



Análise das possíveis Regiões Organizadoras Nucleolares e da atividade nucleolar em *Triatoma melanocephala* e *T. lenti*, importantes vetores da doença de Chagas

Kaio Cesar Chaboli Alevi^{1*}; Priscila Pasqüetto Mendonça¹; Nathália Paiva Pereira¹; João Aristeu da Rosa²; Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP/FCFar, Araraquara, SP, Brasil.

RESUMO

Triatoma melanocephala e *T. lenti* são espécies crípticas de triatomíneos pertencentes ao subcomplexo Brasiliensis. Esses organismos foram agrupados no subcomplexo apenas por caracteres morfológicos e pela disposição geográfica. Sendo assim, estudos citogenéticos são considerados como importantes ferramentas na classificação dos triatomíneos e, com isso, podem auxiliar na criação de um plano de profilaxia da doença. Por meio da técnica citogenética de impregnação por íons prata, foi possível visualizar a atividade nucleolar e as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) desses insetos. *T. melanocephala* apresentou três RONs ativas nos autossomos durante a prófase I. *T. lenti* apresentou duas RONs ativas nos autossomos durante a prófase I e a metáfase I. Ambas as espécies apresentaram o fenômeno de persistência do material nucleolar encontrado em triatomíneos. Sendo assim, por meio da análise das RONs, foi possível observar que *T. lenti*, quando comparado com os outros organismos do subcomplexo, apresentou marcações semelhantes à *T. tibiamaculata* e que *T. melanocephala* não apresenta nenhuma relação direta com o subcomplexo.

Palavras-chave: Citogenética. Taxonomia. Triatominae. Subcomplexo Brasiliensis.

INTRODUÇÃO

Os triatomíneos pertencem a Ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Lent & Wygodzinsky, 1979). Essa ordem é caracterizada por insetos com um par de asas anteriores do tipo hemiélitro, um par de asas posteriores membranosas

e um aparelho bucal do tipo picador-sugador (Schofield, 1994).

A subfamília Triatominae é composta por 145 espécies distribuídas em 18 gêneros e seis tribos (Alevi et al., 2013a). Todas as espécies de triatomíneos são suscetíveis à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) e, conseqüentemente, potenciais vetores da doença de Chagas. A infecção ocorre por meio da alimentação com sangue de mamífero infectado, sendo todos os estádios ninfais sujeitos a ingerirem o parasito, uma vez que, após a eclosão, a hematofagia é obrigatória em todas as fases de vida dos triatomíneos (Noireau et al., 2009).

A identificação específica e a sistemática dos triatomíneos têm se pautado fundamentalmente em observações morfológicas, principalmente por meio de microscopia de luz (Lent & Wygodzinsky, 1979) e de varredura (Rosa et al., 2000). Schofield & Galvão (2009) propuseram a classificação destes organismos em subcomplexos específicos. Contudo, para agrupar os insetos utilizaram apenas a disposição geográfica e os caracteres morfológicos.

Triatoma melanocephala é uma espécie rara encontrada principalmente nos estados da Bahia, Paraíba, Sergipe, Rio Grande do Norte e Pernambuco (Gurgel-Gonçalves et al., 2012). Embora tenha sido encontrado em áreas domiciliares, esse organismo é incapaz de nele colonizar, pois é considerado essencialmente silvestre. Esse triatomíneo habita principalmente regiões de Caatinga e, em seu ecótono natural, foi encontrado infectado pelo protozoário *T. cruzi*. Provavelmente, a espécie é um importante elo dos ciclos de transmissão silvestre e domiciliar, levando o protozoário dos marsupiais e ratos para o homem (Sherlock & Guitton, 1980).

T. lenti é uma espécie endêmica dos estados da Bahia, Goiás e Roraima (Gurgel-Gonçalves et al., 2012). Esse triatomíneo é considerado como um potencial vetor da doença de Chagas de importância secundária e, de acordo com Sherlock & Guitton (1974), foi encontrado infectado pelo protozoário *T. cruzi*.

