

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Patricia Pasquali Parise

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE DUAS ESPÉCIES DE
DÍPTEROS DE INTERESSE MÉDICO-VETERINÁRIO:
Haematobia irritans e *Muscina stabulans*
(DIPTERA, MUSCIDAE)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Patricia Pasquali
Parise
e aprovada pela Comissão Julgadora.

102
102
94

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia, da Universidade de
Campinas, para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas,
área de Biologia Celular.

Rita Maria Pereira Avancini

Orientadora
Profa. Dra. Rita Maria Pereira Avancini

Campinas, 1994

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICATÓRIA

“A alegria da conscientização de um ideal supera o cansaço da luta, do temor e das incertezas passadas. Nada é mais gratificante do que viver hoje a certeza da conquista e o começo de um futuro melhor.”

Dedico aos meus pais,
Mário e Luzia,
aos meus irmãos,
Alexandre e Gustavo,
e ao Marcus .

AGRADECIMENTOS

À Profa. Rita Maria Pereira Avancini, pela orientação, críticas, apoio e amizade.

À Profa. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pelas valiosas contribuições, pelo incentivo e apoio indispensáveis à realização deste trabalho, além da amizade, paciência e atenção sempre concedidas.

À Profa. Doralice Maria Cella e Prof. Angelo Pires do Prado, pelas sugestões feitas durante a realização deste trabalho, assim como na análise prévia da tese.

À Profa. Christine Hackel, pelas discussões e sugestões feitas na análise deste trabalho.

Aos secretários do Departamento, Cidinha, Liliam e Sidney, pela simpatia, carinho, atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular.

À Klélia pela eficiente ajuda nas coletas, preparo de soluções e pela grande amizade que criamos.

Aos companheiros de laboratório: Odair, Luciana, Klélia, Lucianne, Fernando, Maurício, Rogério e Guido pelos divertidos dias de trabalho.

Às amigas da república: Dani, Lu e Silvy pelo apoio, incentivo e pelas nossas muitas horas de alegria.

Aos amigos da pós graduação: Jeannie, Silvy, Tatiana, Luis, Lino, Ana Lúcia, Cristiana, Cristiane, Lucianne, Guido, José Ricardo, Luciana, Daniela, Fernando, Selma, Paula, Arnaldo, Alexandre, Maurício, Marcelo e Flavia.

À todos os professores do IBILCE-UNESP, em especial ao Prof. Sebastião R. Taboga, que abriu meus horizontes para o mundo científico.

À Profa. Maria Luiza S. Mello, pelos ensinamentos e ajuda especial no trabalho de CEC.

Ao Prof. Hernandez Faustino de Carvalho pelas horas de muita paciência no microscópio de fluorescência.

Ao departamento de Parasitologia pelo fornecimento das larvas.

Ao departamento de Histologia na pessoa da Profa. Iara M. S. de Luca por ter me concedido o uso do fotomicroscópio.

À Cristiana Begnani e Paulo Inácio, pela grande ajuda nas análises estatísticas e pela simpatia com sempre me trataram.

Ao Marcelo Turini (Tchelo) pela amizade e incentivo e pela ajuda na obtenção da aparência maravilhosa desta tese.

Ao Marcus pelo companheirismo, paciência, ajuda no computador, apoio em todas as etapas deste trabalho e pelo grande amor que existe.

Aos amigos de graduação e de IBILCE com quem passei uma das melhores épocas da vida: Glau, Dani, Dri, Ciro, Marcelinho, Márcio, Raquel, Taninha, Renatão, Marcela, Irlei, Gisela, Silvy, Rô, Marcão e Pinda.

Ao Marcelo D. L. Rossato, pela ajuda na impressão à laser.

Ao CNPQ e FAEP, pelo apoio financeiro fornecido durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	1
1. Nucléolo e região organizadora do nucléolo	2
1.1. Estrutura, composição e função	2
1.2. Métodos para coloração seletiva de NORs	7
1.2.1. No núcleo interfásico	7
1.2.2. No cromossomo metafásico	9
2. Heterocromatina	11
2.1. Heterocromatina constitutiva	12
2.2. Banda C	19
3. Concentração Crítica de Eletrólitos	21
4. As espécies do estudo	22
4.1. Os cromossomos de <i>M. stabulans</i> e <i>H. irritans</i>	25
5. Objetivos	26
MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Material	28
1.1. Obtenção e procedência	28
1.1.1. <i>Muscina stabulans</i>	28
1.1.2. <i>Haematobia irritans</i>	28
2. Métodos	29
2.1. Preparações citológicas	29
2.1.1. Ovos	29
2.1.2. Larvas	30

2.1.3. Adultos	31
2.1.4. Coloração por orceína lacto-acético	31
2.1.5. Impregnação pelo íon prata	31
2.1.6. Banda C	32
2.1.7. CEC para evidenciação de RNA	33
2.2. Montagem	33
2.3. Fotografias	34
2.4. Cariótipo	34
RESULTADOS	
1. Cariótipo de <i>M. stabulans</i>	36
2. Cariótipo de <i>H. irritans</i>	40
3. NOR	43
4. Banda C	47
5. Núcleos interfásicos	50
6. Áreas AgNOR positivas e ribonucleoprotéicas em células politênicas de <i>M. stabulans</i>	55
DISCUSSÃO	
1. Cariótipo	59
2. NOR	63
3. Banda C	68
4. Núcleos interfásicos	72
5. CEC	75
CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

RESUMO

Muscina stabulans e *Haematobia irritans* são dípteros considerados exceções dentro da família Muscidae por apresentar um conjunto haplóide com cinco pares de cromossomos, enquanto a regra nesta família é $2n=12$, sendo um par sexual. Em nosso estudo tivemos como objetivos a descrição do cariótipo de *M. stabulans* e o reestudo do cariótipo de *H. irritans*, a localização física de NORs e de regiões de heterocromatina constitutiva em cromossomos mitóticos e meióticos nas duas espécies. Foi também estudado o comportamento do nucléolo em núcleos interfásicos de diferentes tecidos. O cariótipo de *M. stabulans* foi caracterizado a partir do resultado de medidas feitas em cromossomos de gânglio cerebral de larvas em estágio L3. Os pares I, II, III e V são metacêntricos e o par IV, submetacêntrico. Foram observadas duas constrictões secundárias no braço longo do cromossomo I e uma no braço curto do cromossomo II. As características cariotípicas de *H. irritans* foram obtidas de metáfases provenientes de células de gânglio cerebral de larvas L3. Os pares I, II e V são metacêntricos e os demais, submetacêntricos. Para o estudo das regiões organizadoras nucleolares foi utilizada a técnica de impregnação pelo íon prata para marcação de NORs. Obteve-se como resultado, quase sempre, uma grande inespecificidade do método para cromossomos mitóticos de ambas as espécies, pois foram observadas marcações centroméricas, teloméricas e algumas vezes, intercalares. Já para cromossomos meióticos, o método mostrou-se mais específico sendo possível a detecção de uma nítida marcação intercalar no cromossomo III de *H. irritans*. Através do método de bandamento C foi possível localizar as regiões de heterocromatina constitutiva. Nos preparados de gânglio cerebral de *M. stabulans* foram observadas marcações centroméricas em todos os

cromossomos e uma forte marcação no braço curto do cromossomo II, que parece estar relacionada com a região de constrição secundária. Nos cromossomos de *H. irritans* não foi possível observar marcações centroméricas; apenas foi detectada uma marcação intercalar no par II. Foram observados núcleos interfásicos com um ou dois nucléolos em células de gânglio cerebral, testículo e de tecido embrionário. Os nucléolos de núcleos interfásicos de testículos de *M. stabulans* são múltiplos ou únicos, podendo ser resultado de fragmentação ou associação ao longo do desenvolvimento celular. Todos os resultados foram discutidos com os existentes na literatura para dípteros e outros insetos. A análise do padrão de banda C e de NORs nos cromossomos mitóticos e meióticos das duas espécies estudadas, ao lado do número e morfologia cromossômicos contribuem com dados para os estudos citotaxonômicos do grupo e para o entendimento da diminuição do número de cromossomos de 12 para 10 em certas espécies.

ABSTRACT

The flies *Muscina stabulans* and *Haematobia irritans* are exceptions among Muscidae since both present one less pair of chromosomes and thus do not follow the rule $2n=12$. The objectives of this study were: describing the karyotype of *M. stabulans*, re-analyzing the karyotype of *H. irritans* and locating NORs and constitutive heterochromatic regions in mitotic and meiotic chromosomes of both species. The nucleolus was also examined by comparing its number and morphology in different tissues. To characterize the *M. stabulans* karyotype, chromosomes from L3 larval brain preparations were measured. Pairs I, II, III e V are metacentric and pair IV is submetacentric. The long arm of chromosome I presents two secondary constrictions and the short arm of chromosome II presents one constriction. The description of the karyotype of *H. irritans* was performed using the same methods. Chromosomes I, II and V are metacentric and the other two are submetacentric. The nucleolar organizer regions were studied through silver staining. As a result, the method has very often shown to be unspecific for mitotic chromosomes in both species, since detection of centromeric, telomeric and sometimes interstitial was possible. As for meiotic chromosomes, the method was more specific, allowing clear detection of one dense black dot in chromosome III of *H. irritans*. C-banding allowed the identification of constitutive heterochromatin regions. In *M. stabulans* brain preparations the centromeric regions of all chromosomes and one region of the short arm of the chromosome II, which seems to be related to the secondary constriction, were all C-band positive. In *H. irritans* chromosomes, however, centromeric regions could not be distinguished as C-band positive. Only one intercalary band was seen in pair II. Cells possessing one or two nucleoli were observed in testes, brain and embryonic tissues. Nucleoli in testes of *M. stabulans* are seen either as multiple or single units, which could be the results of

either fission or aggregation throughout the development of these cells. The results obtained were compared to those available for Diptera and other insects. The C-band and NOR patterns obtained for both mitotic and meiotic chromosomes of the two flies as well as the number and morphology of their chromosomes contribute to the cytotaxonomic studies of Muscidae and add up to data that can help to understand the reduction of chromosomes from 12 to 10 in certain species.

INTRODUÇÃO

1. NUCLÉOLO E REGIÃO ORGANIZADORA DO NUCLÉOLO

1.1. Estrutura, composição e função

Regiões organizadoras nucleolares (NORs) são sítios cromossomais de genes que codificam RNAs ribossomais, os quais são sintetizados e processados em pré-ribossomos no nucléolo, e que posteriormente tornam-se parte do ribossomo maduro no citoplasma. Nos últimos anos, extensivos estudos foram realizados a respeito da estrutura e função dos organizadores nucleolares, bem como sobre o nucléolo (SMETANA & BUSCH, 1974; GHOSH, 1976; SCHWARZACHER & WACHTLER, 1983; SUMNER, 1990; Revisão SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993).

Os nucléolos são, portanto, os sítios de biogênese de ribossomos, fornecendo a rede estrutural na qual são controlados a síntese, o processamento e o transporte de moléculas precursoras do rRNA (pré-rRNA), assim como sua associação com proteínas ribossomais. Assim, o nucléolo pode ser considerado como sendo um local onde ocorre uma associação de eventos transcricionais e pós-transcricionais, promovendo a ordem específica requerida para coordenar as interações dos múltiplos componentes envolvidos na produção dos ribossomos (Revisão FISCHER *et al.*, 1991).

O nucléolo consiste de componentes estruturais distinguíveis pelas diferenças nas propriedades de coloração e características estruturais. Desta forma, pode-se observar três elementos nucleolares: o centro fibrilar, o componente fibrilar denso, que usualmente circunda o primeiro e o componente granular. Juntos estes elementos constituem o nucléolo em células metabolicamente ativas (GOESSENS, 1984).

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de definir a localização exata dos genes de rRNA transcricionalmente ativos no nucléolo. A utilização de diversos métodos, como microscopia eletrônica, autorradiografia, hibridização "in situ" (THIRY & GOESSENS, 1992) e outros não isotópicos (DUNDR & RASKA, 1993), têm fornecido resultados contraditórios. Contudo, existem consideráveis evidências de que os genes de rRNA estão presentes nos centros fibrilares e em alguns conjuntos de cromatina condensada nos nucléolos de mamíferos (THIRY & GOESSENS, 1992).

Alguns autores têm afirmado, com base em experimentos realizados com diferentes tipos celulares, que o rDNA nunca é encontrado no componente fibrilar denso e está restrito exclusivamente ao centro fibrilar, sendo, neste caso, encontrado apenas na periferia (THIRY & THIRY-BLAISE, 1989; 1991; THIRY *et al.*, 1991; PUVION-DUTILLEUL *et al.*, 1991). No entanto, SCHWARZACHER e WACHTLER (1993) demonstraram que parte dos sinais observados por hibridização *in situ* podem estar localizados também em estruturas nucleolares que correspondem ao componente fibrilar denso. Entretanto, THIRY e GOESSENS (1992) consideram que se rDNA é encontrado, através de sinais de hibridização *in situ*, fora do centro fibrilar, então deve pertencer à cromatina condensada que está penetrando no nucléolo, que pode ser confundida com regiões do componente fibrilar denso.

A transcrição e o processamento do rRNA, a associação e o transporte de partículas pré-ribossomais são eventos mediados por proteínas nucleolares específicas. Dentre elas estão a RNA polimerase, a topoisomerase, a fibrilarina, a nucleolina, a ribogranulina, a B23 e as proteínas Ag-NOR. As proteínas fibrilarina e nucleolina podem ser encontradas não somente em conexão com o rDNA transcrito,

mas também com o não transcrito, ou mesmo separado das NORs (Revisão SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993).

Muitas das proteínas mais abundantes de uma célula diferenciada, tais como hemoglobina nas células vermelhas do sangue e mioglobina em células musculares, são sintetizadas a partir de genes que estão presentes em cópia única no genoma haplóide. Estas proteínas são abundantes porque cada uma das muitas moléculas de mRNA transcritos por um gene, podem ser traduzidas em mais que 10 moléculas de proteínas por minuto. Isto normalmente produzirá mais que 10.000 moléculas de proteínas por molécula de mRNA em cada geração celular (ALBERTS *et al.*, 1994). Este tipo de amplificação não é utilizado para a síntese dos RNAs componentes dos ribossomos, visto que tais moléculas serão o produto final do gene. Células de eucariotos superiores em crescimento sintetizam 10 milhões de cópias de cada tipo de molécula de RNA ribossomal, em cada geração celular, a fim de construir seus 10 milhões de ribossomos. Essa quantidade adequada de rRNA pode ser produzida porque suas células contêm múltiplas cópias de genes que codificam os rRNAs, constituindo assim uma família multigênica (ALBERTS *et al.*, 1994).

Células humanas contêm aproximadamente 200 cópias de genes de rRNA por genoma haplóide, que se distribuem em pequenos grupos por 5 cromossomos diferentes, enquanto células de *Xenopus*, por exemplo, contêm aproximadamente 600 cópias de genes rRNA por genoma haplóide em um único grupo em um único cromossomo. Cada uma dessas regiões organizadoras corresponde a um grupo de genes de rRNA que são repetidos "in tandem".

Nestas múltiplas cópias de rRNA repetidas, cada gene (8 a 13 mil pares de nucleotídeos, dependendo do organismo) é separado do próximo por uma região não transcrita (NTS- "non transcribed spacer" ou mais recentemente denominado IGS-

"intergenic spacer"), anteriormente denominada de DNA espaçador, que pode variar em comprimento e conter elementos que regulam a transcrição de tais genes (REEDER, 1989; ALBERTS *et al.*, 1994). As regiões que são transcritas e que contêm as sequências que codificam os rRNAs 5,8S, 18S e 28S também contêm espaçadores que são descritos como internos (ITS- "Internal transcribed spacer") ou externos (ETS- "external transcribed spacer") dependendo de sua posição (Fig. 1). A estrutura do rDNA de *Drosophila melanogaster* representada na Figura 1, mostra uma extensão de espaçadores transcritos externos (ETS) precedendo a sequência que codifica o rRNA 18S, seguido pela região transcrita interna (ITS), que contém as sequências que codificam o rRNA 5,8S, e em seguida, a sequência que codifica o rRNA 28S. Este último RNA, em algumas espécies de insetos, consiste de dois fragmentos de tamanho semelhantes, que são mantidos unidos por pontes de hidrogênio. A "quebra" do RNA 28S deve-se ao fato de que o DNA que codifica este RNA é interrompido por uma curta sequência de aproximadamente 140pb que é removida do RNA 28S transcrito final. O espaçador não transcrito separa a sequência que codifica o RNA 28S de um gene de rRNA da sequência do gene de rRNA 18S adjacente (CAVE, 1982).

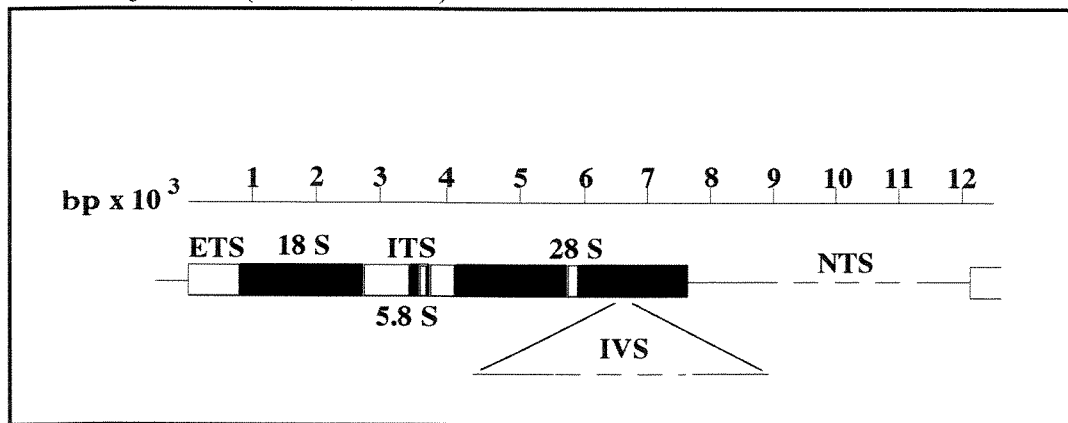


Figura 1- Mapa das unidades que se repetem dos genes rRNA de *Drosophila melanogaster* (LONG & DAWID, 1980).

As sequências que codificam o RNA 28S de algumas espécies de insetos podem ser interrompidas por sequências que não são representadas no RNA transcrito final. Estas sequências denominadas íntrons (IVS) são provavelmente transcritas, mas removidas do produto final (FEDEROFF, 1979).

O tamanho das regiões transcritas varia entre espécies, no que diz respeito aos espaçadores (LONG & DAWID, 1980). Os NTS também variam consideravelmente em tamanho entre diferentes organismos e até no mesmo animal (MILLER, 1981). A transcrição do rDNA é mediada pela RNA polimerase I, diferente da maioria dos outros genes que utilizam a RNA polimerase II para a transcrição (SOMMERVILLE, 1986). Outra característica interessante do rDNA é que este é frequentemente rico em bases G+C (ATTARDI & AMALDI, 1970).

Evidências para uma associação entre nucléolo e segmentos específicos de cromossomos foram obtidas há mais de 50 anos, tendo sido estabelecida por HEITZ (1931) que, trabalhando com *Vicia* sp, denominou as constrições secundárias, onde o nucléolo estava associado, de *regiões organizadoras do nucléolo ou zonas SAT* (Apud GOSALVEZ *et al.*, 1985). Na telófase, os nucléolos são formados em sítios específicos que aparecem em muitos organismos como constrições nos cromossomos (GHOSH, 1976; STAHL, 1982; SCHWARZACHER & WACHTLER, 1983; GOESSENS, 1984). Embora atualmente se saiba que nucléolos estão associados com a mesma região cromossomal, somente após vários anos de estudo se obteve a prova conclusiva, através da técnica de hibridização *in situ*, de que estas constrições geralmente eram sítios de genes ribossomais (HENDERSON *et al.*, 1972; HSU *et al.*, 1975).

Contudo, há evidências de que nem todos os sítios de rDNA coincidem com constrições e que em alguns casos a NOR contém muita cromatina condensada.

Algumas constrições secundárias consistem de heterocromatina inativa (GOESSENS, 1984).

