

Estudos cromossômicos em meiose e mitose de *Boophilus microplus* e análise do cariótipo por técnicas de bandeamento C, G e NOR.

ROSANE NUNES GARCIA

Dissertação apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Rio Grande do Sul para obtenção do grau de Bacharel ênfase em Genética.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiessky.

Co-orientadores: Sônia Maria Lauer Garcia  
Casemiro Garcia.

Porto Alegre, dezembro de 1993

UFRGS  
BIBLIOTECA SETORIAL DO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

A todas as pessoas que  
colaboraram direta ou indiretamente  
para meu êxito.

## AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Vera Lúcia Valente da Silva Gaiesky pela acolhida, apoio e reconhecimento que demonstrou durante todo o ano de trabalho.

Ao Prof. Dr. Shozo Ozaki e colaboradores pela abertura e disponibilidade para a realização desta pesquisa.

Aos Profs. Casemiro Garcia e Sônia Lauer Garcia pelo incentivo para que trilhasse novos caminhos.

Aos colegas do laboratório de Drosophila, pelo carinho e disponibilidade.

A minha família pelo apoio nas horas de dificuldade.

Ao meu esposo Marco pela solidariedade e presença constantes.

Aos meus amigos Nezir, Cláudia, Naila e Margarete pelas vibrações de incentivo.

Ao departamento de Genética da UFRGS pela oportunidade propiciada.

Ao CNPq; PROPESP-UFRGS, FAPERGS e FINEP pelo auxílio financeiro.

## S U M A R I O

1 - INTRODUÇÃO .....	5
1.1 - O carrapato bovino <u>Boophilus microplus</u> .....	5
1.1.1 - Posição sistemática .....	5
1.1.2 - Ciclo de vida do <u>Boophilus microplus</u> .....	7
1.1.3 - Os prejuízos causados em carrapatos .....	10
1.2 - Estudos citogenéticos em carrapatos .....	14
1.3 - Estudos citogenéticos em carrapatos com bandeamento .....	22
1.4 - OBJETIVOS DESTA TRABALHO .....	31
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	33
2.1 - Obtenção das amostras .....	33
2.2 - Técnicas de citogenética .....	35
2.2.1 - Técnica convencional .....	35
2.2.2 - Técnica de bandeamento C .....	35
2.2.3 - Técnica de bandeamento G .....	37
2.2.4 - Técnica de bandeamento NOR .....	38
3 - RESULTADOS .....	40
3.1 - Cromossomos mitóticos .....	40
3.2 - Cromossomos meióticos .....	43
3.3 - O cariótipo de <u>Boophilus microplus</u> .....	47
3.4 - Bandeamento C .....	50
3.5 - Bandeamento NOR .....	53
3.6 - Bandeamento G .....	54
4 - DISCUSSÃO .....	55
4.1 - Figuras meióticas e mitóticas .....	55
4.2 - Configurações e números cromossômicos .....	57
4.3 - Bandeamento C .....	60
4.4 - Bandeamento NOR .....	62
4.5 - Bandeamento G .....	64
5 - RESUMO E CONCLUSÕES .....	65
6 - BIBLIOGRAFIA .....	68

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - O Carrapato bovino *Boophilus microplus*

#### 1.1.1 - Posição sistemática

Os ácaros compreendem os artrópodes incluídos na Ordem Acari da classe *Arichnida* e distinguem-se facilmente dos insetos por apresentarem, de uma maneira geral, quatro pares de patas nos estágios ninfais e adulto. Notória nos ácaros é a redução da segmentação, tão característica dos demais artrópodes. Essa perda de segmentação levou os autores a considerar os ácaros como artrópodes altamente especializados e membros de um grupo que muito cedo se afastou da linha de evolução do Filo *Arthropoda*.

Os carrapatos são separados em 3 grandes famílias: os *Nuttalliellida* e, que são monotípicos, de importância apenas zoológica e com um único representante, *Nuttalliella namaqua*, que foi descrito para o sudoeste da África; os *Argasidae*, ou carrapatos moles e os *Ixodidae*, ou carrapatos duros.

*Boophilus microplus* (Canestrini 1887) é uma espécie de Acaro que encontra-se, dentro de uma classificação geral:

Filo - *ARTHROPODA* von Siebold & Stannius, 1845

Subfilo - *CHELICERATA* Heymons, 1802

Classe - *ARACNIDA* Lamarck, 1802

Subclasse - *ACARI* Leach, 1817

Ordem - *PARASITIFORMES* Reuter, 1909

Subordem - *MESOSTIGMATA* G. Canestrini, 1891

Familia - *IXODIDAE* Murray, 1877

(Flechtmann, 1973)

Ainda são atribuídos, com algumas controvérsias, ao gênero *Boophilus*, cinco espécies: *B. annulatus*, *B. decoloratus* (Koch, 1844), *B. microplus* (Canestrini, 1887), *B. Kohlsi* Hoogstraal & Kaiser, 1960 e *B. geigvi* Aeschlimann & Morel, 1965. *B. Kohlsi* é encontrada em caprinos e ovinos da Jordânia, enquanto que *B. decoloratus* tem como hospedeiros bovinos, antílopes e eqüídeos nas estepes e savanas da África trópico equatorial. *B. geigvi* é observado em bovinos da Costa do Marfim, África. *B. annulatus*, originalmente descrita no Sul dos Estados Unidos é, no norte da África e no Oriente Próximo, freqüentemente referida com o nome de *B. calcavatus* (Birula, 1895. HOOGSTRAAL (1956), UILENBER (1965) e ROBERTS (1965), estudando espécies advindas do Oriente Próximo, da Ásia e da América do Sul, concluíram que a pretensa espécie *B. fallax*, descrita por Minning para espécies coletadas na África é sinônima de *B. microplus*. A única espécie de *Boophilus* admitida para o Brasil é *B. microplus* (Pereira, 1982). Segundo WHARTON (1974), este é um carrapato originário da Ásia e foi introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais através da importação de gado proveniente deste continente.

### 1.1.2 - Ciclo de vida do *Boophilus microplus*

O carrapato *B. microplus* tem duas fases de vida:

a) Fase de vida livre que se realiza no solo. Teleóginas ingurgitadas desprendem-se do hospedeiro, por ação da gravidade, caindo no solo, onde procuram um lugar abrigado para fazer a postura de seus ovos, sendo que neste período as condições ambientais, tais como a umidade e temperatura, são determinantes para fêmea iniciar, não iniciar ou até interromper a postura. Iniciada a postura, ela pode perdurar de 15 a 17 dias e cada fêmea pode colocar 3.000 a 4.000 ovos. Terminado o processo, a fêmea morre e denomina-se quenógina. Quando as condições climáticas são ideais a eclosão ocorre de 6 a 7 dias após o final da postura. Do ovo emerge uma pequena larva, denominada neolarva, que logo ao eclodir não tem condições de parasitar o animal, mas dentro de 4 a 6 dias, já o tem e nessa fase chama-se de larva infestante. Esta é a larva que sobe nos pastos à procura do hospedeiro e, se o encontra, fixa-se e alimenta-se do seu sangue. As larvas podem sobreviver no ambiente, em condições naturais, por mais de 200 dias (no Rio Grande do Sul a sobrevivência de larvas já foi observada até 228 dias).

b) Fases de vida parasitária. As larvas infestantes, que possuem três pares de patas, encontrando o hospedeiro, procuram os locais preferenciais para se fixarem, como seja a base da calda, períneo, entrepernas, peitos, tábua do pescoço e pavilhão auricular interno. Três dias após o início da alimentação a larva forma no seu interior um indivíduo com 4

pares de patas e passa a se chamar metalarva. A metalarva libera, do seu interior, um novo indivíduo - a ninfa. Nova metamorfose, semelhante a anterior então ocorre, surgindo metaninfa. No interior da metaninfa desenvolve-se um novo indivíduo, agora já sexuado. As metaninfas, portanto, liberam ou um macho chamado neandro, ou uma fêmea chamada neógina. Os machos aparecem primeiro no corpo do animal e quando maduros chamam-se gonandros. As neóginas passam pelo instar de partenógina, quando estão semi-ingurgitadas e ao ingurgitarem-se completamente, chamando-se teleóginas. Neste instar desprendem-se do hospedeiro, caindo ao solo e reiniciando o ciclo. A figura 1 resume as etapas do ciclo de vida de *Boophilus microplus*.



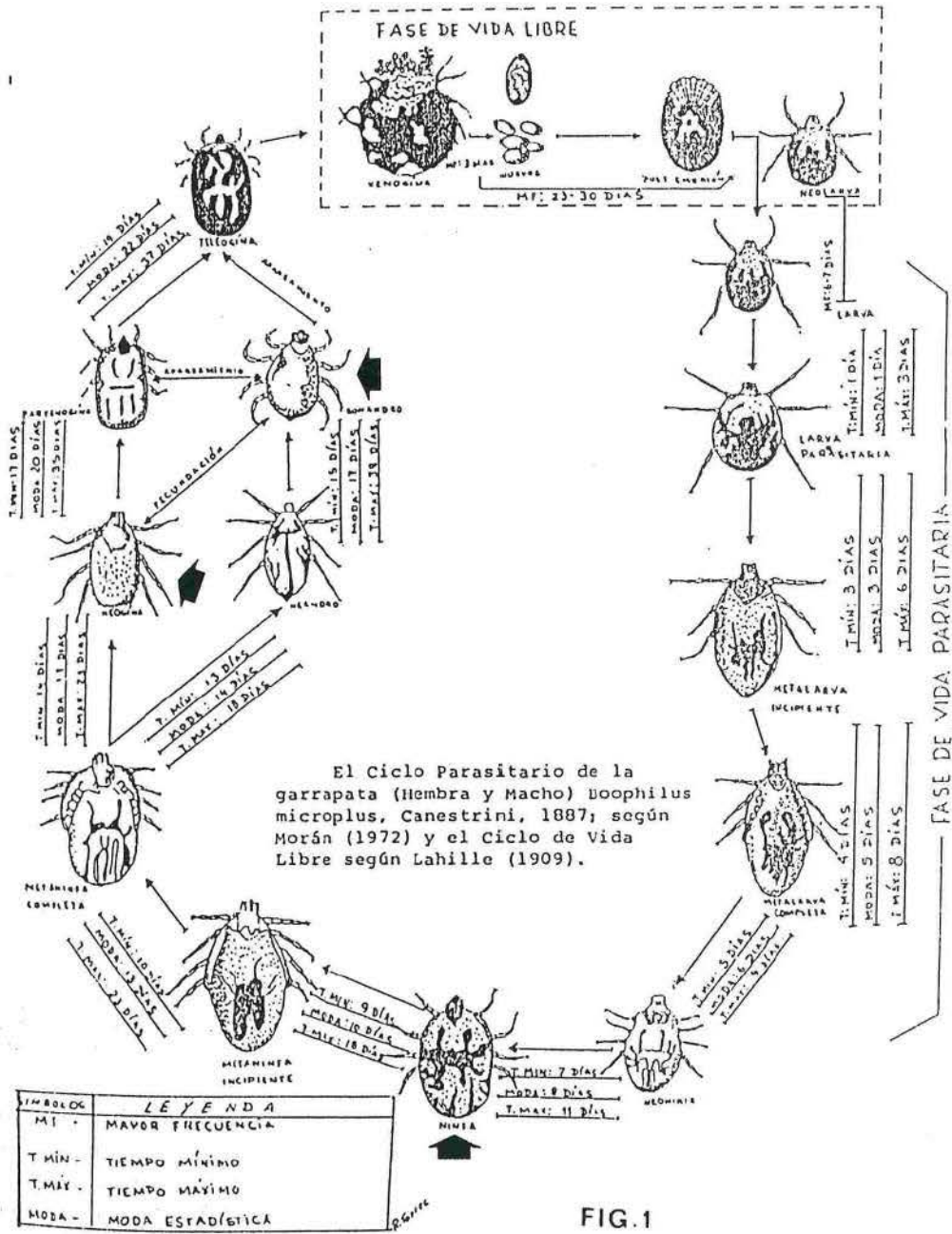


FIG.1

Figura 1: Fases do ciclo de vida de *B. microplus* (C. M. Ramos, 1976. Investigaciones realizadas en el campo de carrapato. Ministério do Desarrollo de Agropecuária. Fac. Cien. Nat. Far., Ed. Esp. Univ. Panamá). Setas indicam fases analisadas neste trabalho.

