobre La enfermedad de Chagas. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2007.

Trabalho publicado durante o Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (Ibilce/Unesp)

Spermatogenesis and nucleolar behavior in *Triatoma vanda* and *T. williamsi* (Hemiptera, Triatominae)

Running title: **Spermatogenesis in triatomines**

N.P. Pereira¹, K.C.C. Alevi¹, P.P. Mendonça¹, M.T.V Azeredo-Oliveira¹

¹ Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Corresponding author:

Kaio Cesar Chaboli Alevi
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE – UNESP.
Rua Cristovão Colombo, 2265
Jardim Nazareth
15054-000 – São José do Rio Preto, SP – Brasil
Telefone: (17) 32212380 Ramal: 2787
E-mail: kaiochaboli@hotmail.com

ABSTRACT

The present study aims to describe the spermatogenesis of *Triatoma vanda* and nucleolar behavior *T. vanda* and *T. williamsi*, with cytotaxonomic focus. Analysis of mitotic and meiotic metaphases of *T. vanda* allowed confirms the species karyotype. *T. vanda* presented some characteristics during meiosis that allowed differentiates it of *T. williamsi*, out more, presence of chromocenter with two sex chromosomes individualized during early prophase and the presence of a bi or tripartite corpuscle in polyploid nuclei. It was possible to observe the compaction of chromatin during prophase resulting in holocentric chromosomes. During metaphase, the autosomes present in a ring shape and the sex chromosomes were in the center of the ring. These chromosomes were separated in anaphase. Although it is common, we did not observe the phenomenon of late migration of the sex chromosomes. By means of impregnation technique by silver ions was possible to describe the nucleogenesis of *T. vanda* and *T. williamsi*. In both species we observed persistence of the nucleolar material during meiosis. In addition to the cells in meiotic division, we also observed the presence of polyploid nuclei that are of the seminiferous tubule wall that nourish the cells during cell division. The nucleolar markings reflect the capacity of synthetic activity. *T. vanda* and *T. williamsi* presented only one nucleolar corpuscle, which reflects low synthetic activity. Thus, this study confirms the karyotype of *T. vanda*, presents characteristics that allow differentiating *T. vanda* and *T. williamsi* during meiosis and describes the phenomenon of nucleolar persistence in both species.

Keywords: cytotaxonomy; nucleolar persistence; matogrossensis subcomplex

INTRODUCTION

Chagas disease is the parasitemy that causes the human health problem of major socioeconomic impact in Latin America (WHO, 2012). This disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and the main form of transmission is through vector, the triatomines (Chagas, 1909).

In 2013, 7 or 8 million of people are estimated to be infected worldwide, mostly in Latin America (WHO, 2013). In Brazil, the number of infected is estimated at two million and a half of individuals (Neto, 2009). Due to lack of anti-trypanosomal drugs, the main method of disease control has been the vector control (WHO, 2013), thus demonstrating the importance of studies to aid in the control of Chagas disease.

In this context, cytogenetic studies applied the taxonomy of the triatomines are important tools for vector control programs because the correct classification of triatomine allows vector control programs focus on species of primary importance in the transmission of Chagas disease (Alevi et al., 2012a).

Triatomine bugs are hematophagous insects classified in the Hemiptera order, Heteroptera suborder, Reduviidae family and Triatominae subfamily (Lent and Wygodzinsky, 1979). These vectors have some peculiar characteristics, such as holocentric chromosomes with diffuse kinetochores (Panzeria et al., 1996), inverted

meiosis for sex chromosomes (Gómez-Palacio et al., 2008) and nucleolar persistence during meiosis (Tartarotti et al., 1999).

Schofield and Galvão (2009) grouped triatomines in complexes and specific subcomplexes, based primarily in the geographical disposition and morphological characters. However, by means of new tools these groups of insects are being reassessed and, in some cases, modified, as can be observed for the species of the brasiliensis subcomplex (Alevi et al., 2012a, b, 2013 b, c, d, e, 2014a, b; Gardim et al., 2014; Mendonça et al., 2014).

The matogrossensis subcomplex is the new name of *T. oliverai* complex proposed by Carcavallo et al. (2000). This subcomplex is composed of nine species: *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. guazu*, *T. jatai*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vandae* and *T. williami* (Schofield and Galvão, 2009; Gonçalves et al., 2013) that occur in the midwestern region of Brazil (Obara et al. 2012).