Esses hemípteros pertencem ao grupo Infestans, complexo Infestans e subcomplexo Brasiliensis (Schofield

Autor correspondente: Kaio Cesar Chaboli Alevi - Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - Letras e Ciências Exatas - IBILCE - UNESP - e-mail: kaiochaboli@hotmail.com

& Galvão, 2009). Esse subcomplexo está presente na América do Sul e é composto por nove espécies: *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. melanocephala*, *T. petrochiae*, *T. lenti*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*.

Monteiro et al. (2001) relatam que os táxons do subcomplexo Brasiliensis são dificilmente esclarecidos apenas por parâmetros morfológicos, pois as espécies são crípticas. Assim, os estudos citogenéticos que abrangem estes organismos são considerados como importantes ferramentas para a diferenciação e sistemática destes insetos (Pérez et al., 1992; Panzera et al., 2000; Alevi et al., 2012a; Alevi et al., 2012b; Alevi et al., 2013b, Alevi et al. 2013c, Alevi et al., 2013d).

As Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) correspondem a alças do DNA contendo genes responsáveis pela transcrição do RNA ribossômico (RNAr), 18S, 5,8S e 28S, situados no nucléolo da célula que, durante a meiose, se organizam nos cromossomos, e quando ativas expressam as proteínas B23 e C23 que, por possuírem reatividade com a prata, são chamadas de AgNORs (Hsu et al., 1975).

Durante a divisão celular, as células cessam a transcrição de RNAr na prófase, ocorre fragmentação nucleolar e a maior parte das proteínas migram para o citoplasma, sendo que algumas permanecem associadas às RONs dos cromossomos. Apenas na anáfase a transcrição de RNAr é reativada e gradualmente ocorre reorganização do nucléolo (González-García & Rufas, 1995). Contudo, Tartarotti & Azeredo-Oliveira (1999) observaram que durante a meiose de triatomíneos ocorria persistência do material nucleolar, ou seja, resquícios desse material eram visualizados durante todas as fases da divisão meiótica.

A profilaxia da doença de Chagas pode ser otimizada quando associada a dados biológicos desses insetos, que informam sobre a distinção entre espécies silvestres de baixo risco e espécies domiciliares nocivas, hábitos e horários de hematofagia, capacidade reprodutiva, resistência a inseticidas, ciclo biológico, reservatórios domésticos e silvestres do agente etiológico. Bem como as inter-relações entre espécies e gêneros estudados no contexto evolutivo, por meio de ensaios citogenéticos que comparam padrões cromossômicos os quais podem ser aplicados à filogenia dos triatomíneos (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1996).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo analisar a atividade nucleolar e as possíveis RONs ativas durante a meiose desses importantes vetores da doença de Chagas no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

No estudo, foram utilizados dez indivíduos machos da espécie *T. melanocephala* e dez da espécie *T. lenti*, cedidos pelo “Insetário de Triatominae”, instalado no Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara. Os túbulos seminíferos dos machos adultos, depois de dilacerados e fixados na lâmina, foram submetidos à técnica citoquímica de impregnação por íons prata (Howell & Black, 1980). O material biológico foi analisado ao microscópio de luz Jenaval (Zeiss), acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de imagens Axio Vision LE 4.8 (Copyright

©2006-2009 Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH), com aumento de 1000 vezes.

RESULTADOS

T. melanocephala

Por meio da técnica citogenética de impregnação por íons prata foi possível observar a atividade nucleolar e estudar as RONs durante a espermatogênese de *T. melanocephala*. No núcleo poliploide (Figura 1I), célula da parede do túbulo seminífero responsável pela nutrição das células em divisão meiótica, foi possível a visualização de um corpúsculo impregnado com os íons prata (seta). A análise da célula interfásica (Figura 1II) possibilitou a visualização de um nucléolo (seta). Foi possível observar a fragmentação nucleolar durante a prófase I (Figura 1III-VI, setas) que persistiu durante a metáfase (Figura 1VII), onde foi possível encontrar resquícios do material nucleolar (seta). Durante a prófase I, também foi visível três RONs ativas nos autossomos (ponta de seta). No final da anáfase, mais próximo ao início da telófase, foi possível visualizar a reativação nucleolar (Figura 1VIII). A espermatíde inicial permitiu a visualização do nucléolo reativado (Figura 1IX).