### 1.1.3 - Os prejuízos causados por *Boophilus microplus*

Os danos diretos que o carrapato *B. microplus* causa ao boi residem na depreciação do couro e na exanguinação; assim, uma fêmea do carrapato remove de 0,5 a 2 mililitros de sangue por dia. Considerando que um boi pode ser parasitado por milhares de carrapatos, perdas diárias de sangue da ordem de várias centenas de mililitros são comuns. Também, durante a sua alimentação, os carrapatos inoculam toxinas no seu hospedeiro e que vão interferir no seu metabolismo. Pela sua presença interferem com o comportamento sendo fator de irritação dos animais parasitados, determinando redução na ingestão de alimentos por parte do hospedeiro.

Indiretamente esse carrapato também causa prejuízos de monta pela transmissão de *Babesia bigemina*. Babesioses são doenças infecciosas, não contagiosas, inoculáveis e virulentas que afetam principalmente mamíferos domésticos e selvagens. O agente causador da doença é um esporozoa *Babesia* que é obrigatoriamente transmitido após o ciclo de desenvolvimento no carrapato (Figura 2). A patologia é caracterizada por parasitismo primário que traz como conseqüência uma anemia hemolítica podendo evoluir para um estado de choque acompanhado por trombose capilar. O ciclo da *Babesia* no carrapato é caracterizado pela possibilidade de infestação da prole por transmissão transovariana (subgênero *Babesia* ou *Piroplasma*). *B. microplus* é responsável também pela transmissão da *Babesia ovis*; causador da piroplasmose das ovelhas, e da *Babesia* (*Nuttalia*) *equi* causadora da piroplasmose eqüina.

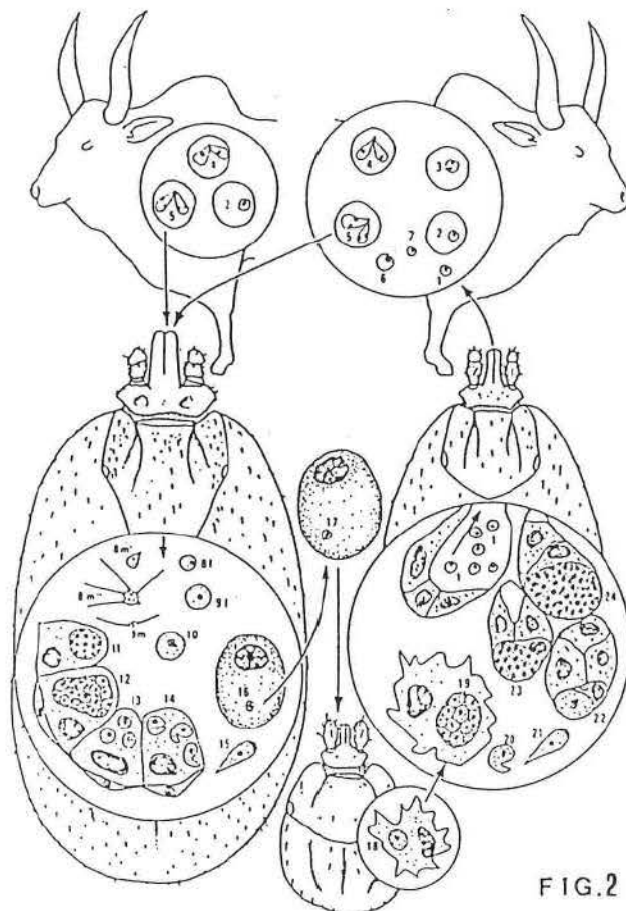


FIG.2

Figura 2: Ciclo da Babesia (Piroplasma) bigemina no gado e Boophilus (Fisher, M. S. Ralph say, R., 1989. Manual of Tropical Veterinary Parasitology, p. 360-361).

No gado

1. Esporozoito metacíclico infectivo inoculado pelo carrapato
2. Trofozoito no eritrócito
3. Ovalóide binucleado ou trofoblasto amebóide
4. Esquizonte bifido com dois merozoitos piriformes uninucleados
5. Esquizonte maturo com dois merozoitos piriformes binucleados
6. Merozoitos jovens após dissociação do esquizonte e

destruição do eritrócito

7. Trofozoito jovem capaz de infectar outros eritrócitos.

Na fêmea de Boophilus ingurgitada.

8f. Merozoito ingerido pelo carrapato e desenvolvendo-se dentro de um macrogametócito.

8m. Merozoito ingerido por um carrapato (8m') desenvolvendo-se dentro de um macrogametócito por um processo de multiplicação nuclear e exflagelação (8m'').

9f. Macrogameta feminino.

9m. Microgameta filiforme masculino resultante da exflagelação.

10. Zigoto hipotético que penetra em uma célula digestiva.

11. Trofoblasto em uma célula de epitélio digestivo.

12. Esporoblasto intestinal inicial produzindo blastozoitos.

13. Blastozoitos intracelulares bulbares.

14. Blastozoitos intracelulares em processo de elongação por fissão.

15. Blastoquineto vermiforme em forma de clava ("club-shaped") jovem na hemocele; penetram células de vários tecidos

(conetivo, geminativo, digestivo, excretor), passando a esporoblasto secundário produzindo blastozoitos bulbares e blastoquinetes vermiformes.

16. Blastozoito em um ovócito, que se desenvolverá na geração seguinte de carrapatos.

Na progênie de fêmea infectada de Boophilus.

17. Blastozoito no ovo que dará esporoblastos e blastozoitos intercolares durante a embriogênese.

18. Blastozoito intercolar em um haemócito larval (ou em alguma célula conetiva, digestiva ou excretoral; se transformará em esporoblastos intercalares.

19. Esporoblasto intercalar em um haemócito de uma ninfa (ou em alguma célula de conetivo, digestivo ou excretor).

20-21. Blastoquinetes terminais com tropismo salivar na hemocele.

22. Blastozoito terminal em uma célula de ácido salivar

23. Trofoblasto terminal (início do desenvolvimento sobre ou fora do hospedeiro, resultado dependente da temperatura externa).

24. Esporocistos terminais produzindo esporozoitos metacíclicos infectivos (1). Relativamente cada estágio depende da influência da temperatura externa sobre ingurgitamento da fêmea.

### 1.2 - Estudos citogenéticos em carrapatos

Inicialmente os estudos citogenéticos em algumas espécies de carrapatos foram utilizados para citotaxonomia. Sendo a classificação de carrapatos baseada em estruturas quitinosas, Kanh 1964, tentou estabelecer entre dez espécies envolvendo cinco gêneros, uma classificação mais clara a partir da análise da citologia nuclear. Neste estudo o autor considerou dois grupos distintos para as espécies que estudou: os Prostriata, onde incluiu *Ixodes ricinus* e *Ixodes hexagonus*, e os Metastriata, onde incluiu *Haemophysalis leporis palustris*, *Dermacentor arderoni*, *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma rufipes*, *Hyalomma excavatum*, *Hyalomma dromedarii*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus secundus*. A partir da análise de preparações de gônadas, glândula salivar e sistema nervoso central, Kanh propôs que *Ixodes ricinus* e *I. Hexagonus* com complementos diplóides de 28 e 26 cromossomos acrocêntricos respectivamente, e ambos tendo mecanismo de determinação sexual XX:XY, possam ser separados dos Metastriata (com número diplóide de  $2n = 21$  para machos e  $2n = 22$  para fêmeas e determinação sexual XX:XO. Esta classificação baseada em estudos cromossômicos não foi considerada por Flechtmann, 1973, embora ela tenha valor para esclarecer a difícil sistemática dos carrapatos.

Propôs ainda Kanh, 1964, que carrapatos e aranhas com mecanismo XO e dez pares de autossomos possam ter evoluído de uma linhagem comum, enquanto que carrapatos e aranhas com mecanismo XY e  $X_1X_2O$  respectivamente e doze ou treze pares de autossomos possam ter descendido de outra linhagem de aracnídeos ancestrais.

Figuras mitóticas e meióticas foram analisadas para cada um destes carrapatos, porém não sequenciadamente.

Em *I. ricinus* (determinação sexual XX:XY) o cromossoma Y é bem pequeno e o X, segundo o autor, não é visível em metáfase mitótica. Um par de cromossomos nos complementos mitóticos tem uma constrição subterminal. Esta constrição não seria o centrômero, pois todos são terminais e evidentes em segunda metáfase meiótica.

Em *I. hexagonus* os centrômeros são todos terminais e os cromossomos sexuais são indistingüíveis em mitose. Na meiose um par de cromossomos maiores, que comportam-se de maneira atípica em diplôteno, poderiam ser X e Y.

*Haemaphysalis leporis palustris* (mecanismo de determinação sexual XX:XO e número cromossômico  $2n = 21$  (macho) e  $2n = 22$  (fêmea), como os demais que serão citados) possui sete pares autossômicos com centrômero terminal, mas três pares autossômicos são metacêntricos e maiores. O autossomo maior freqüentemente mostra duas constrições em metáfase mitótica. Uma destas constrições, provavelmente a mais terminal, seja um sítio de organização nucleolar da mesma forma que o encontrado em *I. ricinus*. Fases meióticas foram estudadas e são semelhantes à outras espécies. Em um cromossomo maior autossômico há invariavelmente associado um volumoso nucléolo.

*Hyalomma* spp. em mitose possui cromossoma X acrocêntrico e maior que os autossômicos que também são todos acrocêntricos. Estes cromossomos são de tamanho semelhante e não

podem ser distingüidos com certeza um do outro pela técnica convencional utilizada pelo autor. Em meiose de machos, como descrito para outras espécies, o centrômero terminal é claro. Em fêmeas não foi localizada meiose e, em preparações de ovos de zero a duas horas após a ovoposição, foi possível visualizar pré-metáfase meiótica, onde os cromossomos aparecem extremamente esticados.

*D. andersoni* tem citogenética semelhante à *Hyalomma* spp diferindo apenas porque o X é maior que os autossomos, mas menor que o X de *Hyalomma*.

*Rhipicephalus* spp. tem pouca diferença no tamanho dos cromossomos e o X não é identificável em mitose.

As descrições de Kanh foram discutidas por Oliver, 1965, onde na introdução de seu trabalho coloca que o mecanismo de determinação sexual XX:XY seria válido para a maioria, se não todos, os carrapatos moles (*Argasidae*). Já os carrapatos duros (*Ixodidae*), segundo o autor, teriam mecanismo de determinação sexual XX:XO. Os machos em ambas as famílias são invariavelmente heterogaméticos e o cromossomo sexual é maior que os autossômicos na sua maioria. O autor segue examinando a citogenética de duas espécies de carrapatos duros (*Amblyomma moreliae* e *A. limbatum*), colocando que os mecanismos de determinação sexual entre os *Ixodidae* podem ainda ter uma variabilidade, sendo, no entanto, pequena. *A. moreliae* e *A. limbatum* exibem um tipo de mecanismo de determinação sexual do tipo  $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$  que pode ter evoluído do sistema XX:XO através de uma translocação desigual recíproca entre os cromossomos sexual maior e um dos autossômicos.



Oliver, 1966, volta a abordar o trabalho de Kanh, 1964, afirmando que seria inadequado utilizar os estudos citológicos para um sistema de classificação devido aos poucos trabalhos existentes e que a proposta na época era ainda prematura. Ao analisar uma série de tentativas de elucidar a sistemática de carrapatos, Oliver comenta o trabalho de Goroshchenko (1959, 1962) que tenta resolver algumas das controvérsias de classificação dos Argasidae comparando os complementos cromossômicos (cariótipos) de espécies conhecidas citologicamente. Aquele autor cita também o esquema de classificação de Argasidae apresentado por Clifford et. al. (1964) que concorda estritamente com o de Pospelova-Shtrom (1953) para taxas acima do nível de gênero. Os primeiros autores reconhecem unicamente quatro gêneros e os últimos colocam as espécies dentro de sete gêneros.