Gardim et al. (2013) through of phylogenetic reconstruction with COI, Cytb and 16S, have not recovered as a subcomplex matogrossensis monophyletic group and the species were grouped into three different clades: 1) *T. jurbergi* + *T. matogrossensis* + *T. vandae*; 2) *T. guasayana* as the sister group of clade 1 and 3) *T. williami* + *T. guazu*. Thus, the present study aims to describe the spermatogenesis of *T. vandae* and nucleolar behavior *T. vandae* and *T. williami*, with cytotaxonomic focus.

MATERIAL AND METHODS

At least five specimens of *T. vandae* and *T. williami* were taken from a colony maintained at the “Triatominae Insectarium” of São Paulo State University (UNESP, in the city of Araraquara, Brazil). The seminiferous tubules of adult triatomines males were analyzed, because spermatogenesis in Hemiptera continues into adulthood, and the different stages of meiosis can be observed. After dissection, the seminiferous tubules were placed in methanol acetic acid (3:1), and then stored in a freezer at -20°C. For the slide preparation, each tubule received two baths in distilled water for 5 minutes. Next, the tubule was placed in 45% acetic acid solution for 10 minutes. The seminiferous tubule was squashed and the material was stained with lacto-acetic orcein (De Vaio et al., 1985, with modifications according by Alevi et al., 2012a) and impregnation by silver ions (Howell and Black, 1980). The slides were examined under a Zeiss-Jenaval light microscope (magnified 1000x). The images were captured using the Axio Vision LE 4.8 (Copyright © 2006-2009 Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH).

RESULTS

Lacto-acetic orcein

The conventional cytogenetic technique of lacto-acetic orcein allowed describing the spermatogenesis of *T. vandae* (Figure 1). The polyploid nuclei of *T. vandae* showed a corpuscle bi or tri broken (Figure 1a, arrow). Through the analysis of the cell in mitotic metaphase, was possible to confirm the number of chromosomes of the species $2n = 22$ (20A + XY) (Figure 1b). During meiosis, we observed compaction of chromatin and highlight a chromocenter formed by the sex chromosomes in cells in prophase (Figure 1c-e, arrows). In the initial stage diffuse, it was possible to distinguish

the sex chromosomes (Figure 1c, arrow) compacted during the intermediate stage diffuse (Fig. 1d, arrow) and final (Figure 1e, arrow). Cells in metaphase I (Figure 1f) and metaphase II (Figure 1g) also confirmed the karyotype $2n = 22$. During anaphase, we observed migration of the chromosomes to the poles of the cells (Figure 1h, i).

Impregnation by silver ions

By means of the technique of impregnation by silver ions was possible to describe the nucleolar behavior of *T. vanda* and *T. williami* during meiosis. As *vanda* *T. vanda* and *T. williami* showed the same characteristics, we present only a board (Figure 2). Polyploid nuclei showed only one corpuscle nucleolar (Figure 2a). During prophase, we observed the presence of nucleolar material (Figure 2b-d, arrows). Note during the stages of prophase (arrow), the nucleolus will fragmenting (arrows) and these fragments persist during metaphase (Figure 2d, arrow) and anaphase (Fig. 2e, arrow).

DISCUSSION

T. vanda and *T. williami* are potential vectors of Chagas disease in the midwestern region of Brazil, where *T. vanda* was collected in the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul and *T. williami* in Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul (Gurguel-Golçalves et al., 2012). It is known that *T. williami* is an invasive species of residential areas (peri and intradomiciliary) and, in 2011, was found infected by *T. cruzi* (Arrais-Silva et al., 2011). The information on the biology, ecology and epidemiology of *T. vanda* are still unknown, which emphasizes the importance of this work.

Analysis of mitotic and meiotic metaphase of *T. vanda* allowed confirm the species karyotype which was previously described by Panzera et al. (2010). This number of chromosomes is observed in all insects grouped in *matogrossensis* subcomplex (Panzera et al., 2010; Succi et al., 2013; Alevi et al., 2014c).

Recently, the spermatogenesis of *T. williami* has been described (Succi et al., 2013). *T. vanda* presented some characteristics during meiosis that allowed differentiates it of *T. williami*, out more, presence of chromocenter with two sex chromosomes individualized during early prophase and the presence of a bi or tripartite corpuscle in polyploid nuclei. These results, in sets with morphological analyzes of egg and nymphs (Silva et al., 2005) which also allowed the species differences, are important taxonomic tools.