Uma célula diplóide humana contém dez NORs, dessa forma era de se esperar encontrar dez nucléolos. Porém, mesmo em células humanas de rápida variação morfológica e funcional, o número de nucléolos é menor. Existem duas explicações para esta observação: nem todas as NORs são ativas ou mais que uma NOR tem parte na formação de um nucléolo (GOESSENS, 1984).

Foi demonstrado através do método de hibridização *in situ* que em células ativas, todas as NORs participam da formação do nucléolo. Algumas observações claramente indicam que quando células são ativadas, NORs são também ativadas, mesmo que previamente inativas. Tem sido sugerido também que toda NOR, ou grupos de genes que se repetem são ligados ou desligados em bloco, um fato que é considerado quando mecanismos de ativação ou inativação de genes de rRNA são estudados. Além disso, foi demonstrado que NORs podem se movimentar no núcleo, dependendo da demanda para a biogênese de ribossomos, porém nada parece ser conhecido sobre o mecanismo de tais movimentos cromossômicos (Revisão SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993).

1.2. MÉTODOS PARA COLORACÃO SELETIVA DE NORs

1.2.1. No núcleo interfásico

Ao nível citológico, o método de impregnação pela prata tem sido usado para marcação de nucléolos e NORs. Porém, há muitos anos existem controvérsias sobre o significado biológico desta marcação (JIMENEZ *et al.*, 1988).

A colorabilidade do nucléolo por sais de prata é há muito tempo conhecida. Descrições detalhadas da estrutura fina do nucléolo à microscopia óptica, após impregnação por prata foram publicadas em 1899 por RUZICKA, depois por CAJAL (1910), por ESTABLE e SOTELO (1950) e por muitos outros autores (Revisão GOESSENS, 1984). Estudos com microscopia eletrônica revelaram que tanto componentes fibrilares como componentes densos fibrilares são responsáveis pela colorabilidade da prata em variados graus (BOURGEOUIS *et al.*, 1979; ELLINGER & WACHTLER, 1980; HERNANDEZ-VERDUM *et al.*, 1980; GOESSENS & LEPOINT, 1982). Testes histoquímicos precedidos por tratamentos com DNase, RNase e proteases, assim como análises químicas, indicaram que o material prata positivo do nucléolo consiste de proteínas acídicas (SCHWARZACHER *et al.*, 1978; BUSCH *et al.*, 1982). A localização destas proteínas nucleolares específicas é, contudo, dificultada pelo fato de que sais de prata marcam aparentemente mais do que um tipo de proteína. Além disso, a marcação pela prata nem sempre é congruente com a localização de proteínas específicas por métodos imunocitoquímicos.

Em resumo, dentre as proteínas prata-positiva ou proteínas Ag-NOR provavelmente estão incluídos muitos fatores necessários para transcrição do rDNA, e presumivelmente também para o processamento inicial do rRNA. A presença destas proteínas nas proximidades de NORs com baixa ou nenhuma atividade pode ser interpretada no sentido que são guardadas em estoque em um determinado local para alguma ativação imediata da transcrição do rRNA e biogênese ribossomal (Revisão SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993).

Correlação entre a marcação pela prata e um estado transcricionalmente ativo dos genes ribossomais tem sido geralmente admitida e sustentada por muitas

investigações. Muitos autores, contudo, refutam esta interpretação, baseando-se em estudos bioquímicos de inibição da síntese do rRNA (RAMAN & SPERLING, 1981; GOESSENS & LEPOINT, 1982; MEDINA *et al.*, 1983; SANCHES-PINA *et al.*, 1984) ou pela demonstração de que não há síntese de rRNA em NORs metafásicas que, apesar disso, mantêm sua colorabilidade pela prata (HSU *et al.*, 1965; FAN & PENMAN, 1971; GOESSENS & LEPOINT, 1979; FAKAN & PUVION, 1980; MIRRE & STHAL, 1981; RISUENO *et al.*, 1982).

Embora NORs sejam atualmente definidas principalmente por suas sequências de bases de DNA, nenhuma técnica de coloração da NOR é baseada nas propriedades do rDNA.

1.2.2. No cromossomo metafásico

O primeiro dos vários métodos citoquímicos propostos para detectar especificamente NORs em cromossomos metafásicos foi o bandamento N (MATSUI & SASAKI, 1973), que envolve a extração de ácidos nucléicos e histonas, seguida por coloração com Giemsa.

Dois anos depois foi descoberto que as NORs poderiam ser impregnadas especificamente por prata. HOWELL e colaboradores (1975) desenvolveram um método conhecido como As-sat (prata amoniacal-satélite), que envolve várias etapas: fixação do cromossomo em formalina, tratamento com prata amoniacal e com hidróxido de sódio e então, finalmente, detecção com uma mistura de formalina e prata amoniacal. No mesmo ano GOODPASTURE e BLOOM (1975) publicaram o

método Ag-As, introduzindo algumas modificações ao método de HOWELL e colaboradores (1975)

Em 1976, HOWELL e colaboradores publicaram uma variante do método Ag-As, onde mostravam que a coloração da NOR podia ser obtida pela incubação do material em uma solução de nitrato de prata a 50%, sem qualquer tratamento subsequente.

WANG e JUURLINK (1979) encontraram que um corante para proteína, "coomassie brilliant blue", podia ser usado para marcar NORs. O método foi aceito na época por ser simples, relativamente rápido e não requerer pré-tratamento das preparações.

Uma alternativa para a detecção da NOR foi proposta por OLERT (1979) que misturou uma solução de nitrato de prata 50% com ácido fórmico diluído. Este procedimento foi modificado por HOWELL e BLACK (1980), que adicionaram o ácido fórmico à solução de gelatina diluída, obtendo uma solução coloidal, que então foi misturada com o nitrato de prata imediatamente antes do uso. Este método tem sido o mais utilizado para animais e plantas, embora alguns pré-tratamentos tenham sido propostos com a intenção de melhorar a especificidade da impregnação e eliminar os depósitos de prata não específicos. Dentre estes já foi proposta a utilização de cianeto de potássio (THIEBAUT *et al.*, 1984) e a incubação em 2xSSC a 60°C (GOSALVEZ *et al.*, 1985), obtendo-se, em ambos os casos, resultados mais satisfatórios.

Além dos métodos de prata, têm sido também utilizados alguns fluorocromos. SCHWEIZER (1976) demonstrou que as NORs de certos cromossomos de plantas podiam ser seletivamente demonstradas com o uso dos antibióticos cromomicina ou mitramicina fluorescentes, os quais são específicos para regiões ricas em C+G.

Desde então, este método tem sido amplamente utilizado para evidenciar NORs em muitos organismos. A desvantagem de tais métodos é que não distinguem as NORs de outros segmentos cromossômicos também ricos em G+C, tais como certos blocos de heterocromatina (SUMNER, 1990).

Finalmente, técnicas moleculares como hibridização *in situ* e "western blot" têm sido também utilizadas para localização mais precisa de NORs. Contudo, estudos futuros são necessários para o entendimento molecular do rDNA e as relações entre proteínas Ag-NOR e cromatina (HERNANDEZ-VERDUM *et al.*, 1993).

2. HETEROCROMATINA

O termo heterocromatina foi introduzido no vocabulário genético por HEITZ em 1928 para descrever segmentos cromossômicos ou , em alguns casos, cromossomos inteiros, que permanecem no estado condensado durante a interfase do ciclo celular mitótico. A análise cuidadosa dos cromossomos durante sucessivas divisões demonstrou que as estruturas que formavam os cromocentros na interfase eram regiões específicas dos cromossomos que não se descondensavam na telófase mitótica (Revisão: JOHN, 1988).

A definição proposta por HEITZ foi então puramente morfológica, ou seja, heterocromatina foi descrita como sendo regiões que retinham uma estrutura compacta e heteropicnótica durante todo o ciclo celular. Estava implícito na definição originalmente proposta que toda cromatina intermitótica condensada pertencia a uma única classe, o que hoje se sabe estar incorreto. Em termos gerais, a

organização cromatínica pode existir durante a interfase em duas conformações distintas: difusa ou condensada. Essa diferença reflete os diferentes modos de condensação, resultantes da interação do DNA com proteínas cromossomais ou outras proteínas (WEITH, 1985).

Foi considerado que, semelhante à cromatina mitótica, a heterocromatina é transcricionalmente inativa. Através de estudos autorradiográficos foi possível obter evidências convincentes de que a síntese de RNA acontece somente no estado difuso ou disperso, enquanto a cromatina condensada é transcricionalmente inativa (RIS & KORENBERG, 1979). Uma região cromossômica pode estar inativa ou porque está num estado reprimido, onde o DNA está temporária e reversivelmente inativado, ou porque pode ser composta de DNA não codificador e assim ser permanentemente incapaz de transcrever (Revisão: JOHN, 1988).

A partir destes resultados relativos às diferentes formas de inatividade, foi revelada a ocorrência de dois tipos de heterocromatina. Aquela localizada em posições idênticas de cromossomos homólogos, em todas as células como uma entidade permanente, é considerada como sendo do tipo **constitutivo**, enquanto que aquela que apresenta vários estados de condensação em diferentes tipos celulares ou em diferentes estágios de desenvolvimento é considerada do tipo **facultativo** (Revisão MELLO, 1978; BABU & VERMA, 1987)

2.1. Heterocromatina constitutiva

Este tipo foi o que HEITZ originalmente observou e denominou heterocromatina. Difere da eucromatina, sendo composta predominantemente por

DNA altamente repetitivo, estando num estado permanentemente inativo, e representando um tipo estrutural distinto de cromatina. A princípio, se discutia a idéia de que a heterocromatina diferia da eucromatina em seu comportamento, mas que seriam semelhantes na estrutura fundamental (DYER, 1963; BROWN, 1966). Hoje sabe-se que a heterocromatina é composta por sequências de DNA com características bastante distintas (Revisão: JOHN, 1988).

A heterocromatina constitutiva é considerada como sendo uma entidade permanente de um dado cromossomo e tem sido motivo de muitos estudos por "conter DNA que nunca é transcrito em qualquer célula". Contudo, evidências para este assunto, pelo menos em mamíferos, têm sido baseadas somente em observações indiretas, ou seja, no efeito quase neutro de diferentes blocos de heterocromatina constitutiva sobre o fenótipo, no seu conteúdo de DNA altamente repetitivo que aparentemente perde as sequências que codificam proteínas, e na variação dos blocos e mesma composição molecular entre e dentro de espécies (JOHN & MIKLOS, 1979).

Com o avanço das técnicas bioquímicas e de autorradiografia ficou demonstrado que realmente a heterocromatina constitutiva é um tipo especial que em geral, apresenta em sua composição DNA altamente repetitivo, conhecido como DNA satélite, e que este localiza-se na heterocromatina constitutiva centromérica. Porém, existem algumas exceções como é o caso de *Drosophila*, em que este tipo de DNA foi detectado em outras regiões além da centromérica (Revisão: JOHN, 1988).

PARDUE e GALL (1970) em experimentos com hibridização *in situ*, verificaram que, no complemento cromossômico normal de camundongos ($2n=20$), cada cromossomo tem uma região próxima ao centrômero que pode ser identificada como heterocromática por sua propriedade de coloração. Estes autores notaram que

a heterocromatina centromérica dos cromossomos desta espécie, rica em DNA satélite, corava-se mais intensamente com Giemsa após terem sido desnaturados com uma base. Estes autores mostraram, então, que o DNA satélite hibridizava *in situ* com o DNA heterocromático centromérico dos cromossomos de camundongo.

ARRIGHI e HSU (1971), utilizaram o mesmo procedimento em preparações citológicas para localizar DNA repetitivo em cromossomos humanos, e também observaram as regiões heterocromáticas coradas mais intensamente, principalmente nas áreas centroméricas. O método ficou conhecido como "bandamento C".

Contudo, estes dados não indicam que heterocromatina constitutiva contenha somente sequências altamente repetitivas. Há casos onde o DNA satélite ou outros DNAs repetitivos ou não são únicos ou não são os componentes mais comuns de alguma categoria de heterocromatina constitutiva. Isto é especialmente claro no ser humano, onde o bandamento C indica que 13% do genoma é heterocromatina constitutiva, porém somente metade destes sítios contém sequências satélites (BROWN, 1983).

A grande variação observada em DNAs satélites em diferentes eucariotos, tem sido um enigma desde sua descoberta. A observação de que estas sequências de DNA estavam localizadas em regiões heterocromáticas (PARDUE & GALL, 1970), aumentou o interesse nos estudos sobre esta variabilidade, uma vez que a heterocromatina era considerada relativamente inerte geneticamente (GERSHENSON, 1933) e também por apresentar uma grande variação de espécie para espécie. Estes estudos têm contribuído para se conhecer como este DNA, altamente repetitivo, varia entre espécies e se tais frações variáveis do genoma, podem ser responsáveis por alguma das funções atribuídas à heterocromatina (BRUTLAG, 1980).

A heterocromatina pode ocupar praticamente toda a extensão de um cromossomo ou em outros casos, como já mencionado, pode-se restringir à proximidade do centrômero (heterocr. centromérica) e/ou às extremidades de um ou mais cromossomos (heterocr. telomérica) e/ou à vizinhança do organizador do nucléolo. Em alguns organismos, a heterocromatina constitutiva pode também estar localizada em bandas específicas nos braços dos cromossomos (heterocromatina intercalar) (SCHWEIZER *et al.*, 1987).

Hoje sabe-se que o termo heterocromatina envolve sistemas comportamentais completamente diferentes. Assim é que, o método de bandamento C que fornece a marcação mais consistente para identificação da heterocromatina constitutiva, algumas vezes requer modificações consideráveis no procedimento convencional, para a obtenção de resultados positivos (Revisão: JOHN, 1988).

Algumas exceções ao comportamento convencional da heterocromatina podem ser encontradas em diversos organismos. Os carnívoros em geral, possuem somente pequenos blocos de heterocromatina constitutiva. Algumas espécies de carnívoros, entretanto, têm blocos relativamente grandes de heterocromatina nos autossomos. Estes, contudo, não são banda C positivos, embora sejam tardiamente replicados. A mosca *Sarcophaga bullata* tem um genoma cinco vezes maior que o de *Drosophila melanogaster*, mas contém somente pequenos blocos de DNA altamente (9%) e moderadamente (6%) repetitivo, com 81% do genoma na forma de sequências de cópias simples (Revisão: JOHN, 1988). Usando cDNAs para todas as três classes de sequências, SAMOLS e SWIFT (1979) mostraram que o DNA repetitivo é restrito às regiões de heterocromatina constitutiva de dois cromossomos, mas no entanto, todos os outros autossomos possuem regiões que são banda C-positivas. O cromossomo Y de *Drosophila hydei* que é claramente banda C-positivo, também não contém DNA

altamente repetitivo. RENKAWITZ (1978) isolou duas frações de DNA altamente repetitivo desta espécie, uma que compreende 13% do genoma, é restrita à heterocromatina do cromossomo X, a outra que constitui 4% do genoma, hibridiza-se apenas com os quatro acrocêntricos. Duas frações de DNA moderadamente repetitivo foram também localizadas em posições heterocromáticas específicas (Revisão: JOHN, 1988).

Estes exemplos indicam que a composição do DNA das regiões heterocromáticas constitutivas varia inter e intraespecificamente, e esta variação pode influenciar as propriedades destas regiões. Está bastante claro que a heterocromatina constitutiva é heterogênea na composição de sua sequência e não pode ser caracterizada só pela composição de bases (JOHN, 1988).

A heterocromatina ocorre na maioria dos organismos e muitas funções têm sido propostas para este tipo de cromatina, incluindo envolvimento no enovelamento cromossômico, reconhecimento de centrômeros homólogos, proteção estrutural dos centrômeros e genes ribossomais, papel no fenômeno de afinidade (na qual grupos de cromossomos de cada par, nas células de um híbrido, tendem a segregar separadamente) (WALKER, 1971; YUNIS & YASMINEH, 1971), atuando como uma proteção contra agentes clastogênicos (HSU, 1975) e na determinação do volume nuclear (CAVALIER-SMITH, 1978). Estas regiões cromossômicas com propriedades totalmente diferentes daquelas do restante do genoma, apesar do aparente fracasso em ensaios genéticos de mutação e recombinação, apresentam alguns efeitos genéticos significantes, podendo influenciar fortemente o nível de atividade de genes que são transferidos para próximo das regiões heterocromáticas (efeito de posição) e mesmo a expressão de certos genes (PARDUE & HENNING, 1990). Na verdade, há muito poucas evidências para qualquer destas funções.

Parece claro que a heterocromatina exerce algum efeito sobre um certo número de eventos celulares, tanto em células somáticas como em células da linhagem germinativa. Porém, como MAYNARD-SMITH (1982) enfatizou, é importante reconhecer que efeitos não são funções. Isto é o que ocorre nos processos onde se atribui participação funcional da heterocromatina, tais como pareamento, segregação, rearranjos, especiação e recombinação dos cromossomos.

Embora se saiba que a heterocromatina desempenha um importante papel biológico, suas exatas funções e as razões para sua ocorrência difundida ainda permanecem obscuras.

Sabe-se hoje que cromocentros não são formados para todos os tipos de heterocromatina, como era imaginado no início. E, com poucas exceções, está aceito o fato de que a heterocromatina, em geral, é tardiamente replicada (Revisão: JOHN, 1988).

A questão crítica que permanece é se a heterocromatina é geneticamente inerte. Existe a possibilidade da heterocromatina desempenhar uma função na linhagem germinativa sem significado algum para o desenvolvimento somático.

As chamadas sequências DNA satélites, como citado anteriormente, geralmente não são transcritas e estão frequentemente localizadas na heterocromatina associada à regiões centroméricas dos cromossomos. Tais sequências parecem sofrer rápidas mudanças e substituições de suas posições nos cromossomos ao longo da evolução. Quando dois cromossomos mitóticos homólogos de humanos são comparados, por exemplo, algumas sequências satélites são encontradas estar arranjas de uma maneira surpreendentemente diferente nos dois cromossomos. Além disso, em contraste com o alto grau de conservação de sequências de DNA no genoma, geralmente há uma diferença marcante das sequências satélites em espécies

relacionadas. Nenhuma função específica para este tipo de DNA foi encontrada. Tem portanto sido sugerido que são uma forma extrema de sequências de "DNA egoísta" (selfish), cuja propriedade garante sua própria retenção no genoma mas que nada ajuda na sobrevivência das células que as contém (ALBERTS *et al.*, 1994).

A existência de uma grande quantidade de sequências de DNA altamente repetitivo é um dos pontos intrigantes. A análise da organização e sequência de nucleotídeos destes segmentos repetidos "in tandem" tem ajudado a direcionar o entendimento da organização estrutural do DNA heterocromático (Revisão: JOHN, 1988). Tais sequências altamente repetitivas não se ajustam facilmente aos paradigmas atuais para atividade genética, levantando a possibilidade de que a heterocromatina possa ser apenas "lixo" (junk). Contudo, PARDUE e HENNING (1990) concluíram, após um encontro com 70 pesquisadores no Workshop internacional sobre heterocromatina de *Drosophila*, que na verdade, a heterocromatina não é apenas lixo, mas sim um coletor de itens (collector's item), embora muitas questões importantes permaneçam ainda duvidosas.

Atualmente se sabe que cópias de muitas famílias de elementos de transposição (transposons) são encontrados na heterocromatina de *Drosophila melanogaster*. Aceita-se que geralmente estas sequências representam elementos que entram na heterocromatina somente para serem inativados pela cromatina ao redor e aí são aprisionados, perdendo sua mobilidade. Alguns autores já começaram, entretanto, a mostrar que pelo menos para uma classe de elementos transponíveis, *HET-A*, a associação pode não ser acidental, e que as sequências poderiam ter algum papel na estrutura da heterocromatina do cromossomo Y de *D. melanogaster* (DANILEVSKAYA *et al.*, 1993; SHEVELYOV, 1993).

2.2. Banda C

A técnica de bandamento C, que hoje é considerada como a melhor maneira para se detectar citologicamente regiões heterocromáticas constitutivas, teve como origem o método clássico de hibridização *in situ*, desenvolvido por PARDUE e GALL (1970), para evidenciar DNAs satélites. Estes pesquisadores observaram que estas regiões coravam mais intensamente com Giemsa após terem sido desnaturadas com uma base antes da hibridização.