Entretanto, Oliver afirma serem insuficientes todas as tentativas feitas até então para resolver os problemas taxonômicos. Porém não descarta a possibilidade que a observação dos cromossomos possa ser valiosa para responder questões sobre as espécies interrelacionadas. Oliver coloca por exemplo que o baixo número cromossômico ( $2n = 12$ ) de *Ornithodoros gurneyi*, por ele analisado, e o alto número de *O. alactagalis* ( $2n = 32$ ) estudado por Goroshchenko, 1962, representam os dois extremos dos números cromossômicos já analisados em carrapatos. Oliver coloca ainda que *O. alactagalis* poderia ser um tetraplóide de *O. gurneyi*. Goroshchenko, 1962, por sua vez sugeriu que *O. nereensis* possa ser um híbrido de *O. alactagalis*, com dezesseis espécies cromossômicos, por causa da similaridade morfológica e ecológica

e o número intermediário de cromossomos ( $2n = 24$  e  $26$ ) apresentados por *O. nereensis*.

Novamente Oliver, 1968, analisando a citogenética de seis espécies de *Hyalomma* (Ixodidae) egípcios não obteve dados conclusivos por citogenética que permitissem diferenciar as espécies deste gênero. Salienta ainda que este gênero possui vinte autossomos e dois longos cromossomos sexuais sendo o mecanismo de determinação do sexo  $\text{♀XX:XO}^{\text{♂}}$ . Os centrômeros são todos terminais e autor também observou uma migração precoce do cromossomo X em *H. anatolicum excavatum* durante Anáfase I da meiose.

Oliver e Bremner, 1968, estudando alguns carrapatos duros da Austrália, utilizam novamente o sistema de classificação Prostriata e Metastriata para fundamentar a sua abordagem. Como Prostriata estudou *Ixodes tasmani*, *Ixodes holocyclus* e *Ixodes cornuatus*. Os Metastriata estudados foram *Haemaphysalis bremneri*, *H. banerofti*, *H. longicornis*, *Aponomma concolor*, *A. fimbriatum* (= *A. simplex*), *A. fimbriatum* (= *A. ecinctum*), *A. fimbriatum*, *A. undatum*, *A. hydrosauri*, *Amblyomma moreliae*, *A. limbatum*, *A. triguttatum* e, pela primeira vez caracterizaram citogeneticamente, *Boophilus micróplus*.

Como Kanh, 1964, Oliver e Bremner, 1968, colocam que o mecanismo da determinação sexual na maioria das espécies de Metastriata que foram estudados é  $\text{XX:XO}$ . Os machos são heterogaméticos e o cromossomo sexual pode normalmente ser reconhecido pelo seu tamanho maior. Novamente os autores destacam que *Amblyomma moreliae* e *A. limbatum*, são espécies com  $2n = 21$  ou

22 e mecanismo de determinação sexual do tipo  $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y^{\sigma}$ . Os mesmos autores destacam também que em *Haemaphysalis longicornis* ocorre a reprodução pela partenogênese obrigatória e que os machos são raros em infestações naturais e experimentais. O mecanismo de determinação XX:XO para os Metastriatas ocorre na maioria dos carrapatos deste grupo e provavelmente é uma condição primitiva destes.

Esta hipótese aparentemente é correta, pois o complemento cromossômico 31-33 de *H. longicornis* evoluiu como um sistema dos Metastriata e que *H. longicornis* representa um caso de triploidia. No entanto Oliver e Bremner destacam que pela morfologia dos cromossomos destas espécies difícil de ser estudada não foi possível evidenciar a triploidia e sugerem que esta condição triplóide possa ser o resultado de alguns membros de uma população bissexual diplóide (XX:XO), reproduzindo-se partenogeneticamente e que, subsequentemente, alguns tornaram-se triplóides.

*B. microplus* é citado por Oliver e Bremner, 1968, dentre outros, ocasionalmente como um carrapato que apresenta larvas partenogéticas. A discussão do trabalho continua em torno da questão da variabilidade nos números cromossômicos relacionado com a triploidia. Quanto a *B. microplus* os autores destacam ainda um aspecto interessante. Na descrição dos seus resultados, além de colocarem que machos deste gênero e espécie tem  $2n = 21$  e fêmeas tem  $2n = 22$  com mecanismo de determinação sexual XX:XO, descrevem todos os cromossomos como cefalobraquiaes (acrocêntricos).

Oliver e Brinton, 1972, já fazem uma abordagem diferente no campo da citogenética de carrapatos. Neste trabalho não exploram a citotaxonomia e abordam diferentes aspectos do aparelho reprodutor como um todo (desde morfologia até aspectos da espermatogênese) de *Dermacentor occidentalis*. Um ponto interessante que destacam é o mesmo salientado por Kanh, 1964, que diz respeito à dificuldade de se descrever os estágios de prófase I em meiose usando uma terminologia ortodoxa para Ixodidae. Oliver e Brinton exemplificam estas divergências comparando os trabalhos de Kanh com os de Goroshchenko (1960) que respectivamente em *Hemophysalis leospalustris* e *Argas persicus* caracterizam diferentes, figuras meióticas semelhantes.

Esta controvérsia entre o trabalho de Kanh, 1964, e outras descrições de figuras meióticas e mitóticas ficam ainda mais evidentes, por exemplo, quando são comparadas com as figuras obtidas por Newton et. al., 1972, para *Boophilus annulatus* e *B. microplus*. O que é descrito em *B. annulatus* como uma diacinese em divisões nos espermatócitos, é destacada por Kanh em uma figura semelhante como prófase II em *Ixodes ricinus*. Newton et. al. em 1972, por sua vez, descrevem que a configuração dos cromossomos no estágio de prófase II de *B. microplus* é muito semelhante a *B. annulatus*. Também confirmam a primeira observação de Oliver e Bremner, 1968, que o número cromossômico neste gênero é de 21 para machos e 22 para fêmeas. No entanto, um ponto em que discordam de Oliver e Bremner seria no que se refere ao tamanho do cromossomo X em meiose; os primeiros colocam que o cromossomo X em meiose de machos em *B. microplus* Australiano é de três a seis vezes maior que os autossômicos tanto para machos como para

fêmeas e que o autossômico maior possui cerca de duas vezes o comprimento do autossômico menor. Estes resultados não foram observados em *B. microplus* Mexicano e Newton et. al., 1972, atribuem estas diferenças à técnica utilizada e não à fatores geográficos. Em fêmeas, neste trabalho, não foram observados figuras meióticas. No entanto, o cromossomo sexual era geralmente 1,5 a 4 vezes o comprimento do cromossomo maior e menor, respectivamente, em mitose. Em anáfase mitótica foram observadas como comuns conexões de cromatina que aparentemente consistem de divisão incompleta do cromossomo X e em metáfase meiótica observaram a migração precoce de X. No final, uma vez que os resultados apresentados para *B. annulatus* foram muito semelhantes aos de *B. microplus*, os autores concluem se difícil a diferenciação destas duas espécies pelo cariótipo.

Oliver et. al., em 1974, retomam a discussão taxonômica, a partir da citogenética, para nove espécies de Haemophysalinos da Asia. Um aspecto importante que é citado neste trabalho (além dos demais que já foram analisados anteriormente) seria o fato de nos Acari os cromossomos supranumerários serem raros. Os autores referem-se a uma primeira investigação deste assunto feito por Oliver e Bremner, 1968, onde encontraram 1 a 5 cromossomos supranumerários por célula em algumas espécies de *Aponomma fimbriatum*.

Em 1977, Oliver e Osbur, tornaram a abordar, não somente a citogenética, mas aspectos da maturação das gônadas durante o ciclo de vida dos carrapatos *Otobius megnini* e *Otobius lagophilus*. Este processo de maturação tem sido muito investigado

em carrapatos, pois está diretamente associado com o início e quantidade de alimentação e com o desenvolvimento do processo meiótico.

Outros trabalhos (como por exemplo, Oliver, 1985 e Hayashi, 1986) tratam da citogenética de outras espécies de carrapatos, mas basicamente abordam o que já foi comentado até agora de uma maneira geral, acrescentando apenas poucas informações novas que são específicas demais para serem discutidas nesta dissertação.

### 1.3 - Estudos citogenéticos em carrapatos com bandeamento

Os trabalhos envolvendo técnicas de bandeamento para carrapatos, são relativamente poucos, sendo que, em *B. microplus* o trabalho mais recente, citado em bibliografia é o de Hilburn et. al., 1989, onde, por técnicas de bandeamento NOR, localizaram em *B. microplus* e em *B. annulatus*, um par de NORs acrescentando que entre híbridos destas duas espécies o número reduz para uma única NOR.

Outra tentativa de melhor caracterização do cariótipo de carrapatos também foi realizada por Gunn e Hilburn, 1989, utilizando técnicas de bandeamento. Na introdução deste trabalho os autores colocam que devido a alta semelhança entre cariótipos de carrapatos *Metastrata*, técnicas para coloração diferencial são necessárias para esclarecer questões da homologia dos cromossomos entre gêneros de espécies. Gunn e Hilburn colocam também que a maioria das técnicas de citogenética em acarinos

teriam sido utilizadas até então para análise de núcleos meióticos e eventos de espermatogênese. Isto resultou na descrição dos números diplóides baseados em figuras meióticas e, ocasionalmente, mitóticas, sendo limitadas às investigações preliminares em machos. O sistema de determinação sexual tem sido detectado pela falta de pareamento do cromossomo X.

Ainda neste trabalho de 1989, Gunn e Hilburn, descrevem o cariótipo do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* com técnicas de bandeamento C e NOR, justificando a escolha desta espécie para testagem de bandeamento, por ser de fácil manutenção em laboratório, por possuir o cariótipo representativo para maioria dos Metastriata ( $2n = 21$  para machos e  $2n = 22$  para fêmeas) e ser a espécie mais amplamente distribuída no mundo.

Pelo bandeamento C, *Rhipicephalus sanguineus* mostrou que todos os autossomos eram acrocêntricos e o cromossomo X era distintamente subtelocêntrico com uma muito pequena zona eucromática no braço curto (12% do total do comprimento dos cromossomos). A falta de resolução das bandas em estudos prévios foi atribuída ao grau de espiralização diferente dos cromossomos durante a mitose. Gunn e Hilburn relataram resultados semelhantes em um trabalho de Zhou et. al., 1986, com *Dermacentor silvarum* - o primeiro trabalho de bandeamento em carrapatos - onde as bandas Cs também limitaram-se às regiões centroméricas.

A coloração com prata produziu em *Rhipicephalus sanguineus* um padrão idêntico ao da técnica de banda C, sendo a única diferença que a região organizadora de nucléolo (que estaria logo abaixo do centrômero do par de autossomos maiores)

foram mais fortemente coradas com bandeamento C ou coloração em prata, sendo que, este resultado ocorreu porque as regiões centroméricas teriam uma classe particular de proteínas semelhantes às encontradas em NORs. A presença de um único par de NORs foi confirmada pelos autores com colorações posteriores em núcleos interfásicos de machos e fêmeas onde apareciam uma ou duas regiões distintas coradas com prata.

Finalmente Gunn e Hilburn colocam que espécies que contêm heterocromatina em outros sítios que não os centrômeros e NORs podem não mostrar idênticos padrões de banda C e coloração com prata.

Em 1990, Gunn e Hilburn tornam a aplicar técnicas de bandeamento em carrapatos. Desta vez analisam cinco espécies do gênero *Dermacentor* utilizando bandeamento C e NOR, pois como os cromossomos entre as espécies analisadas são semelhantes nos tamanhos, morfologia e número diplóide, diferenças importantes só podem ser feitas por técnicas de bandeamento.

O cariótipo de outras espécies de *Dermacentor* norte americanos que foram analisadas em outros estudos demonstraram 20 cromossomos autossômicos e dimorfismo sexual XX:X0 com o macho como o sexo heterogamético. Cromossomos autossômicos e X têm sido descritos como tendo centrômero terminal, com exceção de um par de cromossomos em *D. variabilis* como estudado por Homsher et. al. (1988). Os tamanhos dos autossômicos, dentro de uma graduação contínua, tinham o cromossomo maior em torno de duas vezes o comprimento do menor. O cromossomo X era o maior elemento cariotípico, geralmente 25 a 50% maior que o maior autossomo.