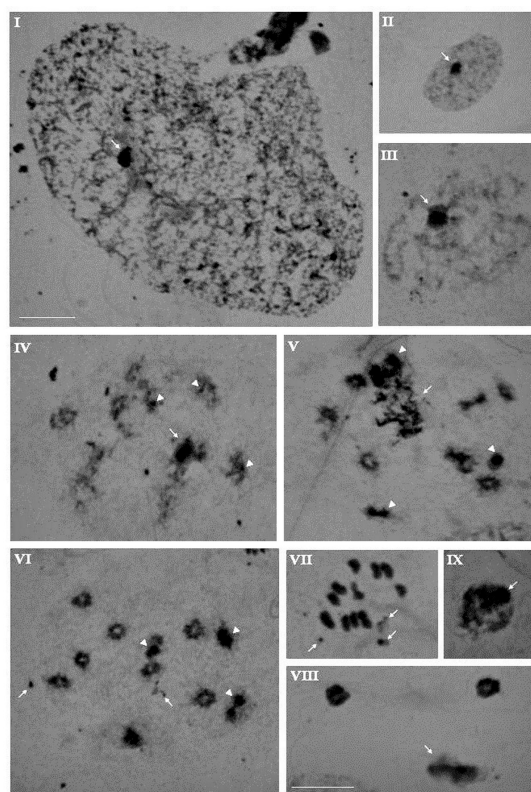


Figura 1: Espermatogênese de *Triatoma melanocephala* corada com a técnica citogenética de impregnação por íons prata. I: Núcleo poliploide com apenas uma marcação nucleolar (seta). II: Núcleo interfásico. Notar a presença do nucléolo (seta). III-VI: Prófase I. Notar a fragmentação nucleolar (setas) e as RONs (pontas de seta). VII: Metáfase I. Notar a persistência nucleolar (setas). VIII: Começo de Telófase. Note a reativação nucleolar (seta). IX: Espermatíde inicial com o nucléolo reativado. Bar: 10 um.

T. lenti

Por meio da técnica citogenética de impregnação por íons prata foi possível observar a atividade nucleolar e estudar as RONS durante a espermatogênese de *T. lenti*. No núcleo poliploide (Figura 2I), foi possível visualizar muitos corpúsculos impregnados pelos íons prata. A análise da célula interfásica (Figura 2II) possibilitou a visualização de dois nucléolos (ponta de seta). Durante a prófase I, foi

possível observar a fragmentação nucleolar (Figura 2III-V, ponta de seta) que persistiu durante a metáfase (Figura 1VI, VII). Tanto na prófase I (Figura 2IV), como na metáfase I (Figura 2VI), foi possível observar duas RONS ativas nos autossomos (setas). A metáfase em visão lateral permitiu observar apenas uma RON ativa (Figura 2VII, seta). Na espermátide inicial (Figura 2VIII) foi possível visualizar o nucléolo reativado.