Baseando-se nas observações anteriores, ARRIGHI e HSU (1971) descreveram um protocolo para evidenciar heterocromatina constitutiva, que foi denominado de "bandamento C". Este envolvia um tratamento do material com HCl 0,2N, desnaturação do DNA com hidróxido de sódio 0,07N e incubação em citrato-salina (2xSSC, NaCl 0,3N e citrato trissódico 0,03N). Cada um destes passos tem um papel específico no processo. O tratamento preliminar com HCl depurina o DNA, mas não quebra os sítios depurinados. A extração destes ocorre durante o estágio final de incubação em salina, como consequência da β -eliminação, direcionando assim, uma ruptura da cadeia. O tratamento alcalino, causa quebra dos sítios apurínicos, bem como a desnaturação irreversível do DNA (HOLMQUIST, 1979).

O tratamento dos cromossomos com hidróxido de sódio ou sais resulta na extração de 80% do DNA dos cromossomos. Este é preferencialmente extraído das regiões de banda C negativas, resultando em uma fraca coloração comparada com as regiões de heterocromatina constitutiva. Originalmente foi sugerido que a heterocromatina constitutiva era protegida devido à sua ligação com algumas proteínas não histônicas, que não estavam presentes na eucromatina. Porém, através de estudos sobre a heterocromatina de *Drosophila virilis* ficou clara a deficiência de

proteínas não histônicas comparada à eucromatina (COMINGS, 1977). Isto é consistente com outras observações que indicam que geralmente a cromatina geneticamente ativa é muito mais rica em proteínas não histônicas do que a cromatina geneticamente inativa. Isto sugere que a cromatina que está ligada somente com histonas é mais fortemente compactada que a cromatina que contém um significativo amontoado de proteínas não histônicas. Talvez seja esta firme compactação, que proteja a heterocromatina constitutiva da destruição pelo hidróxido de sódio e outras substâncias e permita que o bandamento C ocorra (COMINGS *et al.*, 1978).

Vários métodos simplificados e modificados têm sido descritos para animais e plantas. Observou-se, por exemplo, que o tratamento com hidróxido de sódio mostrava-se destrutivo ao DNA e várias modificações foram propostas, como o uso de concentrações mais baixas (GAGNÉ *et al.*, 1971) e de solução de hidróxido de sódio alcoólica (HANSEM-MELANDER *et al.*, 1974). O tratamento com solução salina também foi modificado, envolvendo aumento de concentração (6x ou 12xSSC) (GAGNÉ *et al.*, 1971) e incubação prolongada (SINHA *et al.*, 1972; VOICULESCU *et al.*, 1972).

Finalmente, em 1972, SUMNER e colaboradores propuseram uma modificação ao método de ARRIGHI e HSU, utilizando hidróxido de bário em vez de hidróxido de sódio. Este método, conhecido como BSG (bário/salina/giemsas), teve enorme sucesso e hoje é estabelecido como método modelo para bandamento C em animais e plantas (SUMNER, 1990).

Embora muitas outras variantes tenham sido publicadas, as modificações importantes são poucas. Apenas ajustes de tempo de desnaturação pela base e de

incubação em salina, e de temperatura têm sido realizados de acordo com a espécie a ser estudada.

Bandamento C é considerado um método para detectar heterocromatina constitutiva, porém sabe-se que existem alguns casos em que o método de banda C não detecta heterocromatina. Assim, outros métodos, incluindo banda N e alguns métodos de fluorescência têm sido usados nesses casos. Isto conduz à conclusão que bandas heterocromáticas são de fato muito heterogêneas. Isto não é tão evidente pelo fato do bandamento C ser o método mais utilizado, mas quando outras técnicas de identificação são usadas, torna-se claro que existe um grande número de tipos de heterocromatina (SUMNER, 1990).

3. CEC

O conceito de concentração crítica de eletrólitos (CEC) e suas aplicações foi descrito por SCOTT (1960). Este autor estudou a localização e identificação de diferentes compostos aniônicos da matriz extracelular (glicosaminoglicanos ácidos), usando como corante o azul de alcian. SCOTT (1960) considerou o valor de CEC como sendo a concentração de cátions inorgânicos, expressa em molaridade, na qual a coloração deixava de ser verificada. Isto ocorria devido à competição entre moléculas do corante catiônico e os cátions inorgânicos pelo substrato. De acordo com o tipo e as forças das cargas dos cátions inorgânicos adicionados e das afinidades dos componentes aniônicos, a coloração do substrato aparecia completamente abolida em uma certa concentração dos cátions inorgânicos (SCOTT, 1960; 1970; 1973; SCOTT & DORLING, 1965; SCOTT & STOCKWELL, 1967).

O princípio de CEC foi então sugerido por VIDAL & MELLO (1989) para estudos de mudanças em composição e/ou supra-organização dos complexos nucleoprotéicos, empregando-se o azul de toluidina, como corante catiônico, em virtude de suas bem conhecidas propriedades físico-químicas e de estereoarranjo (VIDAL, 1987) e o Mg^{+2} , como cátion inorgânico. As moléculas do azul de toluidina competem com os íons Mg^{+2} pelas ligações com grupos fosfatos disponíveis no DNA e RNA. Neste caso, a CEC é considerada como o valor da concentração de Mg^{+2} , em molaridade, no qual a metacromasia dos complexos nucleoprotéicos é completamente abolida (VIDAL & MELLO, 1989; MELLO & VIDAL, 1989; AMARAL & MELLO, 1989; MONTEIRO, 1993).

MELLO e colaboradores (1993) sugeriram uma variante do método de CEC, onde o nucléolo é significativamente discriminado. Através desta técnica, foi encontrado que complexos ribonucleoprotéicos poderão ser metacromáticamente abolidos, após o valor de CEC dos complexos DNA-proteína ter sido atingido.

4. AS ESPÉCIES EM ESTUDO

Haematobia irritans (Muscidae, Muscinae, Tribo Stomoxyinae)

Esta espécie, popularmente conhecida como mosca dos chifres, pertence à família Muscidae e foi descrita por Linnaeus (1758). Sua importância econômica é devida aos danos causados pelo hábito hematófago dos adultos, provocando irritação no gado, o que resulta em distúrbios na alimentação, digestão imprópria e, conseqüentemente, causando redução na incorporação de peso de 0,1-0,5 libras por

dia e de 25-50% na produção diária de leite (BRUCE, 1942). Nos Estados Unidos, onde é a principal praga do gado bovino, as perdas econômicas estão estimadas em 730 milhões de dólares por ano (DRUMOND *et al.*, 1981).

O ciclo de vida, do ovo ao adulto, varia de 8 a 10 dias no calor e de 30 a 45 dias no frio. Cada fêmea coloca aproximadamente 22 ovos por vez em fezes recém eliminadas de bovinos (BRUCE, 1942). Os ovos são alongados, medindo de 1,3 a 1,5mm de comprimento, possuem variação na cor que pode ser de marrom avermelhada à amarela e apresentam uma estria longitudinal em um dos lados. O estágio de ovo dura de 12 a 16 horas, dependendo da temperatura, e as larvas se criam nas fezes. Após sofrerem duas mudas, alcançam o terceiro estágio larval dentro de 3 a 12 dias. O corpo da larva é pontiagudo anteriormente e alargado na extremidade posterior, na qual está presente um par de espiráculos (BRUCE, 1942).

Esta praga originária do Velho Mundo, foi introduzida nos Estados Unidos entre 1884 e 1886 em gado importado da Europa; em 1898 já tinha se espalhado por todo o continente Norte Americano (MARLATT, 1910).

Esta mosca distribui-se por vários países do continente Americano (EUA, México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Guianas, Panamá, Porto Rico, Cuba, Jamaica, Haiti, Colômbia, Venezuela, Brasil, Chile, Argentina), Europa, Ásia e norte da África (CARVALHO *et al.*, 1993).

Considerada em todo o mundo como uma das piores pragas do gado, *H. irritans* chegou ao Brasil na década de oitenta. De onde veio e como entrou em nosso país é ainda motivo de controvérsias entre pesquisadores. Alguns apontam como porta de entrada a fronteira entre o Acre e o Peru, outros a fronteira de Roraima com a Guiana, vinda dos Estados Unidos, através da América Central.

Inicialmente a mosca ficou confinada na Amazônia, dispersando-se de forma lenta, provavelmente devido às características da pecuária nessa região. Com sua chegada aos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, era iminente a ampla dispersão da mosca em decorrência do grande trânsito de animais para as regiões Sul e Sudeste. Desta forma, em fevereiro de 1990, *H. irritans* foi registrada pela primeira vez ao norte do estado de São Paulo, vinda do Tocantins (BORJA, 1990)

***Muscina stabulans* (Muscidae, Azeliinae, Tribo Reinwardtiini)**

É uma espécie sinantrópica de distribuição cosmopolita, abundante em pomares e também em granjas de galinhas poedeiras no período de julho a novembro (R. M. P. AVANCINI, comunicação pessoal). Apresenta considerável importância sanitária e epidemiológica, devido à sua associação com habitações humanas.

Possui um comprimento variável de 7 a 10 mm, sendo mais robusta que a mosca doméstica

Os ovos desta espécie são postos em material orgânico e excrementos, incluindo fezes humanas e de outros animais, onde as larvas se desenvolvem. O ciclo de vida completo varia de 5 a 6 semanas (JAMES & HARWOOD, 1969)

A alimentação dos adultos varia entre diversas substâncias, preferencialmente carnes, frutas e vegetais apodrecidos ou em fermentação. As fêmeas penetram nas casas, podendo ovipor em comida e restos alimentares, tornando muitas vezes real a oportunidade de ocasionar parasitismo (miíases) (JAMES, 1947). Semelhante à mosca doméstica, pode estar envolvida na transmissão mecânica de vários

organismos patogênicos para o ser humano e outros animais (WILLIAMS *et al.*, 1985)

4.1. Os cromossomos de *M. stabulans* e *H. irritans*

Existem dúvidas com relação ao cariótipo destes muscóideos. METZ (1916) forneceu algumas informações sobre os cromossomos de *M. stabulans*, mas o cariótipo não foi descrito e seus comentários eram primariamente relacionados ao comportamento dos cromossomos no pareamento somático. Este autor sugeriu que esta espécie era portadora de 6 pares de cromossomos.

BOYES e colaboradores (1964) observaram que, na verdade, a espécie *M. stabulans* possuía cinco pares de cromossomos e que aparentemente não apresentava par sexual.

Os cromossomos de *H. irritans* foram observados por LACHANCE (1964) que não descreveu o cariótipo. O mesmo foi descrito por AVANCINI e WEINZIERL (1994) que localizaram uma NOR no par cromossômico III.

Estas duas espécies são exceções dentro da família Muscidae, apresentando um conjunto haplóide com cinco cromossomos, enquanto a regra nesta família é $2n=12$, sendo um par sexual. Estas características fazem destas espécies um interessante modelo para as comparações que se pretende neste trabalho.

5. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1) A determinação cariotípica de *Muscina. stabulans* e *Haematobia. irritans*.

2) a localização física de NORs em *H. irritans* e *M. stabulans*, através da técnica de impregnação por prata em cromossomos mitóticos e meióticos.

3) a localização de heterocromatina no conjunto cromossômico através do método de banda C. Os resultados obtidos para as duas espécies deste estudo serão comparados entre si, bem como com os já disponíveis na literatura para outras espécies do grupo.

4) O estudo do comportamento do nucléolo interfásico durante a espermatogênese de *M. stabulans*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. OBTENÇÃO E PROCEDÊNCIA

1.1.1. *Muscina stabulans*

Os exemplares desta espécie, utilizados neste trabalho, foram obtidos da criação do Laboratório de Entomologia do Departamento de Parasitologia da UNICAMP. A geração parental foi coletada na granja Capuavinha, localizada no município de Monte Mor, SP. Neste trabalho foram utilizados preferencialmente adultos e larvas da geração F2.

Os adultos foram mantidos em gaiolas de "nylon", medindo 30x30x48cm, com uma dieta à base de açúcar e água, a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Como componente protéico da dieta é usado o meio de cultura à base de ração para camundongos fermentada. Este mesmo meio, colocado em frascos de vidro, alimenta as larvas e, posteriormente, abriga as pupas.

1.1.2. *Haematobia irritans*

Adultos desta espécie foram coletados sobre o gado, com o auxílio de um puçá, nas fazendas Nossa Senhora Aparecida e Água Parada na região de Mogi Guaçu, SP, em fazendas próximas à Mogi Mirim e ao distrito de Santa Eudóxia, na região de São Carlos, SP. As moscas foram trazidas ao laboratório em gaiolas recobertas com tela de "nylon" e seus ovos coletados durante um período de mais ou menos 6 horas.

Estes foram, então, com ajuda de um pincel, transferidos para fezes frescas de gado bovino.

Após 3 dias, dependendo da temperatura, algumas larvas em estágio L3 (pré-pupa) foram utilizadas para obtenção das preparações citológicas e as restantes deixadas para empupar. As pupas foram posteriormente separadas do esterco e mantidas em frascos até à emergência dos adultos

2. MÉTODOS

2.1. PREPARAÇÕES CITOLÓGICAS

2.1.1. OVOS

Os ovos foram decorionados em fita adesiva, fixados por cinco minutos em etanol-ácido acético 3:1 e esmagados entre lâmina e lamínula em uma gota de ácido acético 45% (BEDO, 1991).

O conjunto foi mergulhado em nitrogênio líquido, para remoção da lamínula. Quando as lâminas atingiram a temperatura ambiente foram imersas em álcool 70% por alguns minutos, deixadas secar ao ar e então, guardadas no escuro para posterior tratamento com técnicas de impregnação pelo íon prata e de obtenção de bandas C.

2.1.2. LARVAS

- **Gânglios nervosos**

As larvas L3 foram dissecadas em solução de NaCl 0,85% e os gânglios nervosos retirados e colocados em água destilada por 3 minutos. Em seguida, foram fixados por 4 minutos em uma solução de etanol/ácido acético 3:1 e, então, esmagados entre lâmina e lamínula com uma gota de ácido acético 45%. A seguir foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 2.1.1

Foi também utilizado o método de IMAI (1988) na tentativa de se obter maior espalhamento dos cromossomos mitóticos e meióticos. Este método envolve hipotonia com uma solução de citrato de sódio a 1% adicionada de colchicina 0,005% por 20 minutos, e a utilização de soluções fixadoras em três etapas : 1-Água destilada, etanol e ácido acético (4:2:2) por 2 minutos, 2- Etanol e ácido acético (1:1) por 2 minutos, 3- ácido acético glacial até que a lâmina seque. Com este método não é feito o esmagamento do tecido entre lâmina e lamínula, mas é feita uma dissociação com agulhas, na segunda etapa de fixação e esta promove um bom espalhamento do material.

- **Corpos Gordurosos**

Foram retirados de larvas L3 e submetidos ao mesmo tratamento citado para ovos e gânglios cerebrais.

2.1.3. ADULTOS

Foram utilizados testículos que, após a dissecação, sofreram o mesmo tratamento citado no item 2.1.2 As lâminas foram também posteriormente utilizadas para colorações de Ag NOR e/ou para obtenção de Banda C.

2.1.4. Coloração por orceína lacto-acética

Alguns gânglios nervosos e testículos foram submetidos à coloração rotineira com orceína lacto-acética, para a realização de alguns testes e controle da qualidade dos preparados. Para este fim, também foi utilizada a coloração com Giemsa.

2.1.5. Ag-NOR

O método utilizado para a marcação de NOR foi o de HOWELL & BLACK (1980), com modificações. Sobre as lâminas contendo o material pingou-se uma gota de uma solução contendo gelatina 2% e ácido fórmico 1% e duas gotas de uma solução de nitrato de prata a 50%. As lâminas foram colocadas na estufa a 60°C e retiradas quando as soluções sobre a lâmina apresentavam coloração marrom dourada. Foram testadas várias modificações, como mudanças na temperatura da reação e alteração na proporção de gelatina e nitrato de prata de 2:1 para 7:1 afim de aumentar o pH da solução.

O método de IMAI (1988) também foi testado. Neste, as lâminas com as soluções gelatina + nitrato de prata (1:2) são cobertas com um pedaço de "nylon"

(nos outros métodos utilizou-se lamínulas) e colocadas sobre uma placa quente a 60° C em vez de estufa.

Foram utilizadas também técnicas como as de BEDO (1986) e GOSALVES (1985) que introduzem ao método de HOWELL & BLACK, um pré-tratamento com 2xSSC à 60°C por 15 minutos.

2.1.6. BANDA C

O método utilizado foi o de SUMNER (1972), com modificações. Inicialmente as lâminas contendo o material foram submetidas a um tratamento com HCl 0,2N por 30 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar. Foram então tratadas com uma solução saturada de Ba(OH)₂ octaidratado 5%, à 60°C (banho Maria), por aproximadamente 12 segundos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada com o cuidado para que a película formada pelo Ba(OH)₂ na superfície da solução não aderisse às lâminas, e passadas rapidamente por HCl 0,2N. Após serem lavadas e secas, foram incubadas em 2xSSC (NaCl 0,3 M + citrato de sódio 0,03M), à 60°C, por uma hora. As lâminas foram posteriormente lavadas em 2xSSC frio, em água destilada acidificada com algumas gotas de ácido acético, e duas vezes em água destilada. Depois de secas ao ar, foram coradas com Giemsa a 2% por 20 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar.

2.1.7. CEC para evidênciação de RNA

Para a realização desta técnica (MELLO *et al.*, 1993) foram utilizadas lâminas contendo esmagamento de gânglio cerebral de larvas L3 de *M. stabulans*, onde eram observados cromossomos politênicos provenientes, provavelmente, de corpo gorduroso. Estas lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0, por 20 minutos, e imediatamente imersas em uma solução de cloreto de magnésio 0,01M, por 8 minutos. Depois de secas ao ar, foram diafanizadas em xilol e montadas com Entelan.

Foram feitas 20 medições das áreas AgNOR e CEC positivas, e da largura dos respectivos cromossomos politênicos, utilizando-se a projeção das áreas fotografadas em mesmo aumento ao microscópio, sobre papel milimetrado, computando-se o total de área projetada para cada método.

Foi realizado teste de correlação entre o aumento na largura dos cromossomos admitido como função do desenvolvimento, e as áreas AgNOR positivas e reativas ao método de CEC. Os dados foram comparados através de testes estatísticos compatíveis (teste U de Mann-Whitney).

2.2. MONTAGEM

As lâminas foram diafanizadas em xilol P.A. e montadas com Bálsamo do Canadá.

2.3. FOTOGRAFIAS

As micrografias foram obtidas em microscópio Zeiss utilizando-se filme preto e branco Agfa Copex Xpan.

2.4. CARIÓTIPO

Para a confecção do cariótipo foram analisadas metáfases de células de gânglio cerebral de 10 larvas L3 .

As metáfases foram fotografadas e os cromossomos medidos nas ampliações fotográficas com um paquímetro convencional. Foram feitos os cálculos para comprimento relativo, razão de braços e índice centromérico (BEÇAK, 1967).

Para a localização das constrições secundárias em *M. stabulans* foram utilizadas metáfases obtidas de ovos, uma vez que não foi possível visualizá-las nas metáfases de gânglio cerebral, devido à grande compactação do cromossomo neste tecido.

A classificação dos cromossomos foi realizada segundo LEVAN e colaboradores (1964). (Tabela 1).

Classificação	Localização	Valor de r
Metacêntrico	Mediana	1,0-1,7
Submetacêntrico	Submediana	1,7-3,0
Subtelocêntrico	Subterminal	3,0-7,0
Telocêntrico	Terminal	7,0-∞

Tabela 1- Classificação segundo LEVAN *et al.*, 1964. r: razão de braços.

RESULTADOS

1. CARIÓTIPO DE *M. stabulans*

A análise de metáfases somáticas, submetidas a coloração com Giemsa, a técnica de impregnação pelo íon prata e de obtenção de bandas C evidenciou que *M. stabulans* apresenta um cariótipo constituído por 5 pares de cromossomos com centrômeros claramente visíveis (Figs. 2, 6 a 9, 18 a 21). Na Tabela 2, estão sumarizadas as medidas de tamanho relativo, relação de braços e índice centromérico, sendo a classificação baseada em LEVAN *et al.*(1964). Estes dados foram utilizados para a construção do idiograma (Fig. 3), onde os cromossomos são apresentados em ordem decrescente de tamanho.

