

ABORDAGEM CITOGENÉTICA DA ESPÉCIE *Triatoma melanosoma* (HETEROPTERA:REDUVIIDAE)

Vanessa Bellini Bardella, Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira, Ester Tartarotti, Ana Carolina Borella Anhê – Biológicas - Ciências Biológicas - Departamento de Biologia-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto-SP.

A doença de Chagas atinge 18 milhões de pessoas sendo que 120 milhões de indivíduos estão sob risco de contrair esta patologia nas áreas endêmicas. Os vetores da doença de Chagas são insetos hematófagos pertencentes à ordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Atualmente são conhecidas 137 espécies de triatomíneos sendo todas hematófagas e potenciais vetores da moléstia de Chagas. A citogenética é bastante aplicada no estudo de triatomíneos para melhor entendimento do grupo. O cariótipo mais freqüente nos triatomíneos é $2n=20+XY$. Múltiplos cromossomos X ocorrem em algumas espécies devido ao fato dos cromossomos serem holocêntricos nos heteropteras. O modelo de segregação meiótica nesses insetos é diferenciado, enquanto os autossomos são quiasmáticos e segregam-se regularmente durante a meiose, os cromossomos sexuais são aquiasmáticos e possuem segregação pós-reducional.

No presente estudo foram analisados o ciclo meiótico, o ciclo nucleolar e as regiões organizadoras nucleolares, a distribuição e localização das áreas heterocromáticas nos autossomos e heterocromossomos e a presença de RNAs, bem como a persistência desta macromolécula na fase final da espermatogênese de *Triatoma melanosoma*.

Os espécimes foram cedidos pelo insetário da Faculdade de Saúde Pública da USP (Araraquara-SP). Os órgãos analisados foram os testículos de machos adultos submetidos ao esmagamento e espalhamento celular e às técnicas citoquímicas de orceína lacto-acética, Impregnação pelos íons prata, Bandamento-C, Reação de Feulgen e variante da Concentração Crítica Eletrolítica (CEC).

A técnica citoquímica de orceína possibilitou no ciclo meiótico observar espermatócitos com dois cromocentros (Figura 1a). No estágio profásico difuso observou-se regiões heteropicnóticas em disposições periféricas ou centrais (Figura 1b-c). No diplóteno foram visualizados quiasmas terminais e intersticiais nos bivalentes autossômicos (Figura 1d-e). Durante as metáfases I e II os cromossomos sexuais comportaram-se como pseudobivalentes e, ainda nessas fases, três autossomos apresentaram-se maiores e picnóticos (Figura 1f-h-i). Na anáfase foi observada a migração tardia de cromossomos sexuais, que é característica de comportamento holocinético (Figura 1g-j). Nas espermatídes foram evidenciados corpúsculos heteropicnóticos no decorrer do processo de alongamento (Figura 1k). Utilizando-se a técnica de Impregnação por íons prata foi possível a observação de células interfásicas espermatogoniais apresentaram um nucléolo evidente, refletindo a atividade gênica destes núcleos. No estágio profásico difuso inicial observou-se de 3 a 4 corpúsculos nucleolares; e nas fases mais adiantadas desse estágio foi possível visualizar fragmentação nucleolar e a associação desses fragmentos a cromossomos no início de condensação (Figura 2a). Nas fases diplóteno-diacinese foi possível associar a região organizadora nucleolar a 3 autossomos e um cromossomo sexual (Figura 2b). Nas metáfases e anáfases os cromossomos apresentaram-se intensamente compactados dificultando a análise das marcações, entretanto, foi possível observar pequenos fragmentos nucleolares no interior da célula (Figura 2c-d). As espermatídes, no início da espermiogênese, apresentaram um corpúsculo (Figura 2e). Os túbulos seminíferos submetidos ao bandamento-C apresentaram espermatócitos com a formação de dois cromocentros (Figura 3a). As células em estágio difuso inicial exibiram um cromocentro e, próximo a esse, concentrações pontuais de heterocromatina (Figura 3b). Nas células em estágio difuso avançado foram evidenciados, no mínimo, três cromossomos heterocromáticos participando da formação do cromocentro (Figura 3c-d). A presença de regiões heterocromáticas teloméricas foi verificada nas fases de diplóteno-diacinese (Figura 3f). Durante a metáfase I e II as regiões heterocromáticas foram identificadas em três autossomos maiores do complemento cromossômico e no heterocromossomo Y, sendo esse maior que o X (Figura 3g-j). Os resultados obtidos com a técnica de Reação de Feulgen revelaram, nos espermatócitos a presença de dois cromocentros (Figura 4a). No estágio profásico difuso inicial verificou-se a marcação acentuada do cromocentro (Figura 4b). Nas etapas finais dessa fase, foi revelada a heteropicnose dos três autossomos maiores localizados ao redor da região nucleolar (Figura