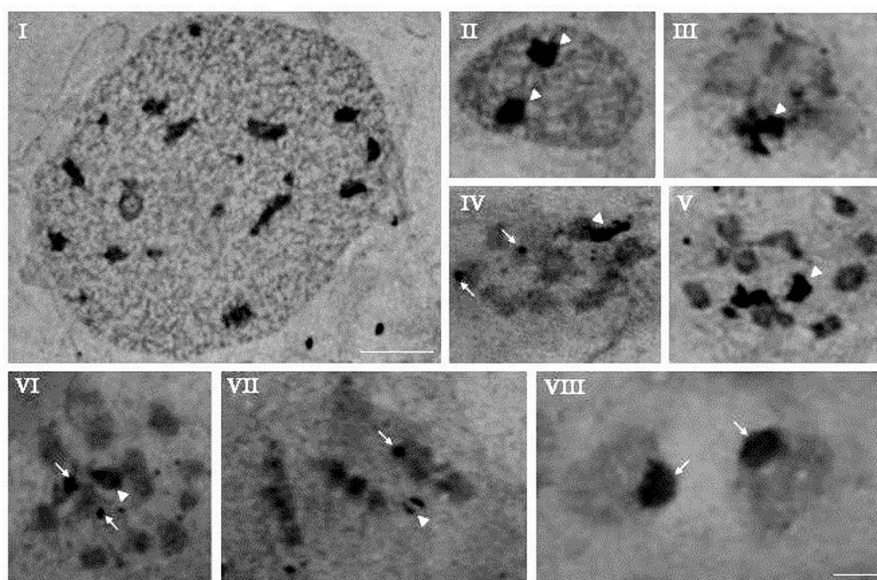


Figura 2: Espermatogênese de *Triatoma lenti* corada com a técnica citogenética de impregnação por íons prata. I: Núcleo poliploide. Notar vários corpúsculos impregnados com AgNOR. II: Núcleo interfásico. Notar a presença de dois nucléolos (pontas de seta). III-V: Prófase I. Notar a fragmentação nucleolar (setas) e as RONS (pontas de seta). VI Metáfase I em visão polar. Notar as RONS (setas) e a persistência do material nucleolar (ponta de seta). VII: Metáfase em visão lateral. Notar uma RON (seta) e a persistência do material nucleolar (pontas de seta). VIII: Espermátides iniciais com o nucleolo reativado (setas). Bar: 10 um.

DISCUSSÃO

Acredita-se que a persistência do material nucleolar é muito importante para a espermiogênese, pois esta fase consiste na diferenciação morfológica das espermátides em espermatozoides, e não há nenhuma atividade transcricional de RNAr (Olivieri & Olivieri, 1965).

A ideia de ausência de síntese nucleolar durante a espermiogênese foi proposta inicialmente por Olivieri & Olivieri (1965), por meio de técnicas autorradiografia. Nesse trabalho não foi relatada nenhuma atividade transcricional de RNAr durante a espermiogênese, que foi corroborada por Rickards et al. (2007), após descobrirem que durante essa fase da espermatogênese há baixa atividade da nucleolina, proteína que desempenha importante papel na transcrição de RNAr. Todas as proteínas necessárias para a espermiogênese são produzidas a partir de RNAm transcritos durante a meiose e armazenados no citoplasma (Schäfer et al., 1995). Dessa forma, a persistência nucleolar observada nos triatomíneos é um evento muito importante, pois esse material em conjunto com as RONS são os principais fatores transcricionais que permitem que a espermiogênese ocorra.

A análise dos núcleos poliploides e das células interfásicas de *T. melanocephala* possibilita ressaltar que

essas células não apresentam alta atividade sintética, pois ambas apresentam um pequeno corpúsculo nucleolar. No entanto, o núcleo poliploide de *T. lenti* apresentou grandes marcações pelos íons pratas que, em conjunto com os dois nucléolos encontrados na célula interfásica, permitem ressaltar que essa espécie apresenta alta atividade sintética. O tamanho e o número de nucléolos e corpos pré-nucleolares dependem das características funcionais das células e pode refletir, então, em diferenças metabólicas e funcionais (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997).

Apesar do conhecimento sobre a importância das RONS na formação do nucléolo durante a interfase e, principalmente, na biogênese dos ribossomos, esses estudos são pouco abordados nos triatomíneos. A quantidade de RONS nos núcleos refletem o nível de transcrição de DNAr e, com isso, quantifica a síntese proteica nos organismos. Esses dados também podem auxiliar no estudo evolutivo das espécies, pois as RONS são fatores atuantes na evolução dos organismos.