The chromosomes of *T. vanda* behaved in a way similar to that described for *Triatominae* subfamily (Ueshima, 1966). It was possible to observe the compaction of chromatin during prophase resulting in holocentric chromosomes. During metaphase, the autosomes present in a ring shape and the sex chromosomes were in the center of the ring. These chromosomes were separated in anaphase. Although it is common, we did not observe the phenomenon of late migration of the sex chromosomes.

By means of impregnation technique by silver ions was possible to describe the nucleogenesis of *T. vanda* and *T. williami*. The nucleolus is a nuclear structure common to all eukaryotic cells and is responsible for ribosome biogenesis that occurs by means of a series of events involving rRNA gene transcription, pre-processing of ribosomal RNAs and the meeting of pre-ribosomal particles (Scherr et al., 1997). Variations in the pattern of transcriptional activity, expressed by differences in the size

or number of nucleolus, may result in a reduction or absence of rDNA, or perhaps a process of gene regulation (Galletti-Júnior et al., 1985).

In both species we observed persistence of the nucleolar material during meiosis. The phenomenon of nucleolar persistence during spermatogenesis is characterized by the presence of the nucleolus or nucleolar corpuscles in meiotic metaphase, since, generally, in eukaryotes the nucleolus is fragmented in late prophase and is only reorganized at the end of prophase. This phenomenon was described in 21 species of triatomines (Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999; Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira, 2004, 2007; Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira, 2005, 2006; Costa et al., 2008; Alevi et al., 2013f, 2014d) and Alevi et al. (2014d) propose that such features it is a synapomorphy of the subfamily Triatominae.

In addition to the cells in meiotic division, we also observed the presence of polyploid nuclei that are of the seminiferous tubule wall that nourish the cells during cell division. Thus, the nucleolar markings reflect the capacity of synthetic activity. *T. vandae* and *T. williami* presented only one nucleolar corpuscle, which reflects low synthetic activity. Alevi et al. (2013f) analyzed polyploid nuclei of *T. melanocephala* and *T. lenti* and suggested greater synthetic activity in *T. lenti* by having large number of nucleolar corpuscles.

Thus, this study confirms the karyotype of *T. vandae*, presents characteristics that allow differentiating *T. vandae* and *T. williami* during meiosis and describes the phenomenon of nucleolar persistence in both species. These data are important for evolutionary studies of these vectors of Chagas disease.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- Alevi KCC, Castro NFC, Lima ANC, Ravazi A, et al. (2014d). Nucleolar persistence during spermatogenesis of the *Rhodnius* (Hemiptera, Triatominae). *Cell Biol. Int.* 38: 977-980.
- Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Fernandes ALVZ, et al. (2013e). Analysis of spermiogenesis like a tool in the study of the triatomines of the Brasiliensis subcomplex. *C. R. Biologies.* 336: 46-50.
- Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Guerra AL, et al. (2013d). Distribution of constitutive heterochromatin in two species of triatomines: *Triatoma lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata (2002). *Infect. Gen. Evol.* 13: 301-303.
- Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2012b). Karyotype and spermatogenesis in *Triatoma lenti* (Hemiptera: Triatominae), a potential Chagas vector. *Gen. Mol. Res.* 11: 4278-4284.
- Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2013b). Spermatogenesis in *Triatoma melanocephala* (Hemiptera: Triatominae). *Gen. Mol. Res.* 12: 4944-4947.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2013c). Heteropyknotic filament in spermatids of *Triatoma melanocephala* and *T. vitticeps* (Hemiptera, Triatominae). *Inv. Rep. Dev.* 58: 9-12.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2013f) Análise das Regiões Organizadoras Nucleolares e da atividade nucleolar em *Triatoma melanocephala* e *T. lenti*, importantes vetores da doença de Chagas. *Rev. Ciênc. Farm. Basica Apl.* 34: 417–21.

Alevi KCC, Mendonça PP, Succi M, Pereira NP, et al. (2012a). Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? *Infect. Gen. Evol.* 12: 1652-1653.

Alevi KCC, Reis YV, Borgueti AO, Mendonça VJ, et al. (2014c). Diploid chromosome set of kissing bug *Triatoma baratai* (Hemiptera, Triatominae). *Gen. Mol. Res.*, in press.