Gunn e Hilburn discutem que a primeira tentativa para produzir diferencialmente regiões coradas nos cromossomos usando a técnica de bandeamento C de Sumner (1972) produziu poucas novas informações (Zhou et. al. 1986). As únicas colorações diferenciais em bandas C em cromossomos de *D. silvarum*, (espécies Asiáticas) foram observadas em torno dos centrômeros posicionados telomericamente. Adicionalmente, Zhou et. al. (1986) estudaram a presença de cromossomos supranumerários em algumas células, sendo este o único estudo neste sentido realizado para este gênero.

Investigações prévias de cromossomos de *D. albipictus* (Oliver e Osburn, 1972) não identificaram variação no cromossomo X e as investigações indicaram que todos os cromossomos eram acrocêntricos, ou pelo menos aparentemente desta forma; a determinação precisa da posição do centrômero não seria possível em figuras meióticas por causa do nível de condensação, o qual pode obscurecer braços eucromáticos muito curtos.

A ocorrência de variação no cromossomo X e o número de NORs ativas por sua vez, podem indicar algumas diferenças entre populações de *D. albipictus*, resultantes de alterações que surgiram em laboratório. Futuras investigações de populações de *D. albipictus* são necessárias para determinar a natureza e extensão destas variações.

Espécies com um hospedeiro de *D. nitens* investigadas por Gunn e Hilburn possuem um distinto cariótipo revelado por banda C. Dois pares autossômicos (par 1 e 8) possuem centrômeros subtelocêntricos. Adicionalmente, a presença de NORs no braço curto do par subtelocêntrico menor foi única. O cromossomo X era

semelhante ao X subtelocêntrico identificado em *D. albipictus* e isto não foi observado em algumas outras espécies de *Dermacentor* com três hospedeiros. Gunn e Hilburn (1989) estudaram um cromossomo X subtelocêntrico para *R. sanguineus*, um carrapato com três hospedeiros, indicando que um cromossomo X subtelocêntrico pode ser comum na subfamília *Rhipicephalinae*.

Dentre as espécies de *Dermacentor* com três hospedeiros, Gunn e Hilburn colocaram que *D. occidentalis* caracteriza-se por ter uma banda de heterocromatina de coloração clara no par 9. O único par de NORs provavelmente corresponde às bandas fortes de heterocromatina evidenciadas também no par 9. A exata determinação da localização da NOR no cromossomo não foi possível devido a variação na condensação dos cromossomos em diferentes preparações. No entanto, a presença de uma constrição secundária em metáfase mitótica está freqüentemente associada à presença de NORs, facilitando a localização das mesmas.

Os estudos em *D. andersoni* neste trabalho de Gunn e Hilburn confirmam estudos anteriores de Kahn, 1964 e Oliver 1972, os quais indicaram que todos os cromossomos são acrocêntricos e o cariótipo consiste de 20 autossomos com sistema de determinação sexual XX:X0. Os padrões de banda C indicaram algumas diferenças entre *D. occidentalis* e *D. andersoni*. A última possui bandas heterocromáticas nos pares autossômicos 1 (banda relativamente clara) e 9 (uma banda escura) que foram discutidas anteriormente em *D. occidentalis*. Dois pares adicionais de autossomos (3 e 7) tem bandas heterocromáticas claras próximas aos centrômeros. *D. andersoni* foi a única que apresentou quatro pares autossômicos

com bandas de heterocromatina presentes. O único par de NOR presente estaria no par número 9 onde a heterocromatina está corada mais intensamente, como discutido anteriormente para *D. occidentalis*.

A última espécie de três hospedeiros estudada por Gunn e Hilburn foi *D. variabilis*. Esta espécie apresentou o cariótipo com banda C semelhante à *D. andersoni*. A única diferença entre as duas espécies foi no par maior de autossomos no qual em *D. variabilis*, não apresentavam uma banda consistente de heterocromatina corada em tom mais claro próxima ao centrômero. As NORs são mostradas nos pares de autossomos que exibem a banda de heterocromatina corada de forma mais escura (par 9) como nas outras duas espécies de três hospedeiros. O cariótipo de *D. variabilis* mostrou-se todo acrocêntrico.

A espécie asiática analisada por Gunn e Hilburn, *D. silvarum*, apresentou banda C restrita a região centromérica de cada cromossomo acrocêntrico. *D. silvarum* e *D. albipictus* podem ser, portanto, aparentemente idênticos, sendo que ambos possuem o X acrocêntrico.

Porém, *D. albipictus* apresentou traços polimórficos em X, já que alguns indivíduos possuíam este cromossomo subtelocêntrico. Os autores destacam que a espécie que teria o cariótipo mais identificável seria *D. nitens* que apresenta dois pares autossômicos subtelocêntricos (1 e 9) e um cromossomo X subtelocêntrico. *D. albipictus* e *D. nitens*, teriam, portanto, características comuns que poderiam associar as duas espécies, tais como a condição subtelocêntrica do cromossomo X, que foi polimórfica

em *D. albipictus*, e a falta de material heterocromático associada com NORs.

Para finalizar, Gunn e Hilburn comparam os seus resultados obtidos com os anteriores, no trabalho de 1989 para *R. sanguineus*, destacando que os cariótipos são muito semelhantes sendo que a única heterocromatina adicional notada em *R. sanguineus* foi associada com NORs e ocorreu no par autossômico maior. Assim, a posição NORs é definitivamente diferente do que foi visto em *Dermacentor*.

Pela análise dos cariótipos de *Dermacentor* feitos até então, Gunn e Hilburn concluem que um cariótipo primitivo para este gênero teria autossomos acrocêntricos e abundante, ou totalmente, eucromáticos. Rearranjos e heterocromatinização em elementos destes cariótipos básicos resultariam subsequente nos cariótipos distintos de diferentes espécies.

Em 1991, Gunn e Hilburn, utilizando-se de técnicas de bandeamento, tentam detectar alterações cromossômicas ocorridas em três linhagens de laboratório do carrapato *Amblyomma cajennense*. Os dados obtidos indicam claramente a presença de variação aneuploide e rearranjos cromossômicos em algumas linhagens produzidas. O número cromossômico diplóide de 21 (20 autossomos e um único cromossomo X) para machos normais concorda com o estudado por Oliver (1982) para *A. cajennense*. As alterações nos números cromossômicos não são devidos à ocorrência de cromossomo supranumerário (ou B), como é demonstrado pela ausência de cromossomos heterocromáticos. Os autores também descartam a possibilidade de fissão cêntrica, não disjunção

meiótica ou ainda a segregação meiótica aberrante nas translocações heterozigóticas, pelas evidências que observaram nos diferentes linhagens de carrapatos.

Gunn e Hilburn atribuem, então, que as variantes aneuplóides na linhagem M6 seriam resultantes de uma perda de cromossomos de um estado triplóide (a M6 possui  $2n$  variando de 21 a 24), estado este que poderia ter surgido por diferentes causas (isto é, a fusão de um esperma haplóide com um ovo diplóide, a fusão de produtos de três clivagens nucleares, a fusão de um núcleo polar com um núcleo de ovo fertilizado ou a fusão de um ovo haplóide com um oócito diplóide). Considerando que configurações meióticas normais são produzidas pelo triplóide, os gametas resultantes podem exibir variação aneuplóidica considerável bem como alguns gametas haplóides normais e diplóides.

Triploidia em carrapatos foi estudada unicamente em *H. longicornis* (Oliver & Bremner 1968, Oliver et. al. 1973) e aparentemente depende da partenogênese que ocorre em espécies que mantêm o estado triplóide, sendo que a poliploidia ( $3n$ ) seria invariavelmente associada com partenogênese obrigatória nesta espécie de carrapato. O alto nível de aneuplóides e triplóides em *H. longicornis* pode ser devido à eventos de não disjunção os quais podem ser perpetuados mediante reprodução partenogenética. Assim, a evolução de triplóide para diplóide pode ser um processo gradual dependente da ocorrência de partenogênese seguido pela acumulação de cromossomos adicionais através da não disjunção.

A formação de um triplóide é um fato seguido pela perda de cromossomos mediante eventos de alteração ou em raras

instâncias de reprodução sexual. Isto é visto por Gunn e Hilburn como a explanação mais parcimoniosa para a origem de triploidia e de uma única população aneuploide insular na linhagem M6 estudada.

Para explicar a origem dos cromossomos despareados observados na linhagem M6 e M7, os autores sugerem que tenham ocorrido eventos de translocação envolvendo os autossomos maior e menor, eventos estes visíveis em bandeamento NOR. Porém, devido a outros diferentes padrões de bandeamento obtidos, outras modificações estariam também envolvidas no despareamento cromossômico. Estas modificações poderiam incluir: a heterocromatização de uma maior parte de um autossomo pequeno, como indicado por preparações de bandeamento C de linhagens M6 (mas não em M7); a duplicação da NOR (ou a adição de alguma outra estrutura que se cora em prata) no autossomo unido; e a adição de região de banda G não corada entre o centrômero original do autossomo menor e a NOR.

A ocorrência destes cromossomos despareados unicamente em estados heterozigóticos indicam que estes são de alguma forma seletivos ou fatores meióticos que atuam sobre este rearranjo cromossômico. Morfologicamente, os cromossomos despareados aparentam ser dicêntricos, pois Gunn e Hilburn observaram em bandeamento C que ambos os centrômeros estão presentes. Os autores justificam que estes cromossomos dicêntricos segregaram normalmente pois teriam apenas um centrômero funcional.

Finalmente, Gunn e Hilburn concluem a discussão de seu trabalho, indicando que a linhagem M3 (com  $n^{\circ}$  cromossômico normal

de  $2n = 21$ ) pode ter sido a iniciadora das alterações mantidos por dois indivíduos diplóides ou poderia incluir alguma variação aneuplóide que foi subsequentemente perdida. A manutenção da variação aneuplóide na linhagem M6 (com  $2n$  variando entre 21, 22, 23 e 24) pode sugerir que a linhagem M3 originou-se do cruzamento de dois indivíduos diplóides normais. A linhagem M7 ( $2n = 21$ ) podem ter resultado do cruzamento de um número diplóide normal com indivíduo diplóide heterozigoto de cromossomo translocado. A linhagem M6 por sua vez, pode ter se originado pelo cruzamento com um indivíduo que possuía três cromossomos extras com um indivíduo diplóide que foi heterozigoto para o cromossomo translocado.

#### 1.4 - Objetivos deste trabalho

Em face do exposto nesta introdução e tendo em vista que a pesquisa citogenética em carrapatos, especialmente em *Boophilus microplus*, pode trazer informações importantes que auxiliem no controle das infestações deste organismo, o presente trabalho tem como objetivos:

- 1) Caracterizar o comportamento dos cromossomos mitóticos em machos e fêmeas.
- 2) Caracterizar o comportamento dos cromossomos meióticos em machos.
- 3) Estabelecer, através de técnicas convencionais de coloração, a variação no número cromossômico de cepas de *B. microplus* que infestam os rebanhos gaúchos.

4) Estabelecer através de técnicas de bandeamento, C, G e NOR, o cariótipo de *B. microplus*, na tentativa de identificar cada par com precisão.



## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Obtenção das amostras

Amostras de carrapatos do gênero e espécie *Boophilus microplus* (Figura 3) foram obtidas a partir de bovinos infestados experimentalmente na Faculdade de Veterinária, por gentileza do professor Dr. Luiz Shozo Ozaki e colaboradores, do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

As cepas obtidas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização das amostras de *B. microplus* estudadas.

Data da coleta	Nº indivíduos masculinos	Estágio dos machos	Nº indivíduos femininos	Estágio das fêmeas
MARÇO/93	10	Gonandros	10	Ninfas
MAIO/93	2	Ninfas	6	Ninfas
JULHO/93	--	---	12	Neóginas

As amostras de MARÇO/93 foram utilizadas para estudos de citogenética convencional; as amostras de MAIO/93 foram utilizadas para bandeamento C; as amostras de JULHO/93 foram utilizadas para bandeamento G e NOR.



Figura 3. *Boophilus microplus*. Indivíduos em fases de Metalarva (3A), Ninfa (3B) e Neógena (3C). Macho Neandro (3D) e Gonandro (3E).