A espécie *T. melanocephala* apresentou três RONS ativas em três pares de autossomos durante a divisão meiótica, mais especificamente no final da prófase I. Em *T. lenti* foram observadas duas RONS ativas na prófase I e na metáfase I. O estudo das RONS permite o estabelecimento de graus de parentesco e um possível estabelecimento da

filogenia, quando o número e sua localização (autossomos ou sexuais) são comparados.

A análise da metáfase de *T. lenti* em visão lateral permitiu a observação de apenas uma RON. Isso ressalta a importância da análise das células metafásicas também em visão polar nos estudos citogenéticos, uma vez que, em visão lateral pode ocorrer sobreposição do material cromossômico e, com isso, marcações importantes deixam de ser observadas.

Entre as nove espécies que compõem o subcomplexo *Brasiliensis*, em apenas três foram descritos os números de RONS, a saber, *T. brasiliensis*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*. Bardella et al. (2010) relataram que *T. brasiliensis* apresenta RONS ativas em um par de autossomos. Segundo Severi-Aguiar et al. (2005), *T. tibiamaculata* apresenta marcações AgNORs em apenas dois autossomos, assim como foi observado em *T. lenti*. Já a espécie *T. vitticeps* não apresenta marcações nos autossomos, mais sim em dois cromossomos sexuais (X_1X_2) (Severi-Aguiar et al., 2006). Contudo, a técnica de impregnação por íons prata só marca as RONS que foram ativadas na interfase anterior, seria necessário o emprego da técnica citogenética molecular de FISH em *T. melanocephala* e *T. lenti* para que análises comparativas mais específicas fossem realizadas.

Assim, o presente trabalho possibilitou descrever o comportamento nucleolar de *T. melanocephala* e *T. lenti* e, assim, corroborar a hipótese de que os triatomíneos apresentam persistência do material nucleolar durante a meiose. Além disso, por meio do estudo das RONS ativas durante a espermatogênese, foi possível observar similaridade no número e na localização entre *T. lenti* e *T. tibiamaculata* e, ainda, relatar que *T. melanocephala* não apresentou nenhum grau de similaridade com os organismos do subcomplexo *Brasiliensis*. Dessa forma ressaltamos a importância das análises citogenéticas como uma ferramenta no estudo de espécies crípticas, bem como no entendimento da biologia e evolução desses insetos, importantes vetores da doença de Chagas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, ao Conselho Nacional de Pesquisa e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

ABSTRACT

Analysis of nucleolus organizer regions and nucleolar activity in important vectors of Chagas disease (Triatoma melanocephala and T. lenti)

Triatoma melanocephala* and *T. lenti* are important vectors of Chagas disease. These cryptic species of triatomines are grouped in the subcomplex *brasiliensis* due only to morphological characters and geographical distribution. Cytogenetic studies are important to the classification of insects and can assist in creating a disease prevention plan. The aim of the present study was to determine nucleolar activity and nucleolus organizer regions (NORs) in these insects using the cytogenetic method of silver ion impregnation. *T.

***melanocephala* exhibited three active NORs in autosomes during prophase I. *T. lenti* exhibited two active NORs in autosomes during prophase I and metaphase I. Both species exhibit the persistent nucleolar material found in triatomines. The analysis of NORs in the present study revealed that *T. lenti* exhibited labeling similar to that found in *T. tibiamaculata*, which belongs to the subcomplex, whereas *T. melanocephala* shows no direct relationship with the subcomplex.**

Keywords: Cytogenetics. Taxonomy. Triatominae. *Brasiliensis* subcomplex.