O cromossomo I é um pouco maior que o II, sendo as razões de braços exatamente iguais, o que os levam a ser classificados como típicos metacêntricos (LEVAN *et al.*, 1964). Estes cromossomos são relativamente maiores que o par III, o qual apresenta uma razão de braços maior, sendo portanto quase um submetacêntrico. Os cromossomos IV e V embora apresentem tamanho semelhante, mostram razão de braços bem distintas sendo a do par IV, submetacêntrico, a maior do complemento.

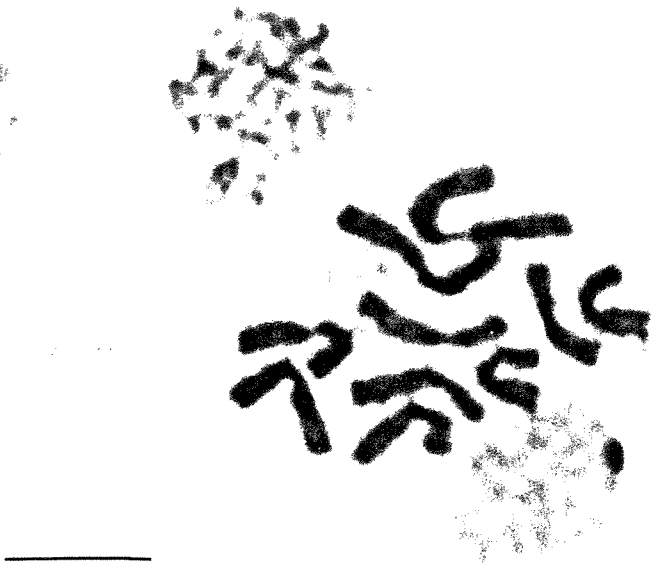
Assim pode-se concluir que os pares autossômicos I, II, III e V são metacêntricos e o par IV, submetacêntrico.

Em nenhuma das metáfases analisadas foi encontrado heteromorfismo em algum par que pudesse indicar a presença de cromossomos sexuais. Assim, como também discutido por BOYES e colaboradores (1964), esta espécie possui cinco pares de autossomos, aparentemente sem par sexual.

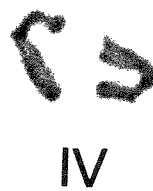
Foram observadas duas constrições secundárias no braço longo do cromossomo I: uma localizada na porção mediana, entre o centrômero e a extremidade do cromossomo, e a outra localizada mais próxima à extremidade do cromossomo (Figs. 3 e 6). Outra constrição foi constantemente observada no braço curto do cromossomo II (Figs. 3 e 6).

A

2



B



Cromossomos	I	II	III	IV	V
Comprimento (μm) + SD	7,42 \pm 0,13	6,46 \pm 0,22	5,64 \pm 0,15	5,29 \pm 0,14	4,9 \pm 0,10
Razão de Braços	1,16	1,16	1,52	1,76	1,31
Índice centromérico	45,85%	46,17%	39,62%	36,44%	43%
Comprimento relativo	24,60	21,20	18,50	17,30	16,20
Classificação	metac.	metac.	metac.	submet.	metac.
Comprimento do Genoma (n) 29,71μm					

TABELA 2: Dados morfométricos de cromossomos mitóticos de *M. stabulans*.
Classificação segundo Levan *et al.* (1964).

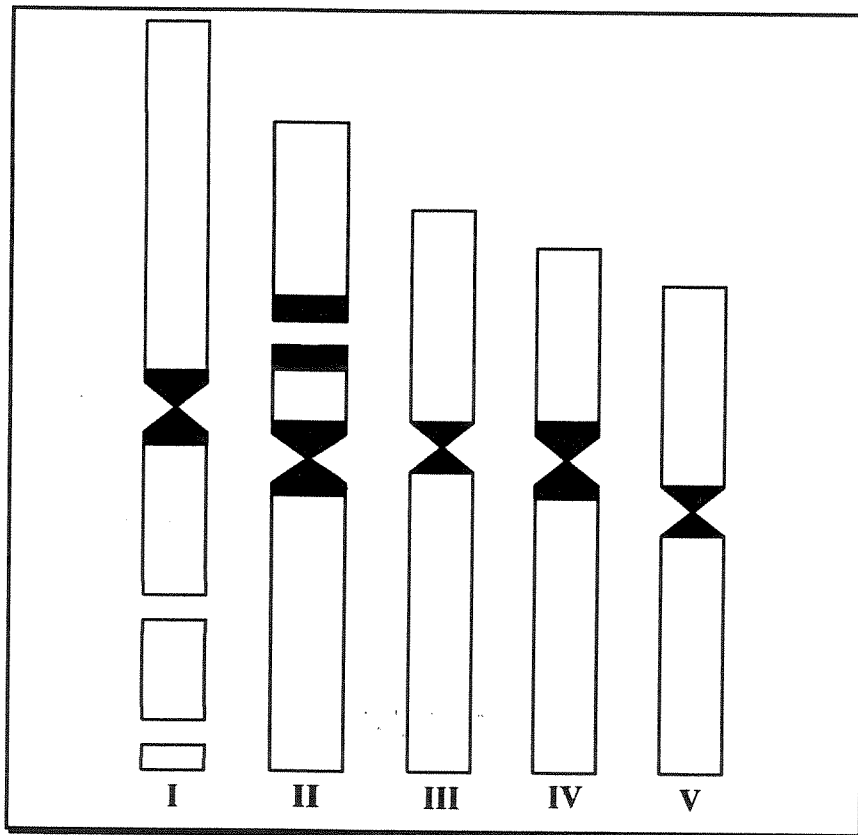


Fig. 3: Idiograma representando os cromossomos de *M. stabulans*.
Regiões escuras: bandas C-positivas.

2. CARIÓTIPO DE *Haematobia. irritans*

Através da coloração com Giemsa, técnica de impregnação pelo íon prata e de obtenção de bandas C pode-se observar os cromossomos metafásicos e o cariótipo constituído por 5 pares de cromossomos de *H. irritans* (Fig. 4). A partir dos resultados apresentados na Tabela 3 pode-se observar que os pares I, II e V são metacêntricos e os pares III e IV, submetacêntricos.

O cromossomo I é um pouco maior que o II, assim como sua razão de braços. Os pares III e IV apresentam pouca diferença no que diz respeito ao comprimento total; suas razões de braços são bastante diferentes, mas mostram que os dois são submetacêntricos típicos. O cromossomo V é bem menor que o IV e sua razão de braços indica ser um metacêntrico, porém quase submetacêntrico.

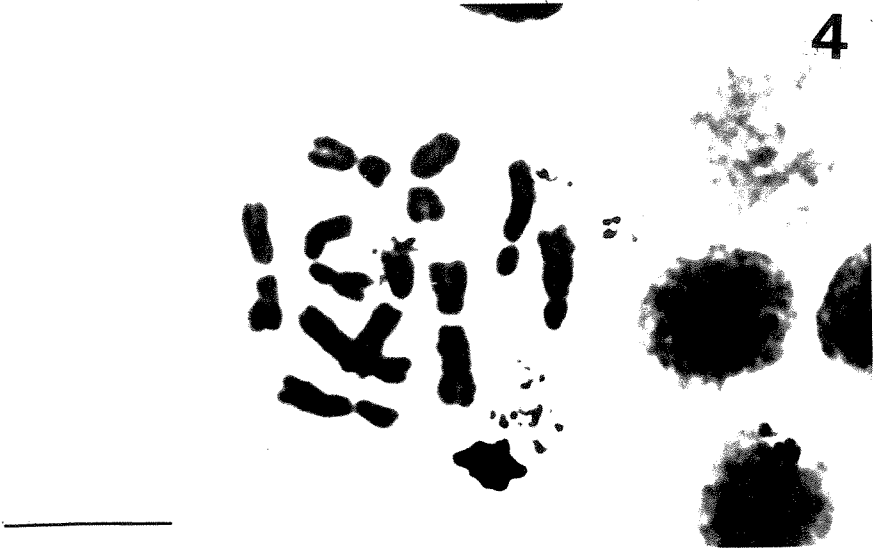
Pode ser notada uma constrição secundária no braço curto do cromossomo II (fig. 4, 5 e 11).

Assim como no caso de *M. stabulans*, não foi observado qualquer heteromorfismo que pudesse indicar a presença de um par sexual.

PRANCHA II

Figura 4: Célula de gânglio cerebral de *Haematobia irritans*, corada com Giemsa.

A: metáfase, B: cariótipo. Barra:5 μ m.



Cromossomos	I	II	III	IV	V
Comprimento (μm) + SD	6,7 \pm 0,26	6,0 \pm 0,18	5,5 \pm 0,27	5,1 \pm 0,24	4,3 \pm 0,18
Razão de Braços	1,34	1,18	2,31	2,07	1,68
Índice centromérico	42,52%	44,01%	30,48%	33,50%	37,23%
Comprimento relativo	23,5	21,5	19,6	17,9	15,5
Classificação	metac.	metac.	submet.	submet.	metac.
Comprimento do Genoma (n) 27,6μm					

TABELA 3: Dados morfométricos de cromossomos mitóticos de *H. irritans*. Classificação segundo Levan *et al.* (1964).

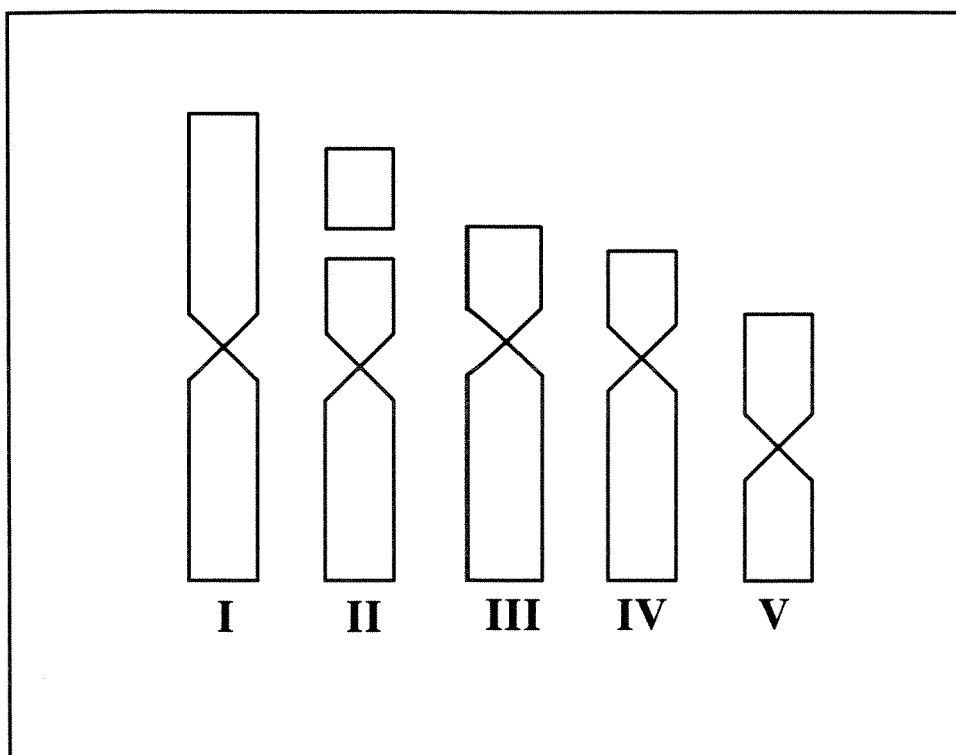


Fig. 5: Idiograma representando os cromossomos de *H. irritans*.

3. NOR

No estudo da localização física de NORs de *Muscina stabulans* e *Haematobia irritans* foi utilizado o método de impregnação pela prata, porém os resultados não foram muito satisfatórios.

Para a localização das regiões organizadoras nucleolares em cromossomos mitóticos foram testadas modificações em todas as etapas do método, observando-se, quase sempre, uma grande inespecificidade de marcação nos cromossomos, apesar da reação ser sempre positiva nos nucléolos de núcleos interfásicos.

A princípio, quando era utilizado o método de HOWELL e BLACK (1980) sem modificações, o material observado apresentava intensa granulação ou a presença de precipitados. A presença desta precipitação ao longo dos cromossomos nos levava a pensar que possíveis marcações poderiam estar sendo encobertas. Este problema foi solucionado quando todas as etapas do método, do preparo das soluções à lavagem das lâminas, passaram a ser feitas com água deionizada. Além disso, a solução de prata passou a ser preparada no dia anterior ao seu uso. Com isso, foram solucionados os problemas de precipitação da prata sobre os cromossomos.

Contudo, notou-se que isto não estava relacionado com a inespecificidade de marcação e muitas outras modificações foram realizadas. Foram testados vários tempos de exposição a solução de nitrato de prata e temperaturas diferentes, variando de 5 minutos à 60°C em estufa até 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Com estes testes, na maioria das vezes para ambas as espécies, a reação se mostrava positiva para os nucléolos de núcleos interfásicos, porém nenhuma marcação nos cromossomos mitóticos era observada (Figs. 8 e 13). Algumas vezes

foi detectada uma marcação diferenciada das regiões centroméricas nos cromossomos mitóticos de *M. stabulans* (Fig.9). Poucas vezes foram percebidas regiões intercalares com coloração positiva nas duas espécies (Figs 7 e 12).

Também foi testado o método de BEDO e WEBB (1989) que envolve um tratamento com 2xSSC à 65°C ou à temperatura ambiente por mais tempo, e neste caso também foram observadas algumas bandas intercalares que aparentemente coincidem com a heterocromatina banda C-positiva. Porém o aparecimento destas marcações não foi constante.

O método de OLERT (1979) com modificações de BEDO (1986), onde a concentração da prata é aumentada, ou seja, pinga-se sobre a lâmina 1 gota de gelatina + ácido fórmico e 7 gotas de solução de prata, também foi testado. O método não mostrou-se eficiente para os cromossomos mitóticos, porém quando realizado em cromossomos meióticos pôde-se observar com clareza e constância uma marcação intercalar no cromossomo III de *H. irritans* (Fig. 14 e 15). Nos cromossomos meióticos de *M. stabulans* também aparece uma marcação intercalar no cromossomo II, porém nem sempre esta foi observada (Fig. 10).

6



7



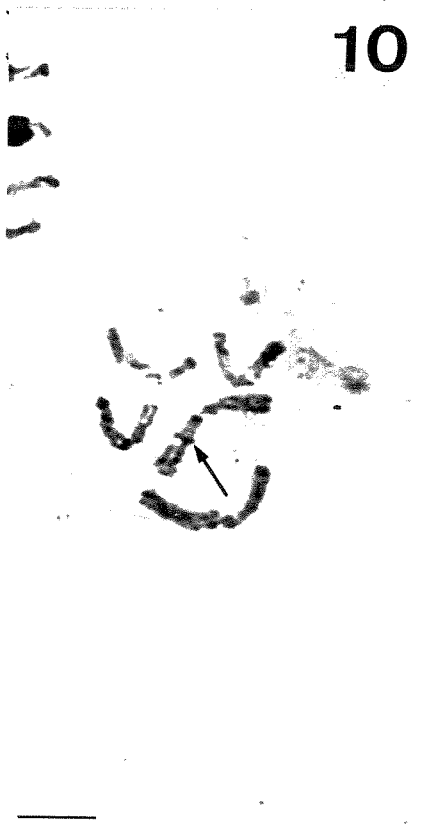
8



9



10



PRANCHA IV

Figura 11 : *Haematobia irritans*: célula de Gânglio cerebral corada com Giemsa.

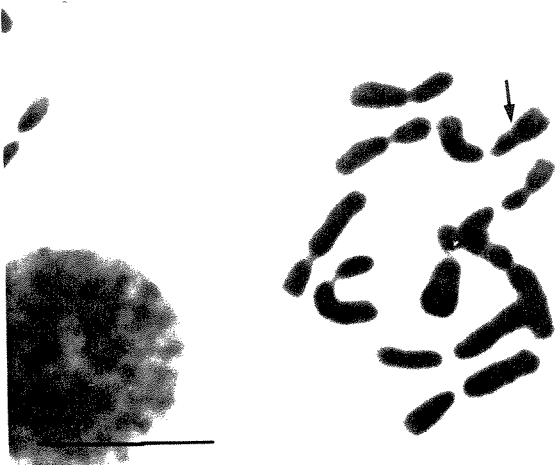
Figuras 12 a 15: (In)especificidade da reação de impregnação pela prata (AgNOR).

Figs. 11, 12 e 13: células de gânglio cerebral. Fig. 11: observar clara constrição secundária no par cromossômico II (setas). Figs. 12 e 13: marcação de nucléolos de núcleos interfásicos, porém sem marcação específica de NORs nos cromossomos. Fig. 12: placa metafásica incompleta. Banda intercalar inconstante (seta). Figs. 14 e 15: células de testículo: as setas mostram uma nítida banda NOR no cromossomo II. Barras: 5 μ m.

Figuras 16 e 17: *Haematobia irritans*: células de gânglio cerebral submetidas ao método de bandamento C. Observar fracas bandas heterocromáticas (setas). Barras: 5 μ m.

11

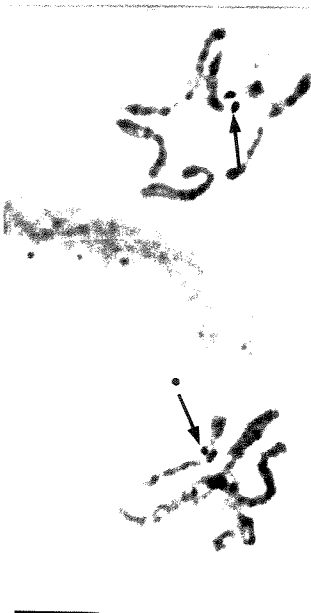
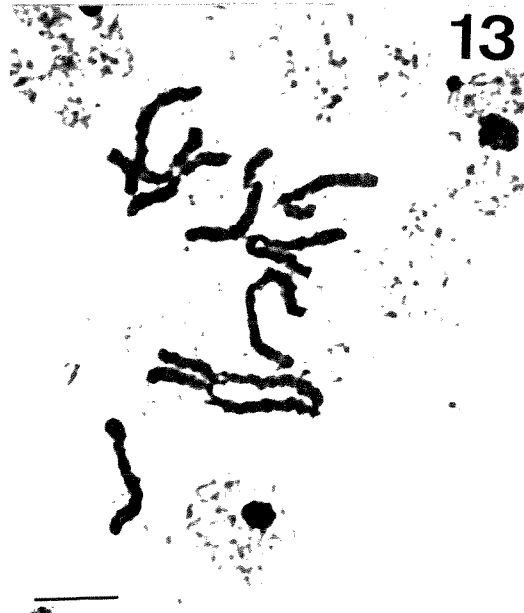
12



13

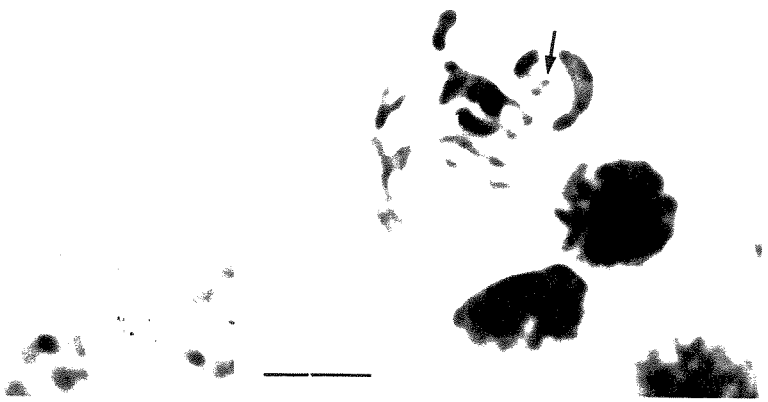
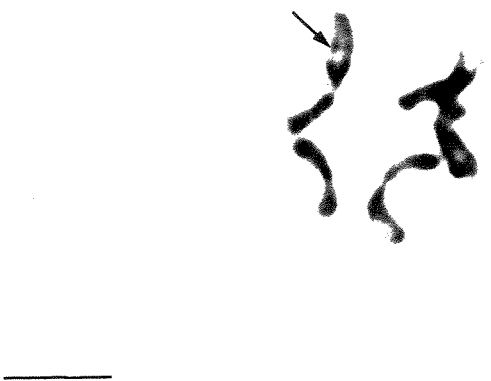
14

15



16

17



4. BANDA C

As metáfases provenientes de gânglios cerebrais de *Muscina stabulans*, submetidas a técnica para obtenção de bandas C, evidenciaram a ocorrência de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos do complemento, nas maioria das células analisadas. Adicionalmente, observou-se a ocorrência de bandas C na região de constrição secundária no braço curto do cromossomo II (Figs. 18, 19, 20 e 21).