## 2.2 - Técnicas de citogenética

### 2.2.1 - Técnica convencional

Para execução das técnicas de citogenética os carrapatos foram dissecados sob estereomicroscópio em soro Beadle Ephrussi (1936) e as gônadas transferidas para lâmina gelatinada (que permite maior adesão do material) com solução hipotônica de citrato de sódio 9% por dez minutos. Este procedimento serve para abrir os núcleos e separar mais os cromossomos. Logo após o tecido foi fixado em etanol - ácido acético 3:1 por três minutos e o esmagamento ("squash") foi feito com orceína acética a 3%. As lâminas prontas eram lutadas e levadas ao microscópio para observação e fotografia. A partir das fotomicrografias obtidas, os cariótipos foram montados tanto para núcleos mitóticos como meióticos ( $n$  e  $2n$ ), utilizando-se como critérios o tamanho dos cromossomos e localização do centrômero para ordenamento dos mesmos.

### 2.2.2 - Técnica de bandeamento C

Gônadas de oito ninfas de infestações de MAIO/93 foram usadas para bandeamento C a partir da técnica descrita por Gunn e Hilburn, 1989, com modificações para tempo de exposição ao hidróxido de bário e coloração Giemsa.

A técnica de bandeamento C é resultante da extração seletiva dos DNAs que não são das regiões de banda C (Comings et. al., 1973; Comings, 1978) seguida pela coloração com Giemsa das regiões que resistiram à remoção, coloração esta que ocorre

graças à interações iônicas nos grupos fosfatos do DNA remanescente (Comings, 1975; Comings e Avelino, 1975). Comings (1978) hipotetizou que a extração preferencial de DNA só das regiões que não são de banda C possa ser devido a compactação fechada do DNA que protege a heterocromatina da destruição pelo hidróxido de bário ou sais. A compactação fechada pensa-se ser devido a proteínas histônicas e uma falta geral de proteínas não-histônicas, que são geralmente indicativos de regiões de cromatina ativa. Portanto, a técnica de banda C é DNA dependente e não é relacionada à presença de proteínas específicas a não ser as proteínas envolvidas na reação de coloração.

Após a dissecação e tratamento com solução hipotônica, a fixação do tecido foi feita com 1 parte de água destilada. O "squash" foi feito com laminula (também em lâmina gelatinada) e a lâmina foi levada para câmara de 4°C por 24 horas. Depois disso a lâmina era retirada em nitrogênio líquido e colocada por 15 minutos em temperatura ambiente em fixador Carnoy (6 partes de metanol: 1 parte de ácido acético). Após este tempo as lâminas eram imersas em solução de ácido clorídrico por 45 minutos à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e secas ao ar. O tratamento com ácido clorídrico foi feito para retirar o excesso de proteínas que poderiam interferir no sucesso da técnica.

O passo seguinte consistiu em acertar o tempo adequado de exposição ao hidróxido de bário (que retira as regiões não heterocromáticas), que para *Boophilus microplus* ficou determinado; como sendo o ideal, de um minuto. O banho foi feito em uma solução de hidróxido de bário à 5% sujeito à temperatura de 50°C.

Após este tratamento, as lâminas eram lavadas em água corrente, água destilada e incubadas em solução de SSC 2x a 60°C durante uma hora. Novamente as lâminas eram lavadas em água destilada e coradas na seguinte solução: 5ml de Giemsa 5%, 2ml de solução tampão fosfato de pH 6,8 e 90ml de água destilada por 15 minutos. O excesso de corante era retirado em água destilada corrente e as lâminas eram então levadas ao microscópio para observação e obtenção de fotomicrografias.

### 2.2.3 - Técnica de bandeamento G

Gônadas de seis neóginas de infestações de JULHO/93 foram utilizadas para bandeamento G a partir da técnica descrita por Seabright, 1971, com modificações na fixação e no tempo de exposição à tripsina.

A técnica de bandeamento G baseia-se no fato de que a interação DNA-proteína, sendo diferente, produz locais preferenciais de ataque para a enzima tripsina no cromossomo. Estes locais preferenciais obedecem para cada cromossomo um padrão relativamente uniforme, o que permite identificar pelas bandas resultantes, quais os pares de cromossomos que são homólogos.

Após a dissecação o material foi transferido para lâmina limpa e não gelatinada, onde também passou pelo tratamento com solução hipotônica e fixação com 1 ácido lático: 1 ácido acético: 1 água destilada, sendo feito o "squash" como descrito para bandeamento C. Após um período de 24 horas em que permaneceram em câmara de 4°C as lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e colocadas em um banho de solução tampão fosfato (pH 6,8)

durante 5 minutos. Este procedimento foi feito para evitar que variações no pH, possam interferir na ação da enzima, o que produziria alteração no padrão de bandas. Feito isto as lâminas foram mergulhadas em solução de tripsina por um tempo determinado para o presente trabalho.

Para o carrapato *B. microplus*, foram testadas soluções da enzima a 2% e 1% durante tempos de exposição que variaram de 1 segundo à 1 minuto, na tentativa de se estabelecer o tempo adequado. Depois da exposição à tripsina, as lâminas eram lavadas em álcool 96° e água destilada. A coloração foi feita com a mesma solução de Giemsa-tampão utilizada para bandeamento C, por 12 minutos. O excesso de corante foi retirado em água destilada corrente e as lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio.

#### 2.2.4 - Técnica de bandeamento NOR

Seis neóginas da mesma infestação de JULHO/93 foram utilizadas para bandeamento NOR, aplicando a técnica descrita por Howell, 1977, com modificações na fixação do tecido.

A técnica de bandeamento NOR consiste na coloração com prata da região organizadora de nucléolo. A prata atuaria ligando-se à proteínas antes que ao DNA ou RNA (Howell, 1977; Schwarzacher et. al., 1978). Da mesma forma um procedimento de bandeamento Giemsa que seja específico para NORs (Matsui e Sasaki, 1973) tem mostrado envolver coloração de proteína (Matsui, 1974). Buys e Osinga (1980) determinaram que a prata liga-se especificamente à grupos sulfidril e disulfidril das

proteínas ácidas. Atualmente, duas (Lischwe et. al., 1979) ou 3 (Hubbell et. al., 1979) proteínas foram identificadas como proteínas da NORs que se coram com prata. Foi hipotetizado que a função destas proteínas estaria relacionada com a transcrição ou processamento de RNA pré-ribossomal.

O material foi preparado sobre lâmina gelatinizada, também passando pelo tratamento com solução hipotônica, fixação e "squash" em 1 ácido lático: 1 ácido acético: 1 água destilada. Após período de 24 horas em câmara de 4°C, as laminulas foram retiradas em nitrogênio líquido e mergulhadas em fixador (6 metanol: 1 ácido acético) por 15 minutos. As lâminas eram secas ao ar e colocadas em solução de água destilada e nitrato de prata a 50% por 3 horas à 37°C. As lâminas eram secas ao ar e coradas com a mesma solução Giemsa-tampão utilizada para bandeamento C, por 5 minutos. Após o excesso de corante ser lavado em água destilada, as lâminas estavam prontas para observação e fotografia em microscópio.

As lâminas de bandeamento C, G e NOR foram tomadas permanentes com Entellan (Merck) permanecendo em câmara de 17°C para secagem por 48 horas.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Cromossomos mitóticos

As figuras mitóticas detectadas através de preparações com técnica convencional, tanto em machos como em fêmeas, em estágio de Ninfa, foram as seguintes:

a) Prófase (Figura 4A). Percebe-se claramente neste material que as cromátides irmãs já estão em um estado de contração considerável e o nucléolo já desapareceu.

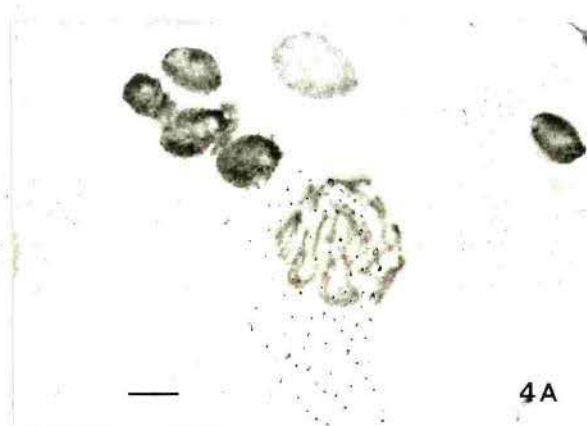


Figura 4A: Prófase mitótica observada em gônadas de macho de *B. microplus* em estágio de ninfa. Barra = 10  $\mu$ m.

b) Metáfase tardia (Figura 4B). Observa-se nesta metáfase que já ocorreu a divisão da região centromérica das cromátides irmãs, estando os cromossomos prontos para o início da migração para os polos opostos da célula.





Figura 4B: Metáfase mitótica tardia com gônadas de macho de *B. microplus* em estágio de Ninfa. Barra = 10  $\mu$ m.

c) Anáfase (Figura 4C). Nota-se claramente na anáfase como na anáfase tardia (Figura 4D) a movimentação dos cromossomos para polos opostos da célula.

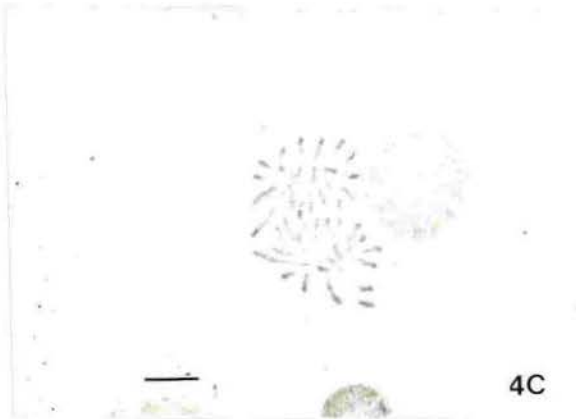


Figura 4C: Anáfase mitótica em gônadas de macho de *B. microplus* em estágio de ninfa. Barra = 10  $\mu$ m.

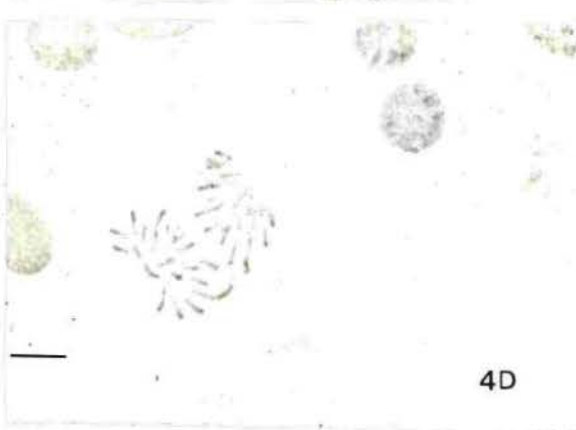


Figura 4D: Anáfase mitótica tardia em gônadas de fêmea de *B. microplus* em estágio de ninfa. Barra = 10  $\mu$ m.

d) Telófase (Figura 4E). Terminada a migração dos cromossomos, a célula começa a se reorganizar e como fica bem claro nas figuras, este processo resultou em dois novos núcleos. Na figura 4F observa-se uma desespiralização das cromátides num

estágio mais avançado e, em vista desta observação, pode-se dizer que já se trata de uma telófase mais tardia.

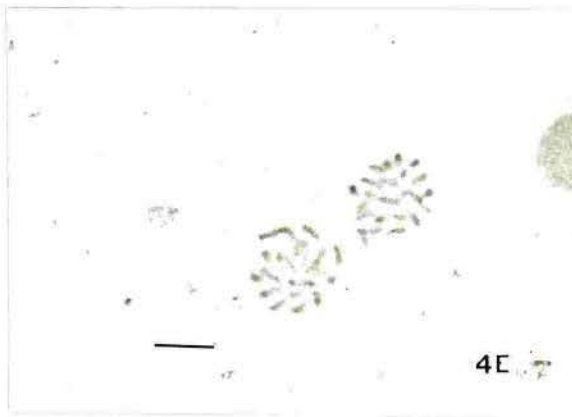


Figura 4E: Telófase mitótica em gônada de macho no estágio de ninfa. Barra = 10  $\mu$ m.