4c). A utilização da técnica de variante de CEC propiciou o acompanhamento da distribuição dos complexos de RNA/Proteínas-Ribonucleoproteínas (RNPs) ao longo da meiose. Os RNPs foram identificados no estágio difuso ocupando o citoplasma da célula e em regiões adjacentes ao nucléolo (Figura 5b). No processo de diferenciação celular (espermiogênese), na região periférica das espermatídes marcações metacromáticas indicativas de RNPs (Figura 5f).

No presente estudo os resultados obtidos com base na análise da espermatogênese da espécie *Triatoma melanosoma* possibilitou o melhor entendimento dos seguintes aspectos: comportamento cinético durante a meiose em cromossomos holocêntricos; constatação da fragmentação nucleolar no início do diplóteno; associação de três autossomos e do heterocromossomo Y ao nucléolo; localização de banda-C heterocromática nas regiões teloméricas em três autossomos e no cromossomo sexual Y, sendo esse o maior heterocromossomo; localização de ribonucleoproteínas e reativação nucleolar na diferenciação celular de espermatídes a espermatozóides. Finalmente, a caracterização citogenética da espécie *T. melanosoma* sugere o mesmo padrão da estrutura cromossômica encontrado em outras espécies do gênero *Triatoma*.

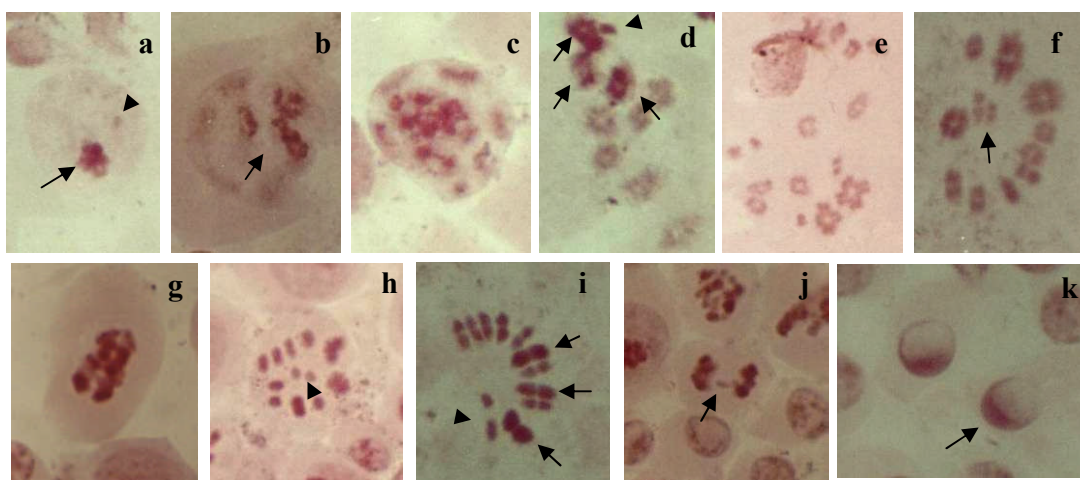


Figura 1. Túbulo testicular de *Triatoma melanosoma* submetido à técnica de orceína lacto-acética. (a) Espermatócito com duas marcações heteropicnóticas. (b-d) Células em estágio difuso com cromossomos heteropicnóticos (seta). (e) Diplóteno. (f) Metáfase I com cromossomos sexuais ao centro (seta). (g) Anáfase I. (h-i) Metáfase II com sexuais comportando-se ou não como pseudobivalentes (pontas de setas) e heteropicnose de autossomos (setas). (j) Anáfase II, notar a migração tardia de cromossomos (seta). (k) Espermatídes com corpúsculos no início da espermiogênese (seta). Aumentos: j = 1250x; a, b, c, d, e, f, g, h, i, k = 3200x.