Várias foram as modificações ao método de SUMNER (1972) para se chegar ao padrão de banda C para *Muscina stabulans* observado nas fotos da prancha 5.

O tratamento com HCl 1N por 15 minutos, seguido de incubação em solução saturada de Ba(OH)₂ à 60°C por 12 segundos e em 2xSSC à 60°C por 1 hora, forneceu os melhores resultados para evidenciar os segmentos de heterocromatina constitutiva. Parece haver coincidência física entre banda C e a constrição secundária constantemente visualizada no braço curto do cromossomo II.

Foram feitos vários testes para a localização da heterocromatina constitutiva por este método em testículo e tecido embrionário de *M. stabulans*, porém os resultados foram negativos.

Para a detecção da banda C em *H. irritans* foram realizadas também muitas modificações com relação a tempo, temperatura e concentração das soluções, mas os resultados não se mostraram tão responsivos como para *M. stabulans*.

Em nenhum dos testes com o método acima citado foi possível visualizar marcações centroméricas. Apenas uma fraca banda heterocromática pode ser vista em um dos pares cromossômicos, que aparentemente é o II (Figs.16 e 17). Esta

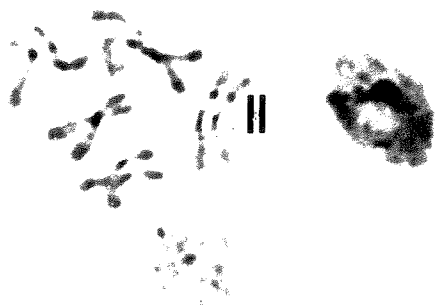
banda foi observada quando o material não era tratado com HCl e a incubação em Ba(OH)₂ 5% era feita por 8 minutos em temperatura ambiente, seguida de incubação por 1 hora em 2xSSC.

PRANCHA V

Figuras 18 a 21: *Muscina stabulans*: bandamento C (gânglio cerebral). Figuras 18 e 19: regiões centroméricas marcadas. Figs. 20 e 21: marcação intercalar no cromossomo II (setas). Barras: 5 μ m.

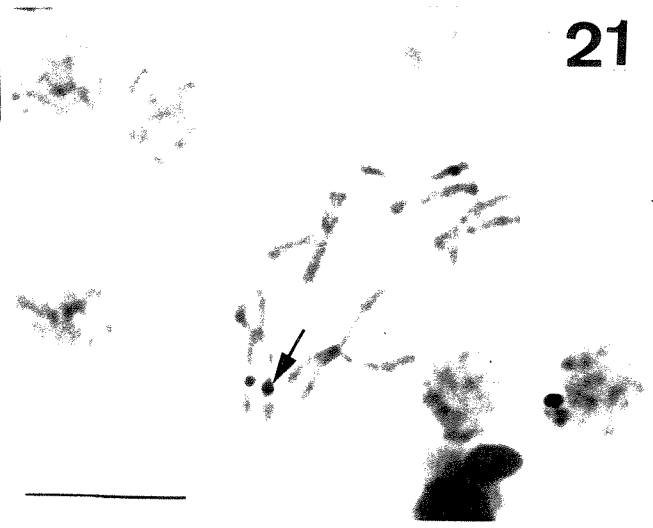
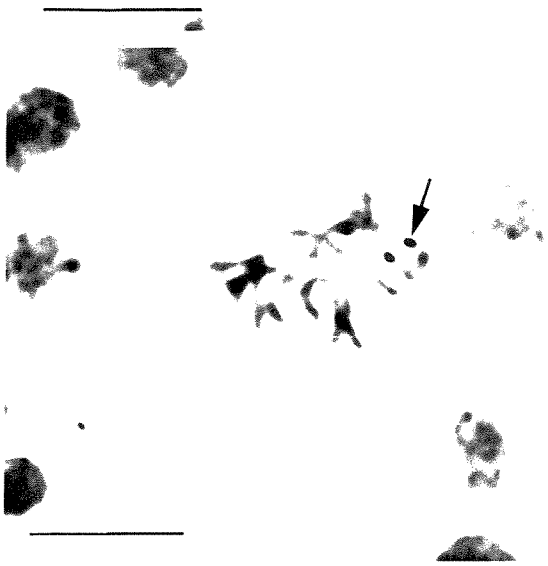
18

19



20

21



5. NÚCLEOS INTERFÁSICOS

Nas pranchas 6, 7 (*Muscina stabulans*) e 8 (*Haematobia irritans*) pode-se visualizar a reação positiva do nucléolo ao método Ag-NOR em diferentes tecidos.

As Figs. 22, 23, 30 e 31 mostram células de gânglio cerebral, onde se observa a presença de núcleos com um ou dois nucléolos. A presença de dois nucléolos foi observada com menor frequência em ambas as espécies como mostra a Tabela 4. A fig. 23 mostra um enorme nucléolo de uma célula politênica proveniente, provavelmente, de tecido gorduroso larval.

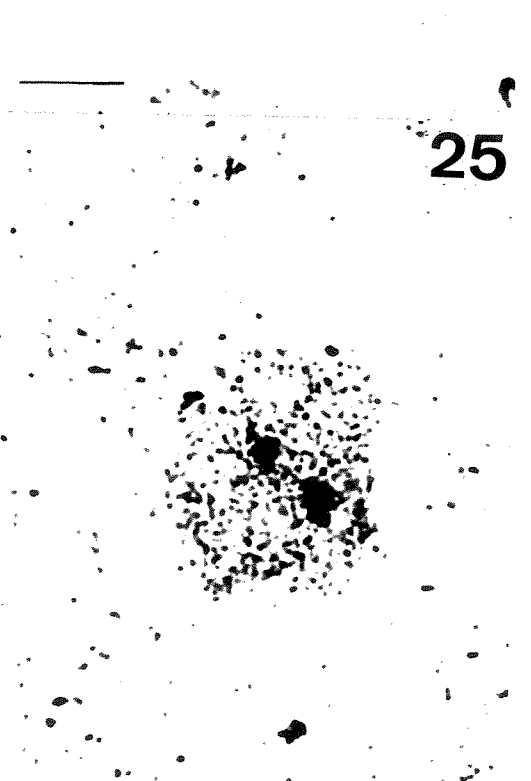
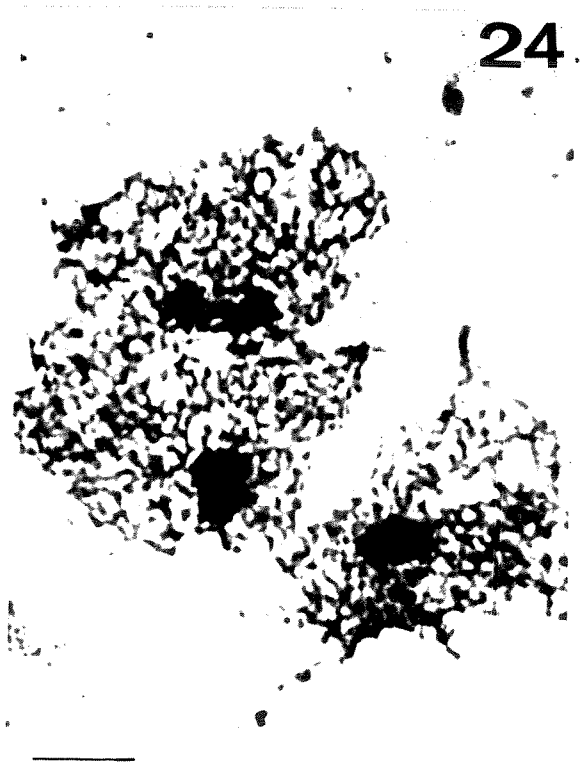
Em células do tecido embrionário de *M. stabulans* (Figs. 24 e 25) também são observados núcleos com 1 ou 2 nucléolos.

Nos núcleos interfásicos, observados em testículos de *M. stabulans*, é quase que impossível determinar-se se há células com um ou dois nucléolos, pois estes parecem se fragmentar ou se associar ao longo do desenvolvimento, ou seja, podem ser observados nucléolos intactos em algumas fases da espermatogênese (Fig. 28) e em outras estão totalmente fragmentados (Figs. 26, 27 e 29), chegando a se tornar apenas pontos espalhados pelo núcleo.

Essa possível fragmentação ou associação dos nucléolos não é observada nas células testiculares de *H. irritans*. Pode-se observar nestas células formas nucleolares diferentes, que talvez estejam relacionadas aos diferentes estágios da espermatogênese (Fig. 31).

PRANCHA VI

Figuras 22 a 25: *Muscina stabulans*: Variação no número e forma dos nucléolos nos núcleos interfásicos (Impregnação por prata). Figs. 22 e 23: células de gânglio cerebral. Fig. 22 notar a presença de um ou dois nucléolos (setas). Fig. 23: núcleo politênico. Figs. 24 e 25: núcleos provenientes de tecido embrionário. Barras: 5 μ m.



PRANCHA VII

Figuras 26 a 29: *Muscina stabulans*: Nucléolos múltiplos em células testiculares (impregnação por prata). Barras: 5 μ m.

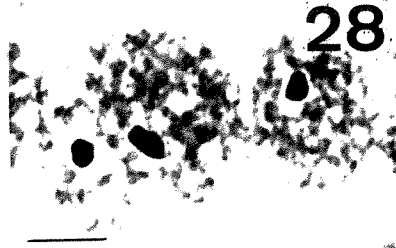
26



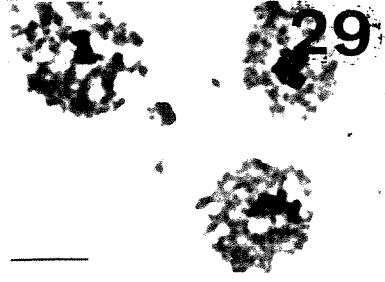
27



28

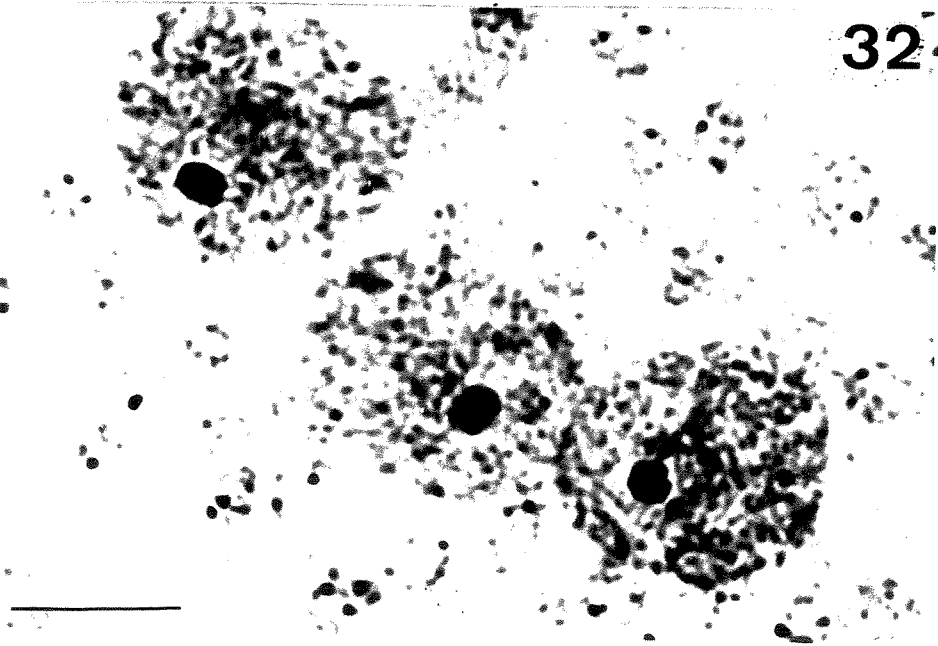
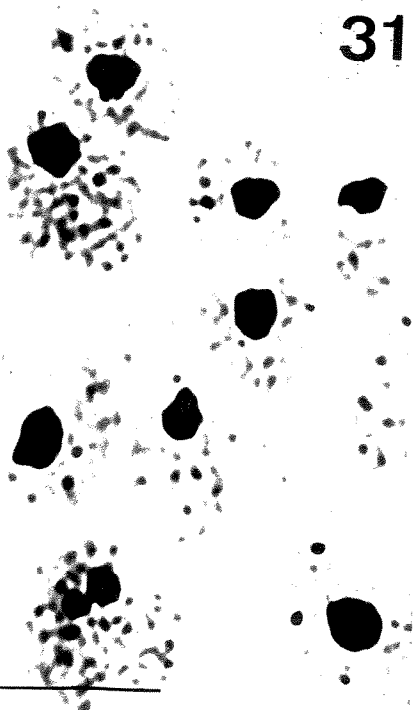


29



PRANCHA VIII

Figuras 30 a 32: *Haematobia irritans*: Variação do número e forma dos nucléolos. Impregnação pela prata (AgNOR). Figs. 30 e 31: núcleos interfásicos de gânglio cerebral. Presença de um ou dois nucléolos. Fig. 32: núcleos interfásicos de testículos; Barras: 5 μ m.



<i>Haematobia irritans</i>	Gânglios nervosos	Testículos
1 nucléolo	93,43%	93,56%
2 nucléolos	6,56%	6,43%
n	700	500

<i>Muscina stabulans</i>	Gânglios nervosos	Tecido embrionário
1 nucléolo	92,78%	87,03%
2 nucléolos	7,21%	12,96%
n	500	200

Tabela 4: Porcentagem de células com um ou dois nucléolos em diferentes tecidos de *H. irritans* e *M. stabulans*.

6. ÁREAS AgNOR POSITIVAS E RIBONUCLEOPROTEÍCAS EM CÉLULAS POLITÊNICAS DE *Muscina stabulans*

O resultado das comparações das áreas nucleolares submetidas a impregnação pelo íon prata e pelo método modificado de CEC (MELLO *et al.*, 1993), está representado na Tabela 5 e nas Figs. 33 e 34.

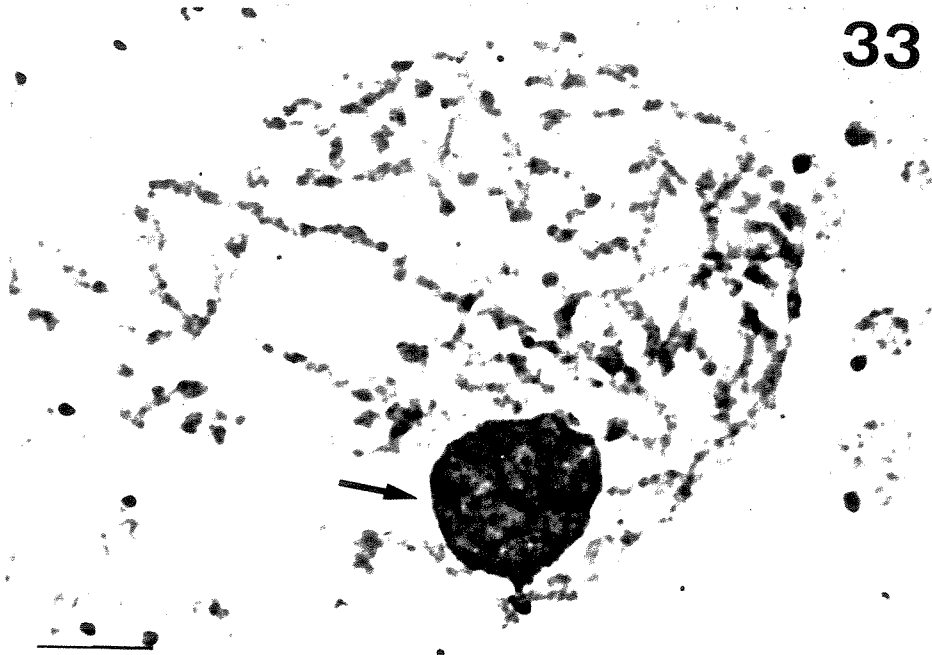
Pode-se perceber claramente pelos valores da Tabela 5 que a média das áreas nucleolares AgNOR positivas é significativamente maior do que a média das áreas nucleolares evidenciadas pelo método de CEC. Isto foi confirmado pelo teste estatístico de Mann-Whitney ($U=299,50$; $P= 0,007$).

Observa-se também que à medida que as áreas nucleolares aumentam, a espessura dos cromossomos politênicos é relativamente maior dentro de cada método.

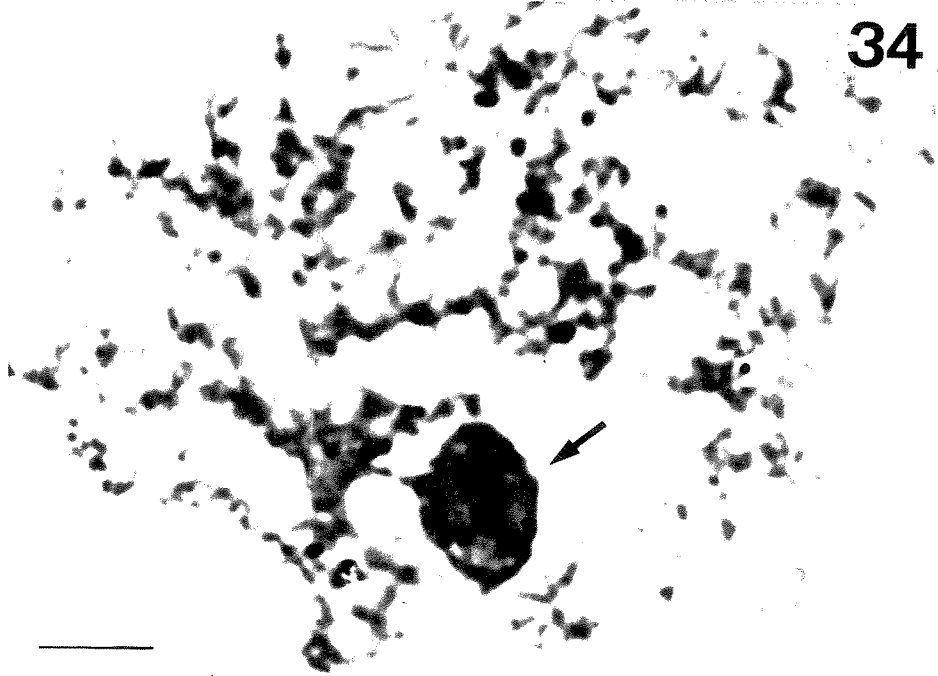
Através da análise dos valores obtidos representados no gráfico (Fig. 35) pode-se perceber que apesar das áreas nucleolares apresentarem grande variação entre os dois métodos e a espessura dos cromossomos aumentar conforme o aumento do nucléolo para cada método, as espessuras cromossômicas não variam entre os métodos. Este dado também foi confirmado por testes estatísticos que demonstraram resultado não significativo ($U=245$; $P=0,12$).

PRANCHA IX

Figuras 33 e 34: Cromossomos politênicos de larvas L3 de *M. stabulans* submetidos aos métodos: Fig. 33: impregnação por prata (AgNOR) e Fig. 34: CEC para evidenciação de RNA. Nucléolos evidenciados (setas). Barras: 5 μ m.