Alevi KCC, Rosa JÁ and Azeredo-Oliveira MTV (2014a). Spermatogenesis in *Triatoma melanica* Neiva and Lent, 1941 (Hemiptera, Triatominae) *J. Vec. Ecol.* 39: 231-233.

Alevi KCC, Rosa JÁ and Azeredo-Oliveira MTV (2014b). Citotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera, Triatominae). *Zootaxa*, in press.

Arrais-Silva WW, Rodrigues RSV, Moraes LN, Venere PC, et al. (2011). First report of occurrence of *Triatoma williamsi* Galvão, Souza e Lima, 1965 naturally infected with *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 in the State of Mato Grosso, Brazil. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 1: 245–246.

Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, et al. (2000) Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol. Vect.* 7: 1-99.

Chagas C (1909). Nova Tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159–218.

Costa LC, Azeredo-Oliveira MTV and Tartarotti E (2008). Spermatogenesis and nucleolar activity in *Triatoma klugi* (Triatominae, Heteroptera). *Gen. Mol. Biol.* 31: 438–44.

De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, et al. (1985). Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Genetica.* 67: 185-191.

Galletti-Júnior PM, Silva EB and Cerminaro RTA (1985). Multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). *Rev. Bras. Gen.* 8: 479-484.

Gardim S, Almeida CE, Takiya DM, Oliveira J, et al. (2014). Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Inf. Gen. Evol.* 23: 74-79.

Gardim S, Rocha CS, Almeida CE, Takiya DM, et al. (2013). Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic triatoma in Central-Western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013: 766-74.

- Gómez-Palacio A, Jaramillo-Ocampo N, Triana-Chávez O, Saldaña A, et al. (2008). Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Rhodniini). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103: 160-164.
- Gonçalves TCM, Teves-Neses SC, Santos-Mallet S, Carbajal-de-la-Fuente, et al. (2013). *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 108: 429-437.
- Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J and Peterson AT (2012). Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brasil based on ecological niche modeling. *J. Trop. Med.* 2012: 1-15.
- Howell WM and Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-15.
- Mendonça VJ, Alevi KCC, Medeiros LMO, Nascimento JD, et al. (2014). Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). *Infect. Gen. Evol.* 26: 123-131.
- Morielle A and Azeredo-Oliveira MTV (2004). Description of the nucleolar activity and karyotype in germinative cell lines of *Rhodnius domesticus* (Triatominae, Heteroptera). *Caryologia* 57: 31-7.
- Morielle-Souza A and Azeredo-Oliveira MTV (2007). Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Gen. Mol. Res.* 6: 713-20.
- Neto VA (2009). Centenário da doença de Chagas. *Rev. Saúde Pública* 43: 381-382.
- Obara MT, Barata JMS, Rosa JA, Ceretti-Junior, W, et al. (2012). Description of the female and new records of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) from Mato Grosso do Sul, Brazil, with a key to the species of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex. *Zootaxa*. 3151: 63-68.
- Panzer F, Pérez R, Hornos S, Panzer Y, et al. (1996). Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91: 515-518.
- Panzer F, Pérez R, Panzer Y, Ferrandis I, et al. (2010). Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytog. Genome Res.* 128: 77-87.
- Scherr U, Xia B, Merkert H and Weisenberg D (1997). Looking at Christmas trees in the nucleolus. *Chromosoma* 105: 470-480.
- Schofield CJ and Galvão C (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae *Acta Trop.* 110: 88-100.
- Severi-Aguiar GDC and Azeredo-Oliveira MT (2005). Cytogenetic study on three species of the genus *Triatoma* (Heteroptera: Reduviidae) with emphasis on nucleolar organizer regions. *Caryologia* 58: 293-9.
- Severi-Aguiar GDC, Lourenço LB, Bicudo HEMC and Azeredo-Oliveira MTV (2006). Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetica* 126: 141-5.

Silva MBA, Jurberg J, Barbosa HS, Rocha D S, et al. (2005). Morfologia comparada dos ovos e ninfas de *Triatoma vandeae* Carcavallo, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau & Lent, 2002 e *Triatoma williamsi* Galvão, Souza & Lima, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 549-561.

Succi M, Alevi KCC, Mendonça PP, Bardella VB, et al. (2013). Spermatogenesis in *Triatoma williamsi* Galvão, Souza and Lima (1965) (Hemiptera, Triatominae). *Inv. Rep. Dev.* 2013. doi: 10.1080/07924259.2013.855268.