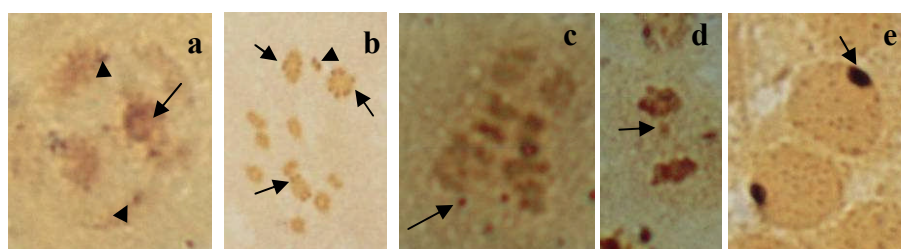


Figura 2. Túbulo testicular de *Triatoma melanosoma* submetido à técnica de impregnação por íons prata. (a) Estágio difuso inicial com marcação nucleolar (seta) e Regiões Organizadoras Nucleolares (ponta de seta). (b) Diacinese com marcação de Regiões Organizadoras Nucleolares em autossomos (setas) e no cromossomo sexual (ponta de seta). (c) Anáfase I com fragmentos nucleolares (setas). (d) Anáfase com migração de cromossomos tardia (seta). (e) Espermatíde com corpúsculo nucleolar (setas). Aumentos: b = 1250x; a, c, d, e = 3200x.

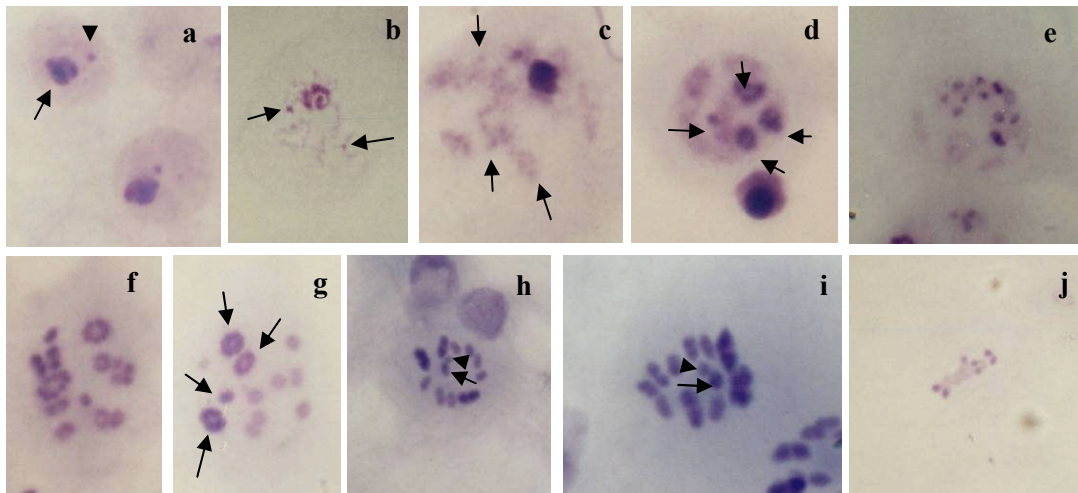


Figura 3. Túbulos testiculares de *Triatoma melanosome* submetidos à técnica de Bandamento-C. (a) Espermatócito com dois cromocentros: autossômico (seta) e sexual (ponta de seta). (b) Estágio difuso inicial com heterocromatina em autossomos não pertencentes aos cromocentros (setas). (c) Estágio difuso com marcação de heterocromatina telomérica em autossomos não pertencentes ao cromocentro (setas). (d-e) Estágio difuso com individualização dos cromossomos pertencentes ao cromocentro (setas). (f) Diplóteno. (g)Diacinese com três autossomos e o heterocromossomo Y apresentando heterocromatina (setas).(h-i) Metáfase II, observar o heterocromossomo Y (seta) maior que o X (ponta de seta). (j) Metáfase II lateral. Aumento: 1250x.