33



34

CEC

Espessura dos cromossomos	\bar{x} das áreas nucleolares
2,0	393,25
2,5	394,33
3,0	484,9
4,0	737,0

NOR

Espessura dos cromossomos	\bar{x} das áreas nucleolares
2,0	259,5
2,5	411,0
3,0	827,0
3,5	930,0
4,0	1580,0
5,0	2708,0

Tabela 5: Média das áreas nucleolares após os métodos CEC e AgNOR e respectivas espessuras dos cromossomos em células politênicas de *M. stabulans*.

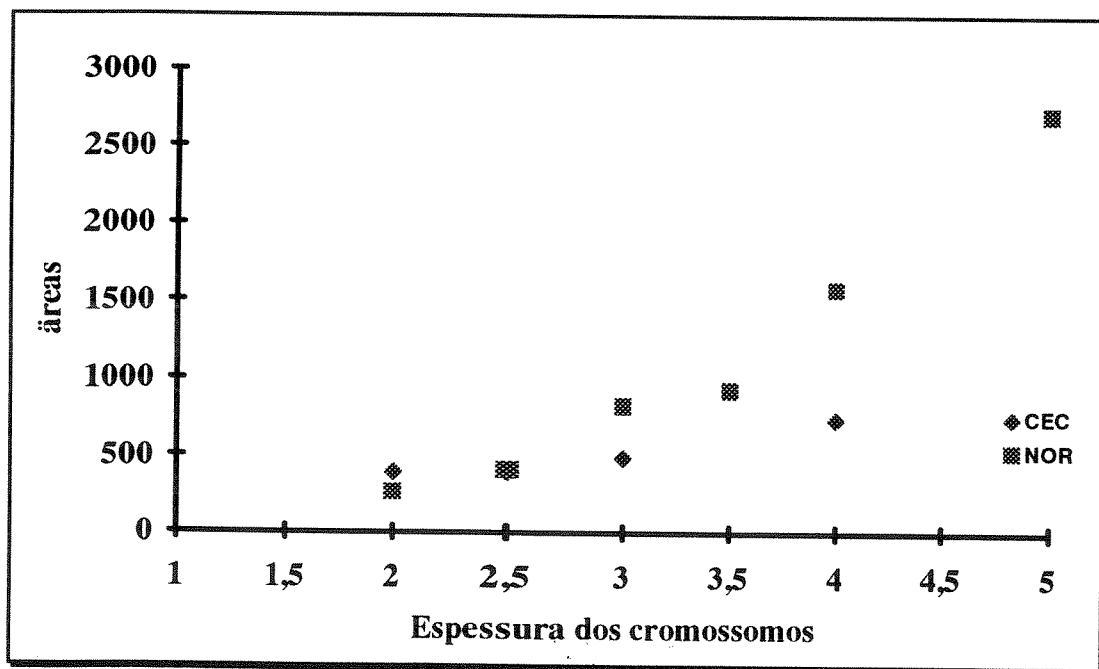


Figura 35: Representação gráfica comparando os valores das áreas nucleolares CEC e AgNOR, e respectivas espessuras dos cromossomos.

DISCUSSÃO

1. Cariótipo

BOYES e colaboradores (1964) descreveram os cromossomos de *Muscina stabulans*, porém não os caracterizaram totalmente. Estes autores identificaram os cromossomos com base no comprimento total, descrevendo qual cromossomo é maior ou menor em relação aos outros e o quanto varia a razão de braços entre eles, sendo estes dados semelhantes aos encontrados em nossos estudos. Contudo, apesar desses autores mostrarem tabelas contendo a porcentagem de cada par em relação ao comprimento total (TCL) e as razões de braços de cada um, não indicam a classificação dos cromossomos, ou seja, apenas eles dizem que os pares I e III são metacêntricos, sem mencionar a classificação dos outros pares ou mesmo em qual autor se basearam para fazer a classificação dos pares I e III.

Desta forma, a comparação dos estudos do cariótipo de *M. stabulans* feita por BOYES e colaboradores (1964) com os nossos, torna-se dificultada, pois sabe-se que diferentes autores propõem classificações diferentes, podendo algumas vezes mostrar resultados contraditórios, como é o caso do par III que em nossos estudos segundo a classificação de LEVAN e colaboradores (1964) é metacêntrico, mas que segundo a classificação de VOLPE & GEBHART (1968) é submetacêntrico.

BOYES e colaboradores (1964) observaram duas constrições secundárias no braço curto do cromossomo I e uma no braço longo do cromossomo II. O número de constrições nestes cromossomos foi o mesmo encontrado por nós, porém em nosso material a localização das constrições não coincide com a descrição desses autores. Além destas, BOYES e colaboradores (1964) observaram constrição no braço longo do cromossomo I e no braço longo dos cromossomos III, IV e V. Nestes 3 últimos, a frequência com que aparecem nos indivíduos de acordo com BOYES e

colaboradores (1964) é muito pequena. Desta maneira, não se pode afirmar a presença destas constrições.

Talvez a fase da mitose e a compactação dos cromossomos estejam influenciando na visualização destas constrições, ou seja, os cromossomos poderiam estar muito distendidos, confundindo os autores acima, ou muito compactados nos cromossomos por nós analisados, dificultando assim a visualização de outras constrições. No entanto, julgamos que observamos número suficiente de figuras metafásicas para confirmar a existência das três constrições descritas nos resultados.

Os cromossomos de *H. irritans* foram analisados por LaCHANCE (1964), que observou dez cromossomos em metáfases de gânglio cerebral e testículo, mas não descreveu o cariótipo. Baseado apenas na aparência das figuras, o autor observou que quatro pares tinham centrômeros com localização mediana e um, centrômero subterminal. Nenhuma constrição secundária foi por ele observada.

AVANCINI & WEINZIERL (1994) descreveram o cariótipo de *H. irritans* e, diferentemente do que LaCHANCE tinha descrito, mostraram através das medidas encontradas que os pares I, II e V são metacêntricos e os pares III e IV são submetacêntricos.

O cariótipo foi novamente confeccionado em nossos estudos para se conhecer se havia alguma variabilidade a este nível entre as populações do Brasil e aquela dos EUA, estudada por AVANCINI & WEINZIERL (1994) e LaCHANCE (1964). Contudo, nenhuma variação foi encontrada a este nível, já que as medidas e classificação foram compatíveis.

A constrição secundária claramente observada por nós no par II não foi anteriormente mencionada por qualquer dos autores acima referidos.

LaCHANCE (1964) chamou a atenção para um pronunciado "estiramento" observado constantemente na região do centrômero durante o final de prófase e início de metáfase. O autor observa este fenômeno apenas em alguns cromossomos e sugere que esta ruptura possa dar a impressão de estarem presente mais de cinco pares de cromossomos, ou que um par de heterocromossomos (XY) esteja presente.

Este estiramento na área centromérica foi por nós também observado, porém em todos os cromossomos, ficando assim arriscado sugerir a presença de algum heteromorfismo.

A inexistência de heteromorfismo cromossômico nas espécies estudadas levou-nos à interpretação de que o par ausente seria o sexual; esta interpretação baseou-se nos dados discutidos abaixo e também no item 3 (banda C).

A maioria das espécies da família Muscidae, como *Musca domestica*, *Musca autumnalis* e *Musca sorbens*, possui 6 pares de cromossomos, sendo um deles o par sexual e é heteromórfico (BOYES *et al.*, 1964). BOYES e colaboradores (1964) estudaram o cariótipo de várias espécies da família Muscidae e encontraram que *Muscina stabulans*, assim como as espécies *Orthelia nudissima* e *Phaonia variegata* possuem apenas 5 pares de cromossomos. O par sexual não foi observado nestas três espécies.

Sabe-se que há uma surpreendente variação no que diz respeito à morfologia e à presença ou não de cromossomos sexuais dentro da subfamília Muscinae. Entre subespécies de *Musca domestica* há grande variação nos tamanhos e razão de braços dos cromossomos X e Y, enquanto que em *Orthelia nudissima*, que apresenta $2n=10$ e também pertence a esta subfamília, não foi observado o par sexual (BOYES *et al.*, 1964).

BOYES e colaboradores (1964) relatam uma situação semelhante na subfamília Phaoninae, onde *Phaonia basalis* tem um par sexual bastante grande, *Ophyra leucostoma* tem um minúsculo par sexual e *Muscina stabulans* e *Phaonia variegata* perderam o par XY presente nas espécies com 12 cromossomos. É necessário lembrar que Metz (1916) indicou claramente que sua coleção de *M. stabulans* tinha 12 cromossomos.

Os cariótipos das espécies com 10 cromossomos estudados por BOYES e colaboradores (1964) *Orthelia nudissima* e *Phaonia variegata*, e por nós, *Muscina stabulans* e *Haematobia irritans*, mostram diferenças nos tamanhos dos cromossomos e na presença ou não de constrições secundárias. Estas diferenças são suficientes para indicar que estas quatro não são espécies muito próximas.

As variações notadas com respeito ao tamanho dos cromossomos sexuais em todas as subfamílias de Muscidae sugerem que muitas mudanças nos cromossomos sexuais podem ser toleradas pelas espécies na maioria destas subfamílias sem que ocorram consequências sérias. BOYES e colaboradores (1964) sugerem que uma vez que cromossomos sexuais pequenos tenham sido encontrados em muitas das subfamílias, eles (os cromossomos sexuais) podem representar a condição mais primitiva de Muscidae. Desta forma, pode-se supor que as espécies por nós estudadas, estariam dentre as espécies consideradas mais evoluídas dentro do grupo, por não apresentar cromossomos sexuais.

A presença das constrições secundárias também pode sugerir alguma explicação para a ocorrência destas espécies exceções, com $2n=10$, sem par sexual. Existe uma espécie de formiga, *Myrmecia pilosula*, que apesar de ser de um grupo distante de Diptera, pode ser citada como exemplo. Esta espécie, citologicamente heterogênea, envolve colônias com $2n=9$, 10, 31 e 32 cromossomos. Foram

encontradas colônias com apenas um cromossomo (cariótipo homomórfico) e, neste existem duas constrições secundárias em um dos braços, semelhantes àquelas observadas no par I de *M. stabulans*. IMAI e colaboradores (1989) sugerem que a origem deste cromossomo único nesta espécie de formiga poderia ter sido uma fusão de cromossomos e que nas constrições estariam presentes centrômeros inativados, após uma fusão telomérica.

Futuros estudos do cariótipo com técnicas de bandamento em outras espécies de muscoideos poderão revelar a natureza da redução no número de cromossomos de 12 para 10.

2. NOR

No estudo da localização física de NORs de *M. stabulans* e *H. irritans* foi utilizado o método de impregnação pela prata, porém os resultados para cromossomos mitóticos não foram satisfatórios. Este método é hoje aceito como modelo para marcação de NORs, mostrando resultados positivos para vertebrados e invertebrados (HOWELL, 1977; CZAKER, 1978).

As marcações centroméricas, teloméricas e intercalares observadas nas duas espécies não necessariamente representam NORs, podendo ser resultado de falta de especificidade do método para cromossomos mitóticos de insetos, uma vez que não se tem uma observação constante destas marcações.

HAGELE e RANGANATH (1983) também obtiveram resultados não satisfatórios quando tentavam localizar NORs em cromossomos metafásicos de *Drosophila nasuta nasuta* e *Drosophila nasuta albomicans*. Chegaram à conclusão

que a localização e número de NORs em ambas as subespécies era incerta, pois tanto a técnica de bandamento N (MATSUI & SASAKI, 1973) como o método de GOODPASTURE e BLOOM (1975) eram falhos para demonstrá-las nestas espécies.

Sabe-se que em vertebrados existem proteínas associadas a NOR semelhantes às de invertebrados. A principal diferença entre elas, que impede que haja especificidade à impregnação por prata, poderia estar na diferença existente entre os domínios acídicos da porção amino-terminal destas proteínas que de certa forma alteraria o pI dos sítios redutores dessas proteínas. Por exemplo, considerando que os blocos de aminoácidos acídicos da nucleolina sejam responsáveis pela reação em células de mamíferos, pode-se supor que em invertebrados a mesma proteína possua diferentes blocos acídicos ou que as condições do método não seriam específicas para proteínas Ag-NOR de insetos (D. HERNANDEZ-VERDUM, comunicação pessoal). Esta pesquisadora sugeriu utilizar uma solução de prata com pH diferente do utilizado para mamíferos, onde o ideal é 5,2.

Foram realizados testes com diferentes pH e os resultados se mostraram novamente negativos para cromossomos mitóticos. Contudo, quando cromossomos meióticos foram submetidos a uma solução com pH aumentado, a resposta foi positiva para os cromossomos de *H. irritans*, onde foi possível observar uma banda intercalar nítida no cromossomo III. Esta banda já tinha sido detectada no mesmo cromossomo por AVANCINI & WEINZIERL (1994). Desta forma, apesar de visualizarmos a marcação em cromossomos meióticos, continuam nossas dúvidas sobre o motivo da inespecificidade do método para cromossomos mitóticos de dípteros.

Sabe-se que a marcação de NORs pela prata reflete a atividade de genes rRNA e não simplesmente a existência destes genes. O método AgNOR nem sempre marca sítios de rDNA; somente marca aqueles sítios que estão transcricionalmente ativos ou que tenham sido transcritos e ainda apresentem rRNA associado a proteínas ao redor dos cistrons rDNA condensados (HOWELL, 1977). Portanto, a não visualização de NORs, ou seja, a ausência da marcação de NORs pela prata, pode significar que cistrons de rDNA não transcreveram e, portanto, o rRNA não está associado, nestes sítios, à proteínas que reagem com a prata. Isto pode explicar o insucesso da marcação pela prata em alguns tecidos ou mesmo em algumas metáfases, como por exemplo nas metáfases meióticas de *M. stabulans* onde a marcação pela prata em um dos pares de cromossomos nem sempre é visualizada. Casos semelhantes foram também observados por CZAKER (1978) em gafanhotos, onde poucas marcações foram vistas em muitas das metáfases espermatogoniais analisadas e, por OUD e REUTLINGER (1981) que só casualmente observaram marcações em metáfases espermatogoniais de camundongos. NORs muito pequenas ou com baixa atividade, por esta razão, não são facilmente detectadas pelo método de impregnação pela prata. Além disso, como o número de NORs registradas por este método está relacionado com NORs ativas, parece depender particularmente das exigências metabólicas das células (FLAVELL & MARTINI, 1982).

Estas observações são bastante questionadas quando autores descrevem que o componente fibrilar de nucléolos é marcado pela prata por conter cistrons ribossomais transcricionalmente ativos, enquanto que o centro fibrilar e NORs de cromossomos metafásicos são transcricionalmente inativos (HSU *et al.*, 1965; GOESSENS & LEPOINT, 1979; RISUENO *et al.*, 1982). Desta forma, a existência de estruturas inativas e ao mesmo tempo marcadas pela prata, nos faz questionar a

correlação entre marcação pela prata e atividade transcricional nucleolar, assumida por muitos autores (MEDINA *et al.*, 1983).

Tem sido sugerido há muitos anos que constrições secundárias de cromossomos estão frequentemente associadas ao nucléolo (HSU *et al.*, 1975). Estes autores estudaram a distribuição dos genes ribossomais 18+28S em diferentes espécies de mamíferos e observaram relação entre constrições secundárias e sítios de rDNA na maioria das espécies estudadas, embora esta generalização mostre algumas exceções. Esta observação foi confirmada por RUIZ (1982) que, estudando algumas espécies de anfíbios, afirmou que estas regiões são geralmente distinguidas no cariótipo como regiões de constrição secundária, embora nem sempre estas possuam genes rDNA e, inversamente, nem sempre rDNAs se localizam em regiões de constrições secundárias. Estas regiões podem estar sendo confundidas com regiões de heterocromatina constitutiva, uma vez que estas estão em alguns casos, também associadas à constrições secundárias. Estas suposições somente poderão ser confirmadas através do método de hibridização *in situ*.

A marcação pela prata tem mostrado ser bastante utilizada nos estudos da atividade nucleolar durante a gametogênese. Na espermatogênese de mamíferos e outros vertebrados (SCHMID *et al.*, 1982), a marcação de NORs pela prata ocorre durante a prófase meiótica até o final de paquíteno. A marcação é ausente então, da diacinese, metáfase I até metáfase II, reaparecendo nas espermátides. Tem sido sugerido que a perda da demonstração de AgNORs é a indicação de declínio na atividade de síntese do rRNA (PATHAK & HSU, 1979; SCHMID *et al.*, 1982).

Contudo, isto não parece ser válido para casos de invertebrados. São conhecidos apenas algumas exceções em insetos, como a da espécie *Arcyptera fusca* (Orthoptera), onde nucléolos e micronúcleolos são descritos até a fase de paquíteno,

sendo desorganizados somente nos estágios mais avançados (GOSALVEZ *et al.*, 1986). Também em outras espécies de gafanhotos não foi observada marcação nucleolar nos estágios de diacinese a metáfase II (RUFAS & GOSALVEZ, 1982; CAMACHO *et al.*, 1985).

SUJA e RUFAS (1987) demonstraram ainda em gafanhotos que, existem dois ciclos nucleolares unidos com as divisões meióticas que são semelhantes àquelas descritas para meiose de plantas (LOIDL & GREILHUBER, 1983), ou seja, existem NORs primárias que são ativas em toda a prófase em todos os indivíduos e NORs secundárias que são ativas somente ocasionalmente.

Na literatura disponível não foram encontradas descrições da localização de NORs nas espécies de muscóideos para uma possível comparação com as espécies por nós estudadas. Pode-se supor um mecanismo parecido ao que acontece em gafanhotos e outros insetos, uma vez que em *H. irritans* foi observada uma nítida NOR nos cromossomos que estavam em metáfase meiótica e em *M. stabulans* na mesma fase, a presença da marcação não foi constante. Outra consideração interessante é que em muitas espécies de dípteros como *Drosophila melanogaster*, *Drosophila hydei*, *Ceratitis capitata*, *Sciara ocellaris*, algumas espécies de *Musca* e outras, a região organizadora nucleolar foi localizada junto aos cromossomos sexuais. Desta forma, uma vez que nas espécies por nós estudadas o par sexual não é observado, poderia se pensar em alguma relação entre o local onde as NORs se encontram com uma possível fusão de cromossomos ou local de determinação do sexo.

3. Banda C

Há muitos anos, o bandamento C tem sido frequentemente utilizado como um meio para estudos de variações e distribuição de heterocromatina nos cromossomos de espécies relacionadas e tem fornecido informações valiosas na interpretação de diferenças cariotípicas.

Através dos resultados apresentados aqui para *M. stabulans* e *H. irritans* pode-se perceber que diferentes padrões de bandas aparecem para cada espécie. No padrão observado para *M. stabulans*, por exemplo, algumas vezes o método se mostra positivo somente nas regiões centroméricas e em outras somente as intercalares aparecem.

Admite-se que variações nos resultados podem ocorrer para um mesmo material, em uma mesma lâmina, quando submetidos a um determinado método de banda C, em função do grau de compactação dos cromossomos e fase da mitose (SUMNER, 1972). A condensação cromossômica pode ocasionar uma perda de resolução de banda C ou, por outro lado, reunir bandas C intimamente associadas (JOHN & MIKLOS, 1979). Em certos casos, regiões contendo heterocromatina constitutiva em diferentes espécies requerem condições de tratamento diferente para evidenciar a heterocromatina, como também diferentes tratamentos numa única espécie podem ocasionar diferenças pronunciadas no padrão de banda C (SCHMID, 1978). Como discutido por PIMPINELLI e colaboradores (1976), o tratamento com a base (NaOH ou Ba(OH)₂), que deve ser aumentado conforme a idade da lâmina, tem grande importância na técnica para obtenção de banda C. Se este passo crítico não for feito corretamente, tanto metáfases sem marcação positiva como metáfases com alterações na morfologia cromossômica poderão ser obtidas.

Os cromossomos de *Musca domestica* mostram um modelo de bandamento C contendo fortes marcações em ambos os lados da constrição centromérica. Estas bandas procêntricas são muito sensíveis a variações no procedimento de bandamento C, mostrando frequentemente marcações mais claras nos autossomos ou mostrando marcação em apenas um dos lados do centrômero. Este fenômeno foi também observado por BEDO (1980) na espécie *Lucilia cuprina* (Calliphoridae).