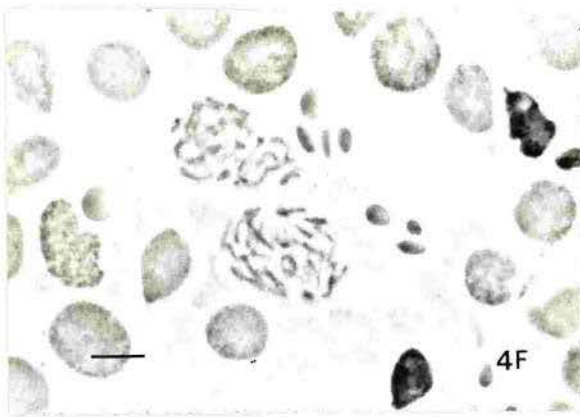


Figura 4F: Telófase mitótica tardia em gônada de macho no estágio de ninfa, onde observa-se desespiralização das cromátides mais avançada. Barra = 10  $\mu$ m.

Em uma preparação de gônada de fêmea em estágio de ninfa foi possível observar uma ponte entre os cromossomos X durante a anáfase mitótica (Figura 5). Não foi detectado nenhuma migração cromossômica anômala em mitose.

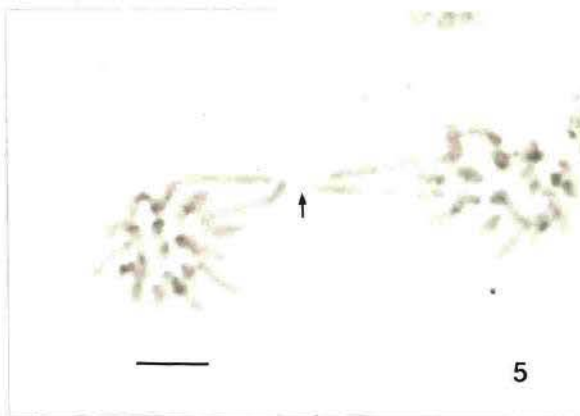


Figura 5: Anáfase mitótica onde se observa uma ponte (seta) entre os cromossomos X. Barra = 10  $\mu$ m.

### 3.2 - Cromossomos meióticos

As figuras meióticas detectadas em testículo de macho adulto de *B. microplus*, preparadas por técnica convencional, são apresentadas e descritas a seguir:

#### Meiose I

##### Prófase I (Figuras 6 e 7)

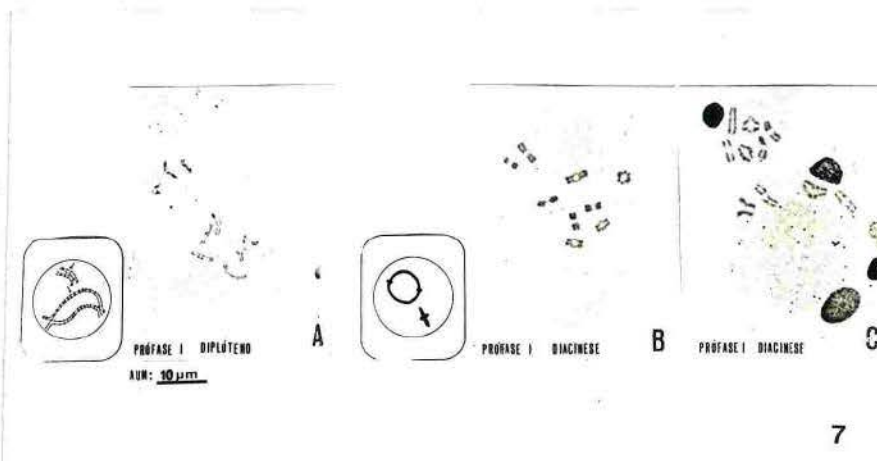
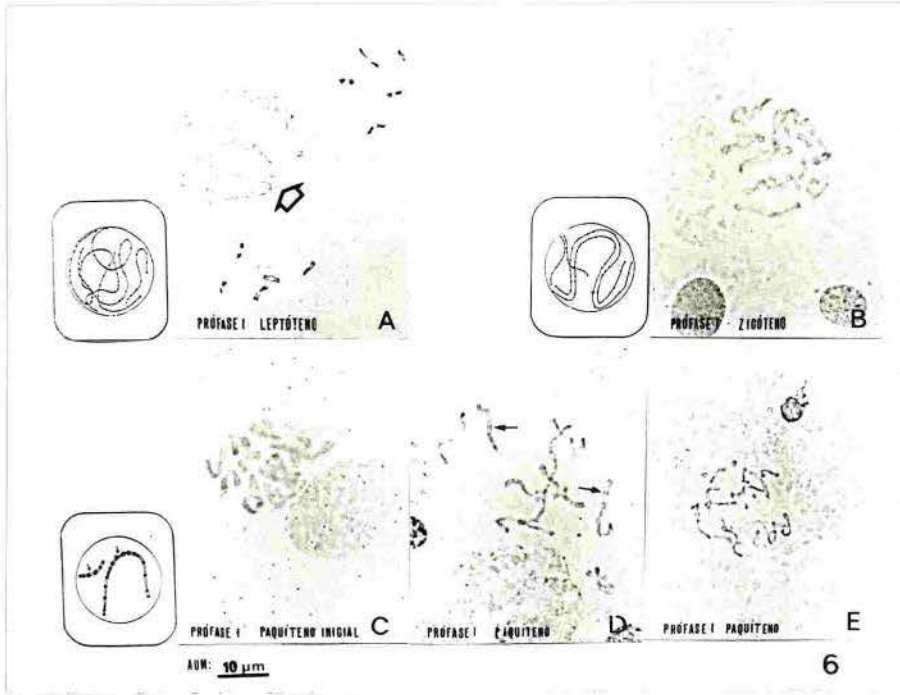
- Leptóteno (Figura 6A). Foi possível verificar no material analisado, o início da espiralização das cromátides.

- Zigóteno (Figura 6B). Os cromossomos homólogos agora já se encontram pareados, mas as cromátides ainda continuam em proceso de espiralização.

- Paquíteno (Figuras 6C, 6D, 6E). Os cromômeros já são visíveis e a espiralização dos cromossomos é cada vez maior.

- Diplóteno (Figura 7A). Observa-se pontos de crossing-over visíveis através de quiasmas; já é possível notar um início de repulsão entre os homólogos.

- Diacinese (Figuras 7B e 7C). Os cromossomos demonstram espiralização máxima e terminalização dos quiasmas.



Figuras 6 e 7: Fases de Prófase I em testículo de macho (gonandro) de *B. microplus*. 6A, Leptótene (seta); 6B, zigótene; 6C, paquíteno inicial, 6D e 6E, paquíteno (setas indicam os cromômeros); 7A, diplótene; 7B e 7C, diacinese. Os esquemas ao lado das figuras são de Guerra (1989).

Telófase I (Figura 8). Poucas, entre muitas células analisadas de testículo de macho adulto (gonandro) de *B. microplus*, estavam em Telófase I.

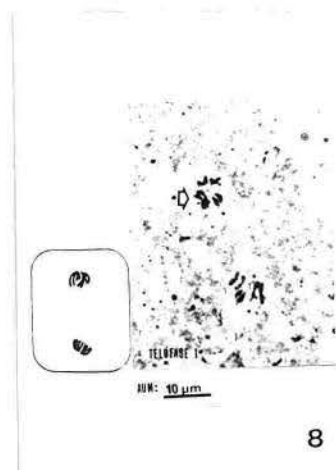


Figura 8: Telófase da meiose I em macho adulto (gonandro) de *B. microplus*. Seta indica as duas cromátides irmãs unidas. Esquema de Guerra (1989).

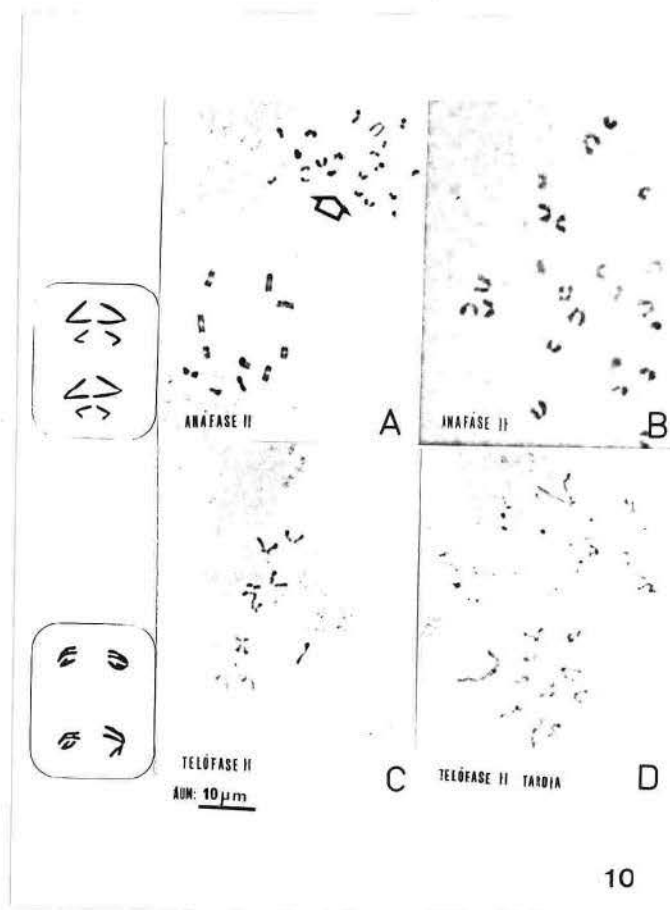
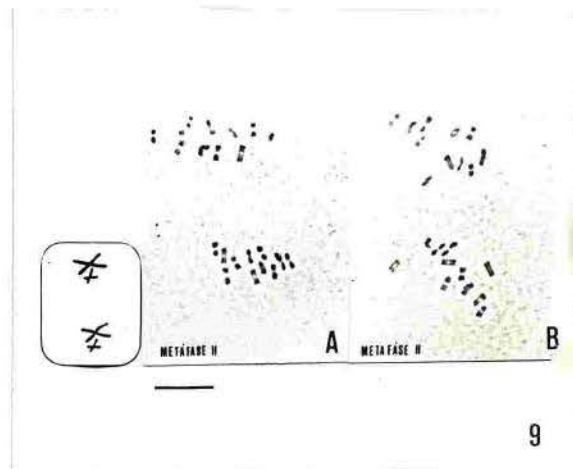
#### Meiose II (Figuras 9 e 10)

Metáfase II (Figuras 9A e 9B). Observou-se nos núcleos metafásicos o posicionamento típico em placa metafásica.

Anáfase II (Figuras 10A e 10B). Os cromossomos apresentam-se com as cromátides irmãs já separadas, mas ainda não são bem visíveis o direcionamento da migração para polos opostos da célula.

Telófase II (Figuras 10C e 10D). Os cromossomos já se apresentam em processo de desespiralização. Na telófase tardia (Figura 10D) são mais visíveis os dois núcleos que se originaram, um mais abaixo com os 11 cromossomos visíveis e outro mais acima onde só aparecem no campo 6 cromossomos.

Metáfase I, Anáfase I e Prófase II não foram detectadas nos núcleos meióticos analisados.



Figuras 9 e 10: 9A e 9B, metáfase de meiose II em gônada de macho adulto (gonandro) de *B. microplus*; 10A e 10B, anáfase de meiose II (seta indica núcleo anafásico em 10A); 10C, telófase de meiose II; 10D, telófase tardia em meiose II. Esquemas de Guerra (1989). Barra na figura 9 = 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 - O cariótipo de *B. microplus*

Com a técnica convencional utilizada, obteve-se o número cromossômico para *B. microplus* como sendo de  $2n = 22$  para fêmeas e  $2n = 21$  para machos (Figura 11). Núcleos meióticos também foram analisados, verificando-se que o número cromossômico era de  $n = 10$  (Figura 12) ou  $n = 11$  (Figura 13), conforme o cromossomo X estivesse ausente ou presente.