REFERÊNCIAS

Alevi KCC, da Rosa JA, de Azeredo Oliveira MTV. Mini Review: Karyotypic Survey in Triatominae Subfamily (Hemiptera, Heteroptera). Entomol Ornithol Herpetol. 2013a;2:106. DOI: 10.4172/2161-0983.1000106.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Fernandes ALVZ, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Analysis of spermiogenesis like a tool in the study of the triatomines of the *Brasiliensis* subcomplex. C R Biologies. 2013b;336:46-50.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Guerra AL, Facina CH, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. 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. 2013c;13:301-303.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Karyotype and spermatogenesis in *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the *Brasiliensis* subcomplex? Infect Gen Evol. 2012a;12:1652-1653.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Heteropyknotic filament in spermatids of *Triatoma melanocephala* and *T. vitticeps* (Hemiptera, Triatominae). Inv Rep Dev. 2013d; DOI: 10.1080/07924259.2013.793623.

Alevi KCC, Mendonça PP, Succi M, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV. Karyotype of *Triatoma lenti* (Hemiptera: Triatominae), a potential Chagas vector. Gen Mol Res. 2012b;11:4278-4284.

Bardella VB, Gaeta ML, Vanzela ALL, Azeredo-Oliveira MTV. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). Comp Cytogenetics. 2010;4(2):141-9.

González-García JM, Rufas JS. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. Chromosoma. 1995;104(4):287-97.

Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. J Trop Med. 2012;15. DOI:10.1155/2012/705326.

- Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980;36(8):1014-15.
- Hsu TC, Spirito SE, Pardue ML. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*. 1975;53(1):25-36.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1979;163:123-520.
- Monteiro FA, Escalante AA, Beard CB. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends Parasitol*. 2001; 17(7):344-7.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res*. 2009;40(2):26. DOI: 10.1051/vetres/2009009
- Olivieri G, Olivieri A. Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*. 1965;2(4):366-80..
- Panzer F, Pérez R, Nicolini P, Hornos P, Costa J, Borges E, Diotaiuti L, Scholfield J. Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). *Cad Saúde Pública*. 2000;16:83-88.
- Pérez R, Panzer F, Scafiezzo S, Mazzella MC, Panzer F, Dujardin JP, Scvortzoff E. Cytogenetics as a tool for Triatominae species distinction (Hemiptera-Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:353-61.
- Rickards B, Flint SJ, Cole MD, Leroy G. Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription *in vivo*. *Mol Cell Biol*. 2007;27(3):937-48.
- Rosa JA, Barata JMS, Santos JLF, Cilense M. Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Saúde Pública*. 2000;34(5):538-42.
- Schäfer M, Nayernia K, Engel W, Schäfer U. Translational control in spermatogenesis. *Developmental Biology*. 1995;172(2):344-52.
- Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop*. 2009;110(2-3):88-100.
- Schofield CJ. *Triatominae*. Biology and Control. London: Eurocommunica Publications; 1994.
- Severi-Aguiar GD, Lourenço LB, Bicudo HE, Azeredo-Oliveira MT. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetica*. 2006;126(1-2):141-51.
- Severi-Aguiar GDC, Azeredo-Oliveira MTV. Localization of rDNA sites in holocentric chromosomes of three species of triatomines (Heteroptera, Triatominae). *Genet Mol Res*. 2005;4(4):704-9.
- Sherlock IA, Guitton N. Fauna Triatominae do estado da Bahia, Brasil: IV *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1980;75:23-31.
- Sherlock IA, Guitton N. Fauna Triatominae do estado da Bahia, Brasil: II notas sobre ecótopos silvestres e o gênero *Psammolestes*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1974;72(1-2):91-101.
- Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MTV. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia*. 1999;52(3-4):177-84.
- Tavares MG, Azeredo-Oliveira MTV. Aspectos biológicos e Médicos Sanitários dos Triatomíneos. *HB Científica*. 1996;3(2):137-44.
- Tavares MG; Azeredo-Oliveira MTV. Cytogenetics study on holocentric chromosomes of five species of triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Cytobios*. 1997;89:51-61.

Recebido em 17 de julho 2012

Aceito para publicação em 21 de novembro de 2012