Nas Figuras 18 e 19, pode-se perceber claramente que ocorre uma coloração diferencial dos centrômeros que estão nitidamente marcados. Neste caso, não foram utilizados diferentes tratamentos, mas pode ter ocorrido alguma variação na temperatura de incubação em bário, ou mesmo da temperatura ambiente em outras etapas o que pode ter afetado a marcação dos centrômeros nas metáfases apresentadas nas Figuras 20 e 21. Esta também pode ser uma explicação para *H. irritans* onde em nenhum momento foram visualizadas marcações centroméricas.

O padrão de bandas encontrado em nossos estudos é comum entre os dípteros, incluindo espécies de Calliphoridae (AZEREDO-ESPIN, 1982), Simuliidae (BEDO, 1975), Sarcophagidae (KAUL *et al.*, 1978), Drosophilidae (ABRAHAM *et al.*, 1983), em que as bandas localizam-se principalmente nas regiões centroméricas e com menor frequência também em regiões cromossômicas intersticiais e teloméricas.

Comparações entre os resultados de banda C obtidos para os cromossomos das espécies analisadas com os de outras espécies de Muscidae, bem como com os de outros dípteros, torna-se uma tarefa difícil devido às diferenças na metodologia adotada pelos diferentes autores.

Em *M. stabulans*, as figuras da prancha V mostram uma relação entre banda C e a constrição secundária, constantemente visualizada no braço curto do

cromossomo II, embora, como muito bem revisado por MELLO (1978), nem sempre constrições, secundárias representem regiões de heterocromatina constitutiva.

ULLERICH (1976), analisando cromossomos de dípteros também sugeriu a existência de uma relação entre a banda C intersticial com uma constrição secundária geralmente observada nesta região cromossômica. Isto já foi observado em *Chrysomya putoria* (ULLERICH, 1976), *Gryllus argentinus* (DRETS & STALL, 1974), no gafanhoto *Atractomorpha similis* (KING & JOHN, 1980) e em algumas espécies de anfíbios do gênero *Litoria* (KING, 1980). Nestes casos, quando a banda C está associada à constrição secundária, a heterocromatina intersticial pode ocupar o espaço correspondente à constrição em si, estar em torno da constrição ou ocupar quase que a totalidade de um braço cromossômico (KING, 1980).

Como já discutido, existem alguns casos onde NORs também são observadas nas regiões de constrições secundárias e, portanto, banda C, NOR e constrição secundária estariam coincidindo. Fica, assim, difícil decidir quem está presente junto às constrições, se estão juntas ou mesmo lado a lado. Neste caso, é bastante usado o método onde é feita uma combinação entre os métodos de bandamento C e de impregnação pela prata (TUCK-MILLER *et al.*, 1984). Outra maneira, ainda mais precisa seria a técnica de hibridização *in situ*, com sondas específicas de cada sequência que se quisesse identificar.

A análise do padrão de banda C nos cromossomos mitóticos de *M. stabulans* e *H. irritans*, ao lado do número e da morfologia cromossômica, poderão fornecer mais subsídios para os estudos citotaxonômicos do grupo de insetos ao qual pertencem estas espécies.

Um outro ponto interessante nas espécies por nós estudadas é com relação ao par sexual. As espécies estudadas neste trabalho não apresentam heteromorfismo em

qualquer dos cinco pares ao nível citológico. Não foi detectada diferença na morfologia dos cromossomos, ou seja, nos tamanhos ou razões de braços e nos padrões de bandamentos. Sabe-se que em várias espécies de moscas, incluindo *Musca domestica* (EL AGOSE, 1992), *Chrysomya bezziana* (BEDO, 1991), espécies do gênero *Parasarcophaga* (KAUL *et al.*, 1978), várias espécies de *Drosophila*, bem como espécies de mosquitos, como *Aedes aegypti* (WALLACE & NEWTON, 1987), *Anopheles atroparvus* e *Anopheles labranchiae* (MARCHI & MEZZANOTTE, 1990), os cromossomos sexuais apresentam regiões, braços ou mesmo cromossomos inteiros, heterocromáticos. Como tal situação não foi por nós encontrada além da existência destes dados da literatura, pode-se propor a ausência de par sexual nestas espécies. Neste caso o(s) gene(s) para determinação do sexo estaria(m) espalhado(s) pelo(s) pare(s) (autossômico(s)).

Se a hipótese de fusão de cromossomos for a correta, a presença das bandas centroméricas ou mesmo das intersticiais, poderia ajudar na investigação e tal hipótese, através de estudos detalhados dentro deste grupo de Diptera.

4. Núcleos interfásicos

Número, tamanho, forma e detalhes estruturais do nucléolo podem variar amplamente conforme o organismo, tipo celular e estado fisiológico da célula (GOESSENS, 1979; HOWELL, 1975). Nas células com um alto grau de produção de ribossomos, os nucléolos são grandes e complexos enquanto nas células com baixa atividade são, na maioria dos casos, pequenos e de estrutura simples (SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993). Portanto, uma diminuição no tamanho do nucléolo pode ser correlacionada com um declínio na sua função (GOESSENS, 1979).

Através dos resultados do nosso trabalho, pode-se perceber que há diferença nos tamanhos nucleolares entre os diferentes tecidos de *M. stabulans* e *H. irritans*. Nas células de gânglio cerebral, por exemplo, onde estão presentes células com baixa atividade na fase larval estudada, os nucléolos são menores. Já nas células testiculares e do tecido embrionário, que estão em intensa atividade de diferenciação, os nucléolos são relativamente maiores. Quando as células politênicas são analisadas, pode-se perceber nucléolos enormes. Estas células politênicas provavelmente são provenientes do tecido gorduroso que de alguma forma aparecem durante o esmagamento de gânglio cerebral. Considerando-se que as larvas nesta fase estavam em um estágio de pré-pupa e conseqüentemente, em intensa síntese, pode-se supor que há aumento nucleolar com o aumento da atividade celular.

HEITZ (1931) concluiu que o número de nucléolos que aparece na telófase é sempre constante e característico das espécies, assim como o número de cromossomos. Isto foi confirmado por experimentos feitos com fibroblasto de galinhas cultivados "in vitro" e em células tumorais Ehrlich. Foi observado que o

número de nucléolos não varia durante a intérfase, mas o número total de nucléolos que aparece nas células filhas no estágio de telófase, é normalmente duas vezes menor que nas células mães.

Contudo, a fusão de nucléolos poderá ocorrer anteriormente, na telófase. Então, o número de nucléolos pode ser menor que o número de NORs, devido a uma marcada tendência para os nucléolos se fundirem.

ANASTASSOVA-KRISTEVA (1977) encontrou que em várias células humanas em cultura, o número de nucléolos por núcleo varia de acordo com o estágio do ciclo celular. No final da mitose e início de G1, múltiplos nucléolos existem. Os nucléolos fundem-se gradualmente e no início de S há somente um nucléolo por núcleo.

A fusão nucleolar também foi demonstrada em células binucleadas de *Allium cepa* por GHOSH (1976). SCHWARZACHER e WACHTLER (1993) confirmaram que em células com longa intérfase e uma alta taxa de atividade de síntese ribossomal, os nucléolos têm uma tendência em fundir-se. Estas características talvez possam explicar a presença de um ou dois nucléolos em nosso material.

Pode-se observar que na maioria das células aqui analisadas, os nucléolos se encontram mais próximos à periferia do núcleo. Esta localização preferencial do nucléolo, perto do envoltório nuclear ou em contato direto com este, tem sido observada em diferentes tipos de células de animais e vegetais (BOURGEOUS *et al.* 1982; BOURGEOUS & HUBERT, 1988), especialmente naquelas com grande demanda de ribossomos, tais como células se dividindo ou se regenerando rapidamente. A posição periférica do nucléolo tem sido afirmada ser em parte uma consequência da posição das NORs no núcleo e em parte, a expressão de um

transporte facilitado de pré-ribossomos para o citoplasma (BOURGEOUS & HUBERT, 1988). Contudo, estas afirmações têm sido ainda muito questionadas.

Nos núcleos interfásicos das células testiculares de *M. stabulans* pode-se observar uma progressiva fragmentação ou associação nucleolar. Este fenômeno parece que não foi ainda analisado para Diptera, ficando assim difícil discutirmos nossos dados. Os preparados mostram também nucléolos intactos, demonstrando que o estado fragmentado observado não é um artefato da metodologia.

Um processo de aumento do número de nucléolos foi observado em cromossomos politênicos de muitas espécies de dípteros. *Calliphora erythrocephala*, por exemplo, tem um único nucléolo grande em células tricógenas, mas nos núcleos politênicos de ovários existem múltiplos nucléolos extra cromossomais (RIBBERT & BIER, 1969). Estes múltiplos nucléolos representam uma amplificação da proporção diplóide de cópias de genes ribossomais (RENKAWITZ & KUNZ, 1975).

Este processo de fragmentação de nucléolos já foi notado em cromossomos politênicos de Sciaridae e de Rhynchosciaridae, onde um aumento da politenização resulta na ruptura do nucléolo em pequenos mininucléolos dispersos pelo núcleo (PARDUE *et al.*, 1970). Fenômeno semelhante ocorre nos cromossomos politênicos do quironomídeo *Pseudodiana branickii*, onde os nucléolos relacionados com os cromossomos são quebrados pela replicação de genes ribossomais (ZACHARIAS, 1984).

É interessante comentar que apesar destes modelos de fragmentação nucleolar tratarem de cromossomos politênicos, poderiam ser comparados com os do nosso estudo, pois nos dois casos as células estão em interfase e portanto, está ocorrendo transcrição.

5. CEC

A variante do método de CEC foi proposta para visualizar o nucléolo e suas mudanças estruturais ao nível da microscopia de luz, graças à diferente resposta ao método apresentado por RNA em comparação ao DNA (MELLO *et al.*, 1993). O uso desta variante nos nucléolos de células politênicas de *M. stabulans*, foi proposto com a intenção de se destacar as regiões ricas em ribonucleoproteínas e compará-las com as regiões AgNOR positivas, detectadas pelo método de impregnação pela prata, visando-se estabelecer uma relação que expressasse alguma particularidade funcional destas células quanto à atividade transcritiva de rDNA.

Contatou-se que a área AgNOR positiva é significativamente maior que a evidenciada pelo método de CEC.

Nossos dados mostram correlação positiva das áreas nucleolares com a espessura dos cromossomos politênicos dos mesmos núcleos, que poderiam estar representando alterações de politenia com o passar do desenvolvimento.

Através de análises estatísticas ficou claro que não há diferença significativa para espessura dos cromossomos entre os dois métodos, ou seja, isto demonstra que a idade da larva não está influenciando e que as espessuras e, portanto, o aumento da politenia não variam entre os dois métodos, apesar do aumento das áreas nucleolares. Isto mostra que realmente a área nucleolar foi demonstrada ser diferente em função dos métodos utilizados, ou seja, CEC e AgNOR reagem com conteúdos diferentes. Os métodos não evidenciam estruturas nos cromossomos e sim no nucléolo, já que houve aumento igual de espessura dos cromossomos nos dois métodos.

As diferenças nos valores de área entre proteínas AgNOR positivas e rRNA demonstram neste sistema em particular, maior conteúdo destas proteínas ocupando as áreas nucleolares. Parte das proteínas evidenciadas poderiam estar diretamente relacionadas à atividade transcritiva de rDNA ou representar uma forma de estoque, como discutido por SCHWARZACHER & WACHTLER (1993).

CONCLUSÕES

- A espécie *Muscina stabulans* apresenta cariótipo $2n=10$, sem par sexual, sendo os pares I, II, III e V metacêntricos e o par IV, submetacêntrico. Existem duas constrictões secundárias no braço longo do cromossomo I e uma no braço curto do cromossomo II.
- *Haematobia irritans* mostra um conjunto cromossômico com $2n=10$, também sem par sexual, sendo os pares I, II e V metacêntricos e os demais submetacêntricos. Apresenta uma constrictão secundária no braço curto do cromossomo II.
- O método de impregnação pela prata se mostrou inespecífico para cromossomos mitóticos das duas espécies, confirmando assim os raros dados da literatura para outros dípteros. Foi, no entanto, eficiente para nucléolos de núcleos interfásicos, detectando núcleos com um ou dois nucléolos, sendo estes últimos encontrados com menor frequência.
- Nos cromossomos meióticos das duas espécies o método de impregnação pela prata detectou marcação em um dos cromossomos: no par III de *H. irritans* e no par II de *M. stabulans*.
- A espécie *M. stabulans* apresenta banda C positiva nas regiões centroméricas de todos os pares, além de uma marcação intercalar no braço curto do cromossomo II, coincidindo com a região de constrictão secundária.
- Com a análise dos nucléolos de cromossomos politênicos através dos métodos AgNOR e CEC, pode-se supor que há maior quantidade de proteínas do que RNA sendo detectados. Desta forma, parte destas proteínas poderiam estar diretamente relacionadas à atividade transcritiva do rDNA ou representar uma forma de estoque.
- A análise morfológica dos cromossomos para as duas espécies, quando comparada com a de outras espécies do grupo, poderá fornecer subsídios para o entendimento da diminuição do número de cromossomos de 12 para 10, bem como contribuir para estudos relacionados à evolução do par sexual dentro da família Muscidae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, R.; WEINBERG, J. & SCHNEDL, W. Analysis of heterochromatin and identification of mitotic chromosomes in *Drosophila virilis* by GC and AT specific fluorochromes. **Mikroskopie**, **40**: 4-8, 1983.
- AMARAL, M. J. L. V. & MELLO, M. L. S. Critical electrolyte concentration of heterochromatin and euchromatin in cells of starved animals. **Cytobios**, **59**: 159-165, 1989.
- ANASTOSSOVA-KRISTEVA, M. The nucleolar cycle in man. **J. Cell Sci.** **25**: 103-110, 1977.
- ARRIGHI, F. E. & HSU, T. C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. **Cytogenetics**, **10**: 81-86, 1971.
- ATTARDI, G. & AMALDI, F. Structure and synthesis of ribosomal RNA. **Ann. Rev. of Bioch.**, **39**: 183-226, 1970.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, M.; ROBERTS, K. & WATSON, D. J. **Molecular Biology of the Cell**. 2o edição, New York & London, 1994.
- AVANCINI, R.M.P. & WEINZIERL, R. A. Karyotipe of the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae). **Cytology** (no prelo).
- AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Análise cariotípica de cinco espécies de Calliphoridae (Diptera) do estado de São Paulo. **Tese de mestrado Instituto de Biologia - UNICAMP**, 1982.
- BABU, A. & VERMA, R. S. Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. **Int. Rev. Cytol.**, **108**: 1 - 60, 1987.
- BECKINGHAM, K. & RUBACHA, A. Different chromatin states of the intron- and type 1 intron+ rRNA genes of *Calliphora erythrocephala*. **Chromosoma**, **90**: 311-316, 1984.
- BEÇAK, M. L. Cariótipos e evolução cromossômica em Amphibia-Anura. **Tese de doutorado-USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, 1967.
- BEDO, D. G.. C banding in polytene chromosomes of *Simulium ornatipes* and *S. melatum* (Diptera: Simuliidae). **Chromosoma**, **51**: 291-300, 1975.

- BEDO, D. G.. C, Q and H banding in the analysis of Y chromosome rearrangements in *Lucilia cuprina* (Wiedermann) (Diptera: Calliphoridae). **Chromosoma**, **77**: 299-308, 1980.
- BEDO, D. G. Polytene and mitotic chromosome analysis in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Can. Genet. Cytol.**, **28**: 180-188, 1986.
- BEDO, D. G. & WEBB, G. C. Conservation of nucleolar structure in polytene tissues of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Chromosoma**, **98**: 443-449, 1989.
- BEDO, D. G. Cytological characterisation of heterochromatin in mitotic and meiotic chromosomes of the Old World screw worm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). **Genome**, **34**: 631-637, 1991.
- BORJA, G. E. M. *Haematobia irritans*. **Rev. da casa da Agricultura** .Ano 12 (1). Março/Janeiro, 1990.
- BOURGEOIS, C. A. & HUBERT, J. Spatial relationship between the nucleolus and the nuclear envelope: Structural aspects and functional significance. **Int. rev. Cytol.** **111**: 1-52, 1988.
- BOURGEOIS, C. A.; HEMAN, D.; BOUTEILLE, M. Changes in the nucleolus envelope region during interphase in synchronized TG cells. **J. Ultrastruct. Res.** **68**: 328-340, 1982.
- BOURGEOIS, C. A.; HERNANDEZ-VERDUM, D.; HUBERT, H. & BOUTEILLE, M. Silver staining of NORs in electron microscopy. **Exp. Cell Res.** **123**: 449-452, 1979.
- BOYES, J. W.; COREY, M. J. & PATERSON, H. E. Somatic chromosomes of higher Diptera. **Can. J. Zool.**, **42**: 1025 -1036, 1964.
- BROWN, S. W. Heterochromatin. **Science**, **151**:417-425, 1966.
- BROWN, S. Heterochromatin in the human genome: a quantitative study. **Honor's these**, Depto. Biology. Tulane University, 1983.
- BRUCE, W. G. The horn fly, keeping livestock healthy. **In**: G. Hambridge, ed. U.S.A, Washington, 626 - 630, 1942.

- BRUTLAG, D. L. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. **Annu. Rev. Genet.**, **14**: 121-144, 1980.
- BUSCH, H.; LISCHWE, M. A.; MICHALIK, J.; PUIKWONG, C. H. & BUSCH, R. K. Nucleolar proteins of special interest: silver-staining proteins B23 and C23, and antigens of human tumor nucleoli. In: Jordan E. G. & Cullis C. A. **The nucleolus**, Cambridge University Press, Cambridge London, 43-71, 1982.
- CAJAL, S. R. El nucleo de los celulas piramidales del cerebro humano y de algunos mamiferos. **Trab. Lab. Invest. Biol. Madrid**, **8**: 27-62, 1910.
- CAMACHO, J. P. M.; BELDA, J. & CABRERO, J. Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analysed by C-banding and silver impregnation. **Can. J. Genet. Cytol.**, **27**: 491-497, 1985.
- CARVALHO, C. J. B. **A catalogue of the Faniidae and Muscidae (Diptera) of the Neotropical region**. Soc. Bras. de Entomologia, São Paulo, 1993.
- CAVALIER-SMITH, T. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the C-value paradox. **J. Cell Sci.**, **34**: 247-278, 1978.
- CAVE, M. D. Morphological manifestations of ribosomal DNA amplification during insect oogenesis. In: King & Akai (eds). **Insect ultrastructure, vol. I, cap 4**: 8-117, 1982.
- COMINGS, D. E. Mammalian Chromosome Structure. **Chromosomes Today**, **6**: 19-26, 1977.
- COMINGS, D. E.; LIMON, J.; LEDOCHOWSKI, A. & TSAU, K. C. Mechanisms of chromosome banding. XI. The ability of various acridine derivatives to cause Q-banding. **Exp. Cell Res.**, **117**: 451-455, 1978.
- CZAKER, R. Silver staining in transcriptionally active NORs of meiotic and mitotic cells in *Acheta domesticus* (Orthoptera). **Chromosoma**, **68**: 187-193, 1978.
- DANILEVSKAYA, O.; LOFSKY, A.; KURENOVA, E. V. & PARDUE, M. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* contains a distinctive subclass of HET-A related repeats. **Genetics**, **134**(2): 531-534, 1993.