O sistema de determinação sexual para *B. microplus* é  $XX^0:XO^0$ , sendo que o cromossomo X em núcleos mitóticos tem o dobro do tamanho do autossomo maior. Em núcleos meióticos esta distinção de tamanho entre o X e os cromossomos autossômicos não é tão evidente, ficando o cromossomo sexual quase do mesmo tamanho que o autossomo maior.

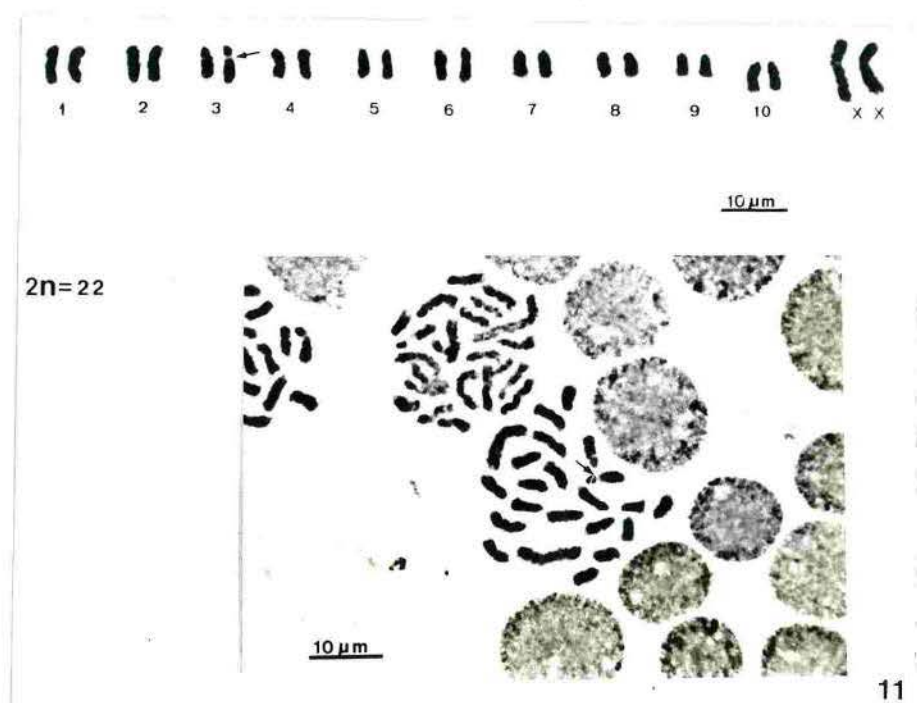


Figura 11: Cariótipo de *B. microplus* montado a partir de núcleos mitóticos de gônada de fêmeas em estágio de Ninfa, preparado por técnica convencional onde  $2n = 22$ . Observar constrição em um autossomo do par número 3. (seta)

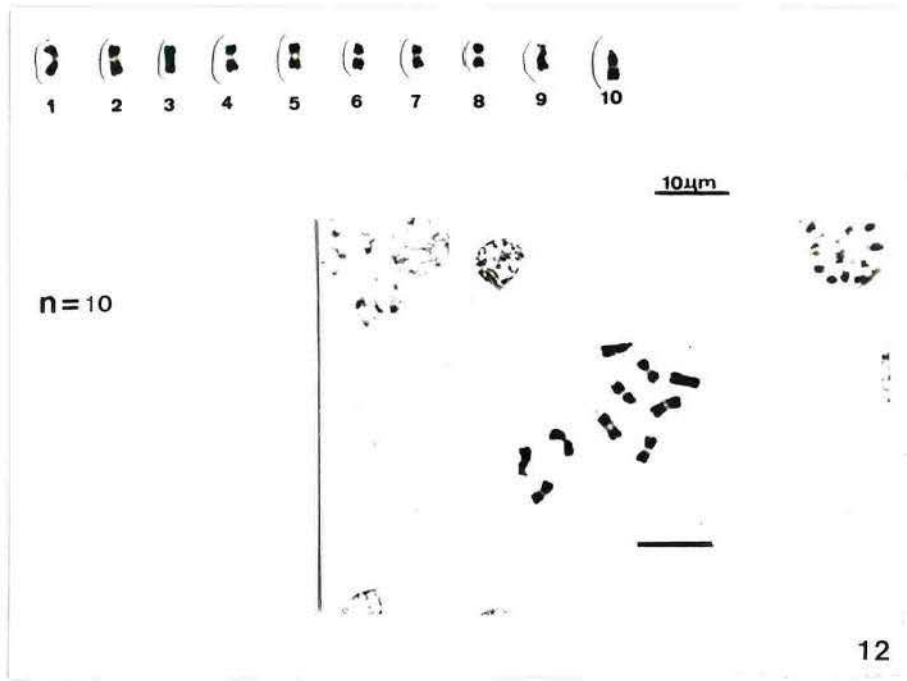


Figura 12: Cariótipo de *B. microplus* montado a partir do núcleo meiótico de gônada de macho adulto (gonandro) preparada por técnica convencional, onde  $n = 10$ .

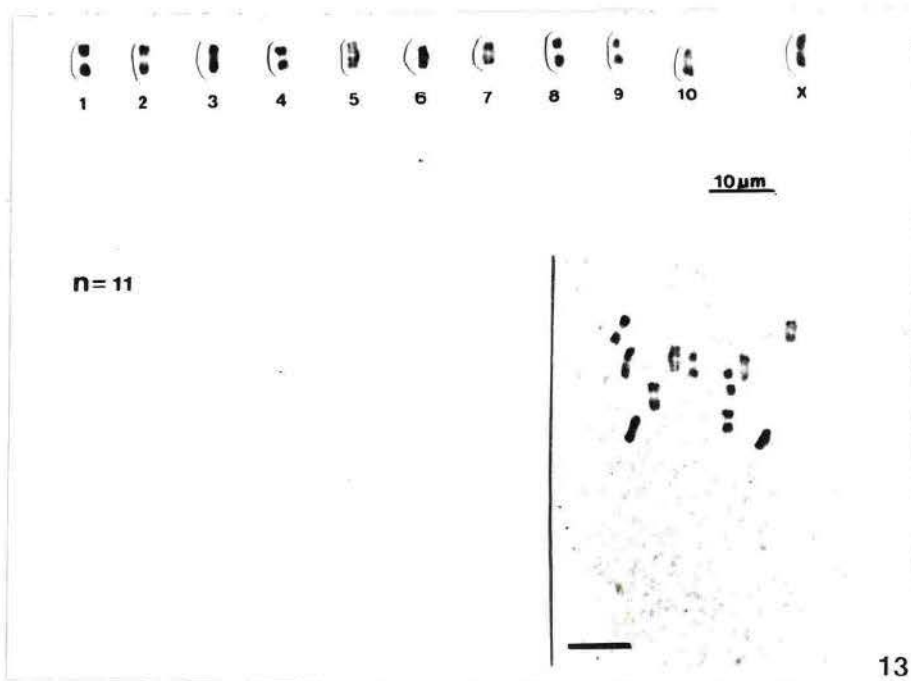


Figura 13: Cariótipo de *B. microplus* montado a partir de núcleo meiótico de gônada de macho adulto (gonandro) preparada por técnica convencional, onde  $n = 11$ .



Quanto a posição do centrômero, observou-se que em núcleos meióticos é bem claro que os cromossomos são metacêntricos, inclusive o X, havendo, porém, um autossomo (o de nº 10) que apresenta-se acrocêntrico: Em núcleos mitóticos a posição do centrômero não é clara, sendo no entanto, constante a presença de uma constrição extracentromérica em um dos autossomos do par número 3. (Figuras 11 e 14)

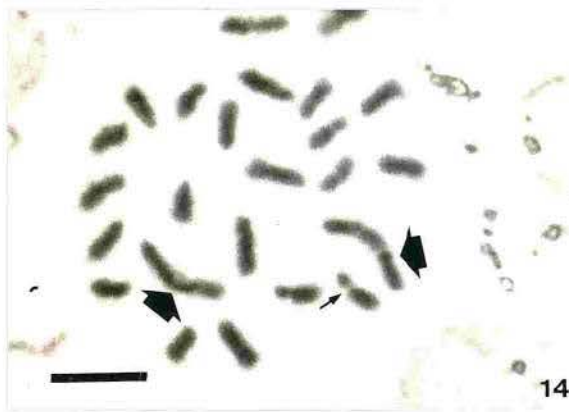


Figura 14: Núcleo mitótico obtido de gônada de fêmea em estágio de ninfa preparada por técnica convencional. Observar a constrição (seta fina) em um dos autossomos maiores e os cromossomos X evidentes (seta grossa). Barra = 10  $\mu$ m.

Não foi detectada variação no número cromossômico nas cepas de *B. microplus* analisadas. No entanto, em apenas um indivíduo, localizou-se núcleos poliplóides com número cromossômico em torno de 44 em gônada de fêmea em estágio de ninfa. (Figura 15)

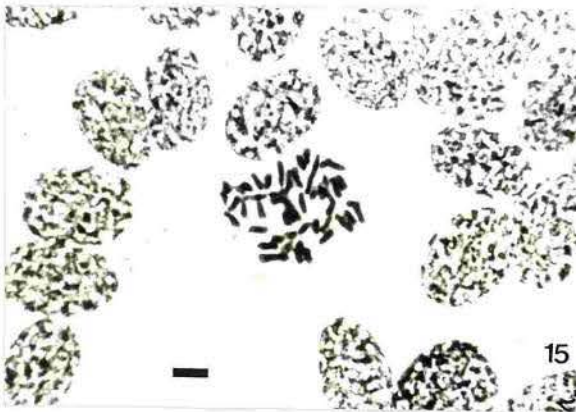


Figura 15: Núcleo poliplóide localizado em gônada de fêmea em estágio de ninfa com número cromossômico em torno de 44. Barra = 10  $\mu$ m.

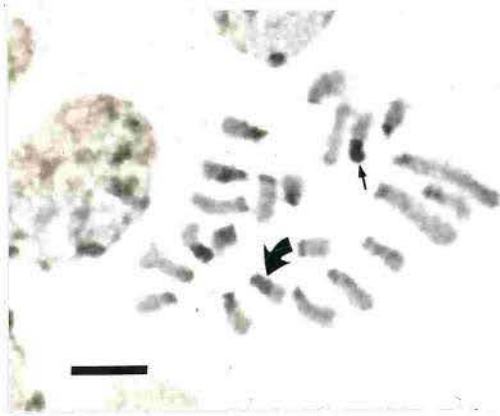
### 3.4 - Bandeamento C

Por técnica de bandeamento C observou-se que, em *B. microplus*, os cromossomos apresentaram blocos de heterocromatina.

Os pares número 1, 4, 5, 6, 8 e 9 evidenciaram marcações fracas em um dos telômeros do cromossomo. Os pares número 2 e 7 apresentaram uma banda pequena, mas bem corada em um dos telômeros. O par número 3 apresentou uma banda maior que ocupa metade da cromátide e o par 10 apresentou duas bandas, uma próxima ao centrômero e outra no centrômero.

O cromossomo X, apresentou uma banda em um dos telômeros (Figuras 16 e 17).

A presença de heterocromatina em *B. microplus* nos telômeros em maioria, foi observada também em bandeamento C realizado em núcleos meióticos, que demonstraram marcação evidente nestas regiões (Figura 18).



16 Figura 16: núcleo mitótico de fêmea em estágio de ninfa de *B. microplus* obtido por técnica de bandeamento C. Setas grossas indicam as duas bandas Cs do par n<sup>o</sup> 10. Setas finas indicam as bandas maiores do par n<sup>o</sup> 3. Barra = 10  $\mu$ m.