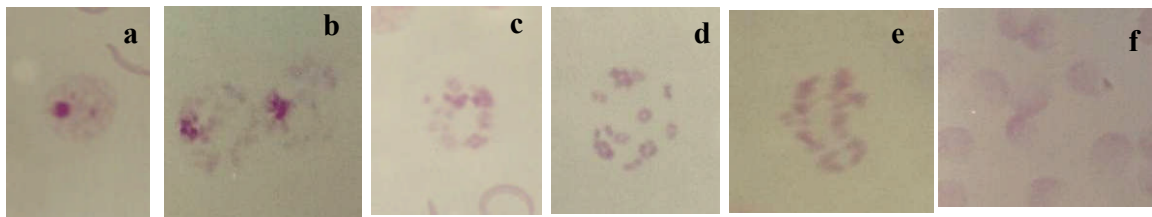


Figura 4. Túbulos testiculares de *Triatoma melanosome* submetidos à reação de Feulgen. (a) Espermatócito com dois cromocentros (setas). (b) Núcleos em prófase I (estágio difuso inicial). (c-d) Estágio difuso apresentando marcações negativas (setas). (e) Anáfase I. (f) Espermatídes com marcações mediano-posterior (setas). Aumento = 1250x.

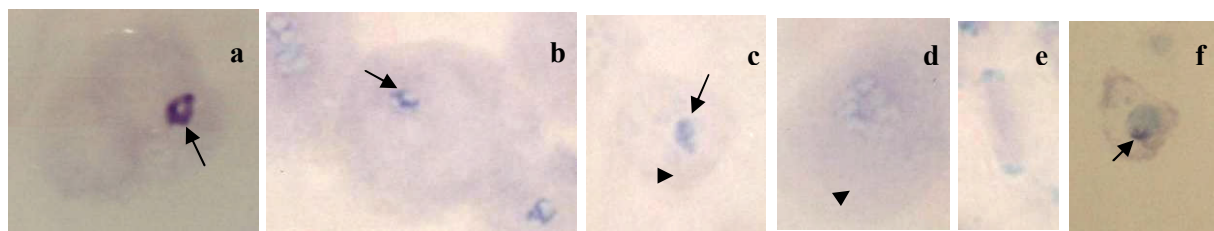


Figura 5. Túbulos testiculares de *Triatoma melanosome* submetidos à técnica de controle de variante da Concentração Crítica Eletrolítica – CEC (a) e variante de CEC (b-e). (a) Espermatócito com cromocentro (seta). (b) Espermatócito apresentando regiões com RNAs adjacentes ao cromocentro (seta). (c) Estágio difuso inicial com regiões de RNAs próximos ao cromocentro (setas) e na porção citoplasmática (ponta de seta). (d) Metáfase I com marcações de RNPs somente no citoplasma (ponta de seta). (e) Telófase II. (f) Espermatíde com marcação de RNAs anterior (seta). Aumentos = 1250x.

Bibliografia

BICUDO, H.,E.,M.,C. Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos nos eucariotos, *Ciência e Cultura*, v., 37, nº 3, p. 430-439, 1985.

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

GALVÃO, C., CARCAVALHO, R., ROCHA, D. DA SILVA, JUNBERG, J. A checklist the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*,

GUZMÁN-BRACHO C. Epidemiology of Chagas disease in México: an update. *Trends in Parasitology*, v. 17, n.8, p. 372-376, 2001.

MELLO, M.L.S., & VIDAL, B.C. A reação de Feulgen, *Ciência e Cultura*, v. 30, nº 6, p. 665-676, 1977.

MELLO, M.L.S. Heterocromatina, *Ciência e Cultura*, v. 30, n. 3, p. 290-303, 1978.

PANZERA, F., ALVAREZ, F., SANCHES-RUFAS, J., PÉREZ, R., SUJA, J.A., SCVORTZOFF, E., DUJARDIN, J.P., ESTRAMIL, E., SALVATELLA, R. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae), *Genome*, v. 25, nº 6, 1993

PANZERA, F., PÉREZ, R., HORMOS, S., PANZERA, Y., CESTAU, R., DELGADO, V., NICOLINI, P. Chromosome Numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 4, p 515-518, 1996.

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

PÉREZ, R., RUFAS, J.S., SUJA, J.A., PAGE., PANZERA, F. Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosome in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research*, v. 8 p. 17-20, 2000.

TARTAROTTI, E. Estudo Citogenético em Triatomíneos do gênero *Panstrongylus*. São José do Rio Preto: IBILCE. UNESP, 1998, p.189. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas)-IBILCE. UNESP.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia*, v. 52, n. 3-4, p. 177-184, 1999.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V., CERON, C.R. Problemática vetorial da Doença de Chagas. *Arq Ciênc Saúde*, v.11, n.1, p. 44-47, 2004.

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

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

WOLF, K.W. The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects, *Inst. J. Insect Morphol. & Embryol*, v. 25, n. 1/2, p. 37-62, 1996.