- DUNDR, M. & RASKA, I. Nonisotopic ultrastructural mapping of transcription sites within the nucleolus. **Exp. Cell Res.**, **208**: 275-281, 1993.
- DRETS, M. E. & STALL, M. C banding and nonhomology associations in *Gryllus argentinus*. **Chromosoma**, **48**: 367-390, 1974.
- DRUMMOND, R. O. G.; LAMBERT, H. E.; SMALLEY, Jr & TERRILL, C. E. Estimated losses of livestock to pests. In: D. Pimentel (ed.), **CRC handbook of pest mangement**. CRC, Boca Raton, p.111-127, 1981.
- DYER, A. F. Allocyclic segments of chromosomes and the structural heterozygosity that the reveal. **Chromosoma**, **13**: 545-576, 1963.
- EL AGOSE, M. ; LEMEUNIER, F. & PERIQUET, G. Mitotic and salivary gland chromosome analyses in the *Musca domestica* L. (house fly) (Diptera: Muscidae). **Heredity** **69**: 57-64, 1992.
- ELLINGER, A. & WACHTLER, F. Uber une methode zur Darstellung des nucleolus im hicht und Elektronenmikroskop. **Mikroskopie**, **36**: 330-335, 1980.
- ESTABLE, C. & SOTELO, J. R. Una nueva estructura celular: el nucleolonema. **Publ. Inst. Invest. Cienc. Biol. Montevideo**, **1**: 105-126, 1950.
- FAKAN, S. & PUVION, E. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. **Int. Rev. Cytol.**, **65**: 225-300, 1980.
- FAN, H. & PENMAN, S. Regulation of synthesis and processing of nucleolar components in metaphase arrested cells. **J. Mol. Biol.**, **59**: 27-42, 1971.
- FEDEROFF, N. V. On spacers. **Cell**: 697-719, 1979.
- FISCHER, D.; WEISENBERG, D. & SCHEER, V. Review: Assigning functions to nucleolar structures. **Chromosoma**, **101**: 133-140, 1991.
- FLAVELL, R. B. & MARTINI, G. The genetic control of nucleolus formation with special reference to common breadwheat. In: **The nucleolus**, JORDAN, E. D. & CULLIS, C. A. (eds.), Cambridge, Cambridge University Press, 1982.

- GAGNE, R; TANGUAY, R. & LABERGE, C. Differential Staining patterns of heterochromatin in man. **Nature New Biology**, **232**: 29-30, 1971.
- GERSHENSON, S. Studies on the genetically inert region of the x-chromosome of *Drosophila*. **J. Genet.**, **28**: 297-318, 1933.
- GHOSH, S. The Molecular Structure. **Int. Rev. Cytol.**, **44**: 1-28, 1976.
- GOESSENS, G. & LEPOINT, A. The nucleolus organizing regions (NOR's). Recent data and hypothesis. **Biol. Cell**, **35**: 211-220, 1979.
- GOESSENS, G. & LEPOINT, A. Localization of AgNOR proteins in Ehrlich tumor cell nucleoli. **Biol. Cell**, **43**: 139-142, 1982.
- GOESSENS, G. Nucleolar Structure. **Int. Rev. Cytol.**, **87**: 107 - 155, 1984.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, **53**: 37-50, 1975.
- GOODPASTURE, C. ; BLOOM, S. E.; HSU, T. C. & ARRIGHI, F. E. Human nucleolus organizers: the satellites or the stalks? **Amer. Hum. Genet.**, **28**: 559-566, 1976.
- GOSALVEZ, TORRE J.; GARCIA de la Vega, C.; RUFAS, J. S. & LOPEZ-FERNANDEZ, C. NORs disturbing chiasma distribution in *Sphingonotus coeruleans* (L) (Orthoptera: Acrididae). **Genetica** **68**(2): 109-111, 1986.
- GOSALVEZ, TORRE J. de la ,GARCIA de la vega, C. & LOPEZ-FENANDEZ, C. The effect of double-strenght standart saline citrate on silver staining. I. nucleoli and micronucleoli in the somatic and germ line of the grasshopper *Arcyptera fusca* (Orthoptera). **Can. Genet. Cytol.**, **28**: 219-226, 1985.
- HAGELE, K. & RANGANATH, H. A. The chromosomes of two *Drosophila* races: *D. nasuta nasuta* and *D. nasuta albomicans* III- Localization of nucleolar organizer regions. **Genetica**, **60**: 123-128, 1983.
- HANSEN-MELANDER, E.; MELANDER, Y. & OLIN, M. L. Chromosome preparation by air drying at low temperature and Giemsa banding procedures. **Hereditas**, **76**: 35-40, 1974.

- HEITZ, E. Das Hetrocromatin der moose. **I. Jabet. Wiss Bot.**, **69**: 762-818,1928.
- HEITZ, E. Nukleolen und chromosomen in der gattung vicia. **Planta** **15**: 495-505, 1931.
- HENDERSON, A. S.; WARBURTON, D.; ATWOOD, K. C. Location of rDNA in the human chromosome complement. **Proc. nat. Acad. Sci.**, **69**: 3394-3398, 1972.
- HERNANDEZ-VERDUM, D. ; HUBERT, J.; BOURGEOIS, C. A .& BOUTEILLE, M. Ultrastructural localization of AgNOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. **Chromosoma**, **79**: 349-362, 1980.
- HERNADEZ-VERDUM, D.; ROUSSEL, P. & GAUTIER, T. Nucleolar proteins during mitosis. **Chromosomes Today**, **11**. A. T. Sumner and A. C. Chandley. London, 1993.
- HOLMQUIST, G. The mechanism of C-banding: depurination and elimination. **Chromosoma**, **72**: 203-224, 1979.
- HOWELL, W. M.; DENTON, T. E. & DIAMOND, J. R. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. **Experientia**, **31**: 260-262, 1975.
- HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, **62**: 361-367, 1977.
- HOWELL, W. M. & BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 - step method. **Experientia**, **36**: 1014-1015, 1980.
- HSU, T. C.; ARRIGHI, E. E.; KEEVPOZ, R. R. & BRINKLEY, B. R. The nucleoli in mitotic divisions of mammalian cells in vitro. **J. Cell Biol.**, **26**: 539-553, 1965.
- HSU, T. C.; SPIRITO, S. E. & PARDUE, M. L. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma**, **53**: 25-36, 1975.

- HSU, T. C. A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. **Genetics**, **79**: 137-150, 1975.
- IMAI, H. T.; TAKAHATA, N.; MARUYANA, T.; DANIEL, A.; HONDA, T.; MATSUDA, Y. & MOTIWAKI, K. Theoretical bases for karyotype evolution. II the fusion burst in man and mouse. **Jpn. Genet.** **63**: 313-142, 1988.
- IMAI, H.T. & TAYLOR, R.W. Chromosomal polymorphisms involving telomere fusion, centromeric inactivation and centromere shift in the ant *Myrmecia (pilosula) n=1*. **Chromosoma**, **98**: 456-460, 1989.
- JAMES, M. T. The flies that cause myiasis in man. **U. S. Dep. Agric. Mus. Publ.**, 631p, 1947.
- JAMES, M. T. & HARWOOD, R. F. Medical entomology. Collier Macmillan, Canada, 484p., 1969.
- JIMENEZ, R.; BURGOS, M. & DIAZ DE LA GUARDIA, R. A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. **Heredity**, **60**: 125-127, 1988.
- JOHN, B. The biology of heterochromatin. **In**: R. S. Verma (ed.). Cambridge. Cambridge University Press, 147p., 1988.
- JOHN, B. & MIKLOS, G. L. G. Functional aspects of heterochromatin and satellite DNA. **Int. Rev. Cytology**, **58**: 1-114, 1979.
- KAUL, D.; CHATURVEDI, R.; GAUR, P. & TEWARI, R. R. Cytogenetics of the genus *Parasarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae). **Chromosoma** **68**: 73-82, 1978.
- KING, M. C-banding Studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. **Chromosoma**, **80**: 191-217, 1980.
- KING, M. & JOHN, B. Regularities and restriction governing C-band variation in acridoid grasshoppers. **Chromosoma**, **76**: 123-150, 1980.
- LACHANCE, L. E. Chromosome studies in three species of Dípteros (Muscidae and Hypodermatidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, **57**: 69 - 73, 1964.

- LEVAN, A.; FREDGA, K. & SANDBERG, A.. A Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, **52**: 201-220, 1964.
- LOIDL, J. & GREILHUBER, J. Structural changes of Ag-stained nucleolus organizing regions and nucleoli during meiosis in *Allium flavum*. **Can. J. Genet. Cytol.** **25**: 524-529, 1983.
- LONG, E. O. & DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Bioch.**, **49**: 727-764, 1980.
- MARCHI, M. & MEZZANOTTE, R. Inter- and intraspecific heterochromatin variation detected by restriction endonuclease digestion in two sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex. **Heredity** **65**: 135-142, 1990.
- MARLATT, C. L. The horn fly. **U.S. Dep. Agric. Bur. Ent. Circ.**, **115**, 1910.
- MATSUI, S. I. & SASAKI, M. Differential Staining of nucleolus organizer in mammalian chromosomes. **Nature**, **246**: 148-150, 1973.
- MAYANARD-SMITH, J. Overview: unsolved evolutionary problems. In: **Genome Evolution**, ed. G. A. DOVER & R. B. FLAVEL, 375-382, 1982.
- MEDINA, F. J. ; RISUENO, M. C.; SANCHES-PINA, M. A. & FERNANDEZ-GOMEZ, M. E. A study on nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. **Chromosoma**, **88**: 149-155, 1983.
- MELLO, M. L. S. Heterocromatina. **Ciência & cultura**, **30**: 290 - 330, 1978.
- MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. Critical electrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, **59**: 87-93, 1989.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C.; DANTAS, M.M. & MONTEIRO, A. L. P. Discrimination of the nucleolus by a critical eletrolyte concentration method. **Acta Histochem. Cytochem.**, **26**(1): 1-3, 1993.
- METZ, C. A. Chromosome studies on the diptera. II. The paired association of chromosomes in the díptera, and its significance. **J. Exptl. Zool.**, **21**: 213 - 279, 1916.

- MILLER, O. L. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. **J. Cell Biol.**, **91**: 15-17, 1981.
- MIRRE, C. & STHAL, A. Ultrastructural organization, sites of transcription and distribution of fibrillar centres in the nucleolus of the mouse oocyte. **J. Cell Sci.**, **48**: 105-126, 1981.
- MONTEIRO, A. L. P. Concentração Crítica de eletrólitos (CEC) em cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* (Díptera: Sciaridae). Campinas, 1993. **Tese de mestrado**. Instituto de Biologia da UNICAMP.
- OLERT, J. Interphase studies with a simplified method of silver staining of nucleoli. **Experientia**, **35**: 283-285, 1979.
- ODD, J. C. & REUTLINGER, A. H. H. The behaviour of silver-positive structures during meiotic prophase of male mice. **Chromosoma** **81**:569-578, 1981.
- PARDUE, M. L. & GALL, J. G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science**, **168**: 1356-1358, 1970.
- PARDUE, M.L. & HENNING, W. Heterochromatin: junk or collectors item? **Chromosoma**, **100**: 3-7, 1990.
- PATHAK, S. & HSU, T. C. Silver stained structures in mammalian meiotic prophase. **Chromosoma**, **70**: 195-203, 1979.
- PIMPINELLI, S.; SANTINI, G. & GATTI, M. Characterization of *Drosophila* heterochromatin. C and N banding. **Chromosoma** **57**: 377-387, 1976.
- PUVION-DUTILLEUL, F.; BACHELLERIE, J. P.; PUVION, E. Nucleolar organization of Hela cells as studied by *in situ* hybridization. **Chromosoma**, **100**: 395-409, 1991.
- RAMAN, R. & SPERLING, K. Patterns of silver staining on NOR's of prematurely condensed chromosomes following RNA inhibition. **Exp. Cell Res.**, **135**: 373-378, 1981.
- REEDER, R. H. Regulatory elements of the generic ribosomal gene. **Curr. Opin. Cell Biol.**, **1**: 466-474, 1989.

- RENKAWITZ, R. Characterization of two moderately repetitive DNA components localized within the b- heterochromatin of *D. hydei*. **Chromosoma**, **6**: 225-236, 1978.
- RENKAWITZ, R. & KUNZ, W. Independent replication of the ribosomal RNA genes in the polytrophic-merostic ovaries of *Calliphora erythrocephala*, *Drosophila hydei* and *Sarcophaga barbata*. **Chromosoma** **53**: 131-140, 1975.
- RIBBERT, D. & BIER, K. Multiple nucleoli and enhanced nucleolar activity in the nurse cells of the insect ovary. **Chromosoma** **27**: 178-197, 1969.
- RIS, H. & KORENBERG, J. Chromosome structure and levels of chromosome organization. In: **Cell Biology: a comprehensive treatise**, D. M. Prescott & L. Goldstein, New York, 1979.
- RISUENO, M. C.; MEDINA, E. J. & MORENO, D. E. Nucleolar fibrillar centers in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. **J. Cell Sci.**, **58**: 313-329, 1982.
- RUFAS, J. S. & GOSALVEZ, J. Development of silver stained structures during spermatogenesis of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). **Caryologia** **35**(2): 261-267, 1982.
- RUIZ, I. R. G. Organizadores nucleolares e evolução cariotípica em anfíbios poliplóides. **Ciência e cultura** **34**(4): 470-473, 1982.
- RUZICKA, V. Zur Geschichte und Kenntnis der feineren structure der nucleolen centraler nervenzellen. **Anat. Anz.**, **16**: 557-563, 1899.
- SALMOLS, D. & SWIFT, H. Genomic organization in the flesh fly *Sarcophaga bullata*. **Chromosoma**, **75**: 129-143, 1979.
- SANCHES-PINA, M. A.; MEDINA, F. J.; FERNANDEZ GOMEZ, M. E. & RISUENO, M. C. Ag-NOR proteins are present when transcription is impaired. **Biol. Cell**, **5**: 199-202, 1984.
- SCHMIDT, M. Chromosome banding in Amphibia. I Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. **Chromosoma**, **66**: 361-388, 1978.

- SCHMIDT, M.; LOSER, C.; SCHMIDKE, J. & ENGEL, W. Evolutionary conservation of a common spermatogenesis in vertebrates. **Chromosoma**, **86**: 149-179, 1982.
- SCHWARZACHER, H. G.; MIKELSAER, A. V. & SCHNEDL, W. The nature of the Ag-Staining of nucleolus organizer regions. Electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis and meiosis. **Cytogenet. Cell genet.**, **20**: 24-39, 1978.
- SCHWARZACHER, H. G. & WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. **Hum. Genet.**, **63**: 89-99, 1983.
- SCHWARZACHER, H. G. & WACHTLER, F. The nucleolus. **Anat. Embryol.**, **188**: 515-536, 1993.
- SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, **58**: 307-324, 1976.
- SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. & HAMILTON, B. Heterochromatin and the phenomenon of chromosome banding. In: HENING, W. **Results and problems in cell differentiation**, **14**: Structure and function of eukaryotic chromosomes. Springer - Verlag, p. 236 - 254, 1987.
- SCOTT, J. E. Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues. In: Glick, D. **Methods of biochemical analysis** **8**. New York Interscience, 1960.
- SCOTT, J. E. Critical electrolyte concentration (CEC) effects in interactions between acid glycosaminoglycans and organic cations and polycations. In: BALAZARES, E. A. ed. **Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix**. London Academic 2, 1970
- SCOTT, J. E. Affinity, competition and specific interactions in the biochemistry and histochemistry of polyelectrolytes. **Biochem. Soc. trans.**, **1**: 787-806, 1973.
- SCOTT, J. E. & DORLING, J. Differential staining of acidic glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. **Histochemie**, **5**: 221-233, 1965.

- SCOTT, J. E. & STOCKWELL, R. A. On the use and abuse of the critical electrolyte concentration approach to the localization of tissues polyanions. **J. Histochem.**, **15**: 111-113, 1967.
- SHEVELYOV, Y. Y. Aurora, a non-mobile retrotransposon in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Mol. Gen. Genet.**, **239**: 205-208, 1993
- SINHA, A. K.; KAKATI, S. & PATHAK, S. Exclusive localization of C-bands within opossum sex chromosoma. **Exp. Cell Res.**, **75**: 265-268, 1972.
- SMETANA, K. & BUSCH, H. The nucleolus and nucleolar DNA. **In: The Cell Nucleus, vol I.** Ed. H. Busch, p.73-143. New York, 1974.
- SOMMERVILLE, J. Nucleolar structure and ribosome biogenesis. **Trends Biochem. Sci.**, **11**: 438-442, 1986.
- STAHL, A. **In : the nucleolus**, Cambridg Univ. Press, London and New York, 1 - 24, 1982.
- SUJA, J. A. & RUFAS, J. S. Nucleolar meiotic cycle in Orthoptera. **Cell Biol. Int. Rep.**, **11**: 289-299, 1987.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, **75**: 304-305, 1972
- SUMNER, A. T. **In: Chromosome banding.** Unwin Hyman Ltda, London, 1990.
- THIEBAUT, F.; RIGAUT, J. P. & REITH, A. Improvement in the specific of the silver staining technique for AgNOR-associated acidic proteins in paraffin sections. **Stain Techn.**, **59**: 181-185, 1984.
- THIRY, M. & THIRY-BLAISE, L. In situ hybridization at the electron microscopic level: an improved method for the precise localization of ribosomal DNA and RNA. **Eur. Cell Biol.** **50**: 235-243, 1989.
- THIRY, M. & THIRY-BLAISE, L. Locating transcribed and non-transcribed DNA spacer sequences within the nucleolus by in situ hybridization and immunoelectron microscopy. **Nucleic Acids Res.**, **19**: 11-15, 1991.

- THIRY, M.; SCHEER, U. & GOESSENS, G. Localization of nucleolar chromatin by immunocytochemistry and in situ hybridization at the electron microscopic level. **Electron Microsc. Rev.**, **4**: 85-110, 1991.
- THIRY, M. & GOESSENS, G. Where, within the nucleolus, are the rRNA genes located? **Exp. Cell Res.**, **200**: 1-4, 1992.
- TUCK-MULLER, C. M.; BORDSON, B. L.; KANE, M. M. & HAMILTON, A. E. A method for combined C-banding and silver staining. **Stain techn.** **59(5)**: 264-268, 1984.
- ULLERICH, F. H. Chromosomenverhältnisse, konstitutives heterochromatin und geschlechtsbestimmung bei unigen arten der gattung *Chrysomya* (calliphoridae, Diptera). **Chromosoma**, **58**: 113-136, 1976.
- VALÉRIO, J. R. & GUIMARÃES, J. H. Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (L) (Diptera: Muscidae) no Brasil. **Revta. Bras. Zool.** **1(4)**: 417-418, 1983.
- VIDAL, B. C. Metodos em Biologia Celular. In: Vidal, B. C. & Mello, M. L. S. **Biologia Celular**. São Paulo. Atheneu, 1987.pp.347.
- VIDAL, B. C. & MELLO, M. L. S. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes in vitro. **Acta Histochem. Cytochem.**, **22**: 471-478, 1989.
- VOICULESCU, I.; VOGEL, W. & WOLF, V. Karyotyp und heterochromatinsmester Des rumanischen Hamsters (*mescricetus newtoni*). **Chromosoma**, **39**: 215-224, 1972.
- VOLPE, P. E. & GEBHARDT, B. M. Somatic chromosomes of the marine toad, *Bufo marinus*. **Copeia** **3**: 570-576, 1968.
- ZACHARIAS, H. Allocyclic behaviour and underreplication of the nucleolus chromosome in *Pseudodiamesa* (Chironomidae). **Chromosoma** **89**: 263-273, 1984.
- WALKER, P. M. B. Origin of satellite DNA. **Nature**, **229**: 306-308, 1971.

- WALLACE, A. J. & NEWTON, M. E. Heterochromatin diversity and cyclic responses to selective silver staining in *Aedes aegypti* (L). **Chromosoma** **95**: 89-93, 1987.
- WANG, H. C. & JUURLINK, B. H. J. Nucleolar organizer regions (NORs) in Chinese hamster chromosomes as visualized by coomassie brilliant blue. **Chromosoma**, **75**: 327-332, 1979.
- WEITH, A. The fine structure of euchromatin and centromeric heterochromatin in *Tenobrio molitor* chromosomes. **Chromosoma**, **91**: 287-296, 1985.
- WILLIAMS, R. E.; HALL, R. D.; BROCE, A. B. & SCHOLL, P. J. In: **Livestock entomology**. Canada, John Wiley and sons., p.75-76, 1985.
- YAMAMOTO, M. Interchromosomal effects of heterochromatic deletions on recombination in *D. melanogaster*. **Genetics**, **93**: 437-448, 1979.
- YUNIS, J. J. & YASMINEH, W. G. Heterochromatin, satellite DNA and cell function. **Science**, **147**: 1200-1209, 1971.

As referências: METZ, C.A., 1916; HEITZ, E., 1928, 1931 não foram localizadas e portanto não foram consultadas.