Tartarotti E and Azeredo-Oliveira MTV (1999). Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia* 52: 177-184

Ueshima N (1996). Cytotaxonomy of the triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 18: 97-12.

WHO - World Health Organization (2012). Research Priorities for Chagas disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Tech. Rep. Ser.* 1–100.

WHO - World Health Organization Chagas disease (2013). American trypanosomiasis. Accessed in May 2014.

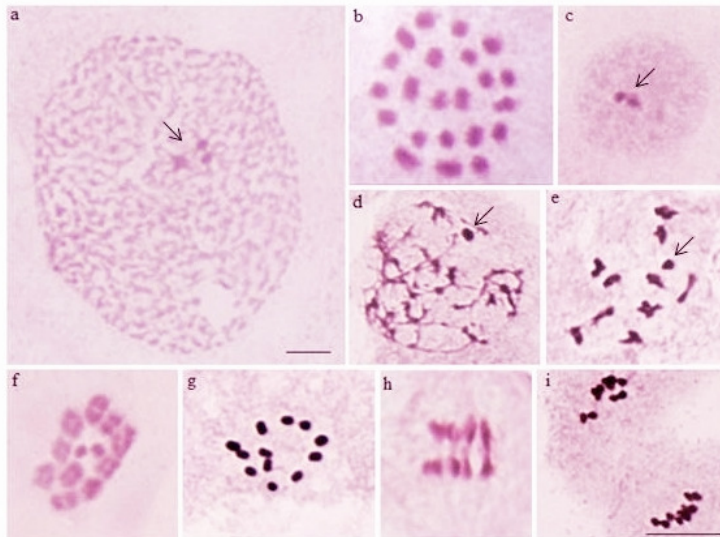


Figure 1. Spermatogenesis of *T. vandae*. a) Note the polyploid nuclei of *T. vandae* showed a corpuscle bi or tri broken (arrow). b) Mitotic metaphase. c-e) Note the compaction of chromatin and a chromocenter formed by the sex chromosomes in cells in prophase (arrows). Note in the initial stage diffuse (c), it was possible to distinguish the sex chromosomes (arrow) which compacted during the intermediate stage diffuse (d, arrow) and final (e, arrow). f) Metaphase I. g) metaphase II. h, i) Anaphase. Note the migration of the chromosomes to the poles of the cells. Bar: 10 µm.

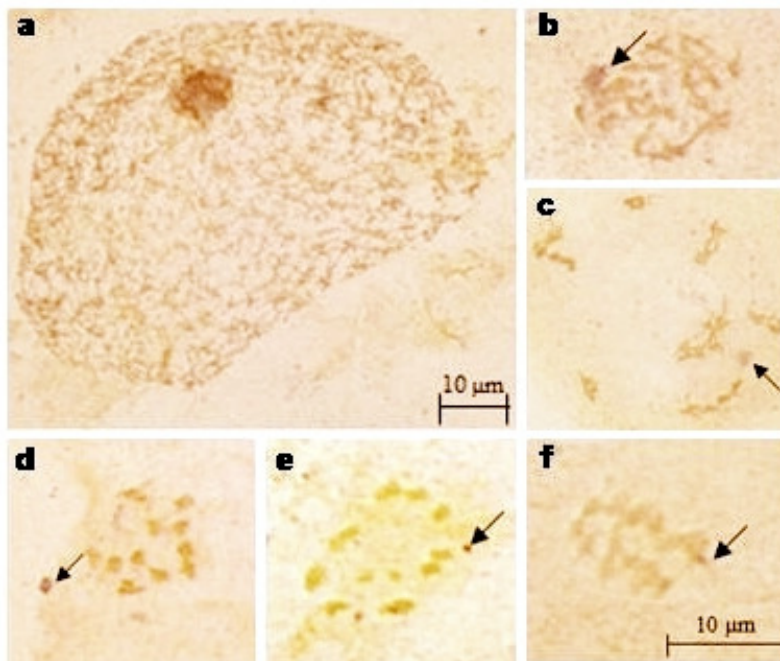


Figure 2. Nucleolar behavior of *T. vandae*. a) Polyploid nuclei showed only one corpuscle nucleolar. b-d) Prophase. Note the presence of nucleolar material (arrows). e) Metaphase. Note the nucleolar persistence (arrow) f) anaphase. Note the nucleolar persistence (arrow). Bar: 10 µm.