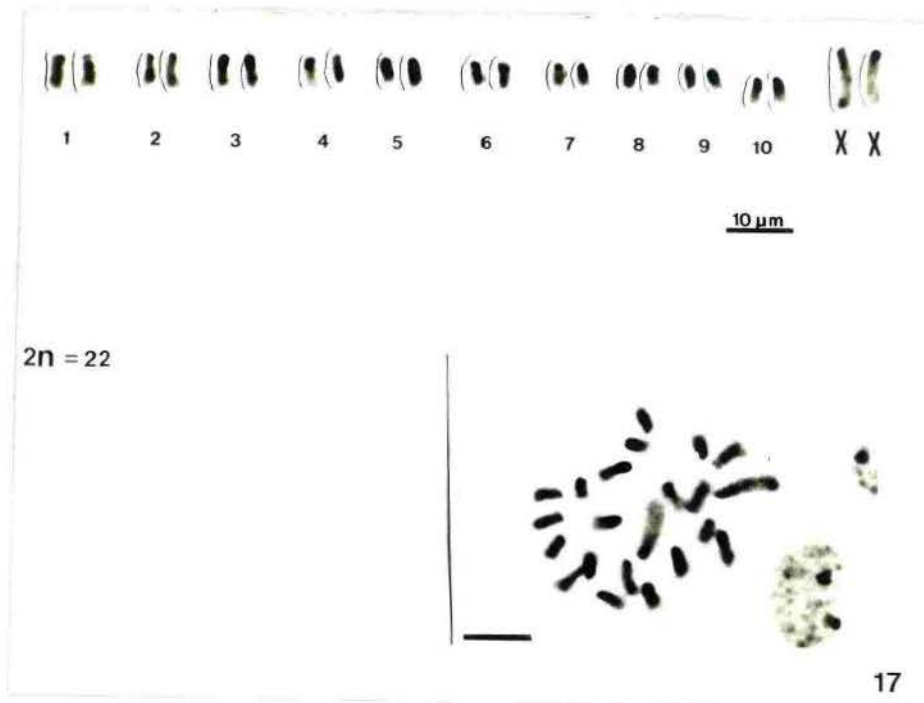


Figura 17: Cariótipo de *B. microplus* obtido a partir de técnica de bandeamento C.

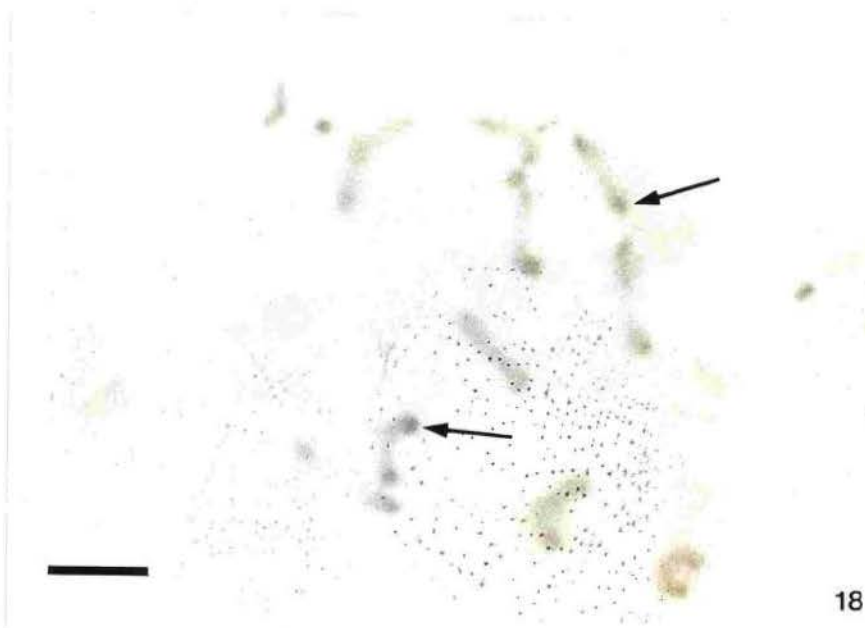


Figura 18: Núcleo meiótico de testículo de macho adulto (gonandro) de *B. microplus*, obtido por técnica de bandeamento C. Setas indicam região heterocromática predominante nos telômeros. Barra = 10 μm.

O estabelecimento dos pares cromossômicos foi facilitado pelo bandejamento C, sendo possível observar que não havia polimorfismos entre os pares e o mesmo padrão de bandas repetia-se para indivíduos diferentes, mesmo sendo de outras cepas. Em algumas preparações, no entanto, verificou-se que haviam bandas difusas. Uma visão esquemática do bandejamento C é dado pela figura 19.

ESQUEMA DE BANDEAMENTO C EM Boophilus microplus

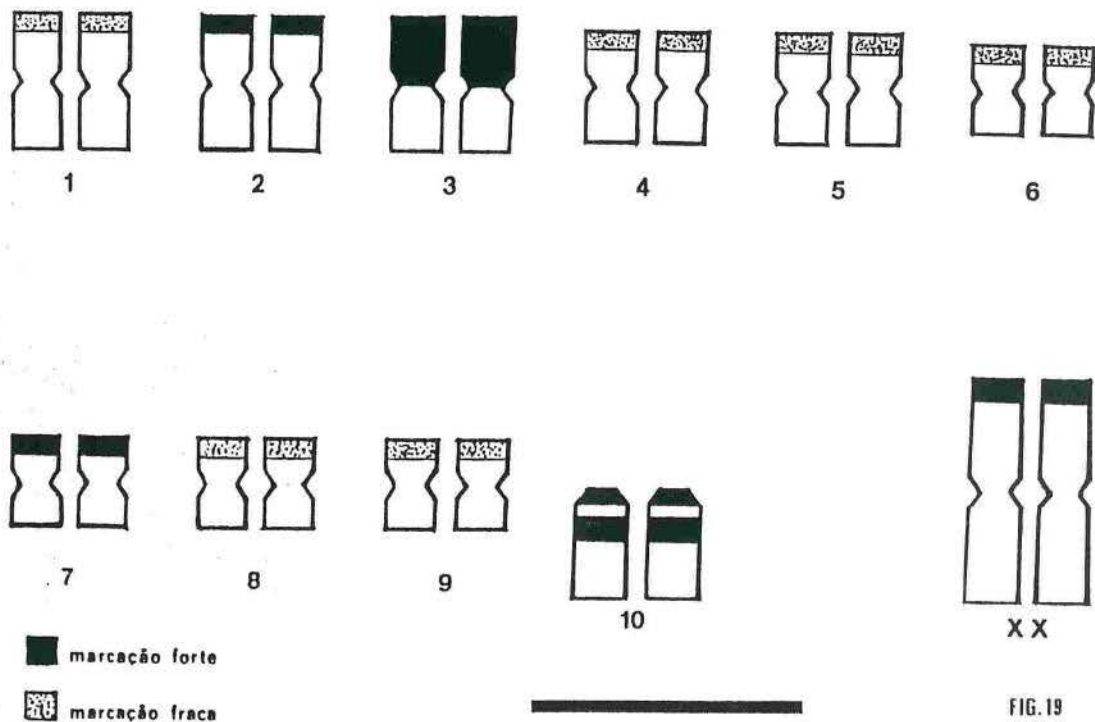


FIG. 19

Figura 19: Visão esquemática dos cromossomos de *B. microplus* obtidos por técnica de banda C. Barra = 10 μm.

## 3.5 - Bandeamento NOR

Em preparações de núcleos mitóticos através de técnica com coloração por prata verificou que em um dos cromossomos X e em um dos cromossomos de um par autossômico haviam bandas para região organizadora de nucléolo (Figura 20).



Figura 20A: Preparação de gônada de fêmeas em estágio de ninfa de *B. microplus* obtidas por bandeamento NOR. Setas indicam marcações em um autossômico maior e em um dos cromossomos X. Barra = 10  $\mu$ m.

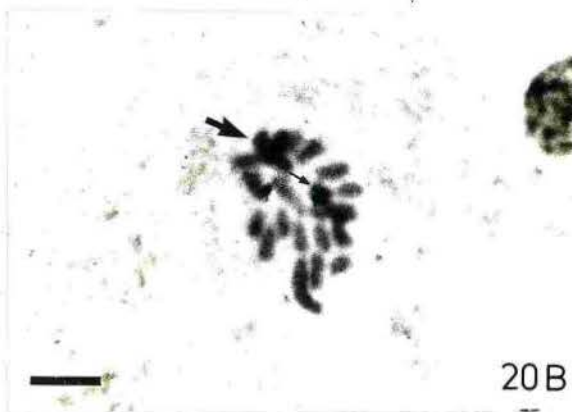


Figura 20B: Outro núcleo obtido por bandeamento NOR. Setas indicam marcações. Barra = 10  $\mu$ m.

## 3.6 - Bandeamento G

Em preparações de núcleos mitóticos através de técnica de bandeamento G não obteve-se um padrão esperado de formação de bandas que permitisse o reconhecimento dos pares. Para os diferentes tempos de exposição à tripsina utilizados os cromossomos apresentaram-se sempre totalmente corados, não havendo um padrão entre os pares (Figura 21).

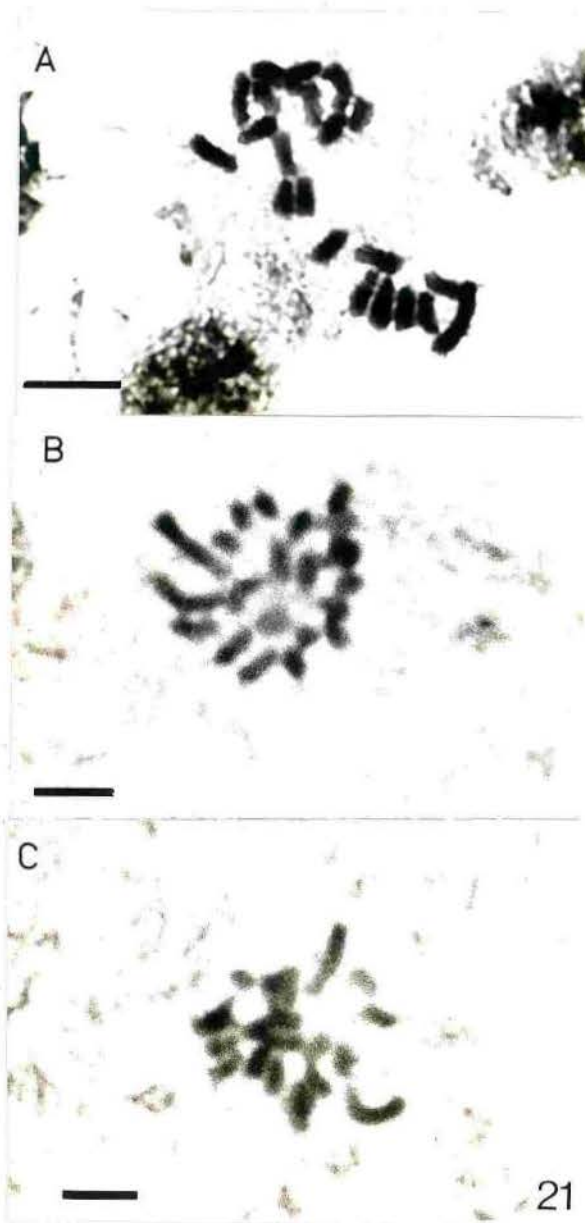


Figura 21: Bandeamento G com exposição à tripsina em diferentes concentrações e tempos. A - tripsina a 0,02% em 10 segundos; B - tripsina a 0,02% em 5 segundos; C - tripsina a 0,01% em 1 segundo. Barra 10  $\mu$ m

#### 4 - DISCUSSAO

Através deste estudo realizado nos cromossomos do carrapato bovino *B. microplus*, foi possível esclarecer e até mesmo reformular idéias que já haviam sido propostas em relação a este organismo. Da mesma forma também foi possível estabelecer comparações interessantes entre *B. microplus* e outras espécies de carrapatos no campo da citogenética por técnica convencional.

Nos estudos com bandeamento, muito pouco realizados em carrapatos, especialmente em *B. microplus*, dados novos foram trazidos podendo estes ser de grande utilidade para melhor conhecimento e controle deste organismo.

##### 4.1 - Figuras meióticas e mitóticas

A dificuldade que Oliver e Brinton, 1972, e que Kanh, 1964, encontraram para descrever estágios de Prófase I em *Ixodidae* utilizando uma terminologia ortodoxa, foi encontrada também para *B. microplus* em nosso estudo, quando comparado com figuras de Prófase I analisadas em outros carrapatos e para o próprio *B. microplus* em estudo anterior.

O que Kanh denomina para uma determinada configuração cromossômica em *I. ricinus* como sendo segunda Prófase e segunda

Métáfase, no estudo por nós realizado em *B. microplus*, configurações muito semelhantes receberam a denominação de Telófase II tardia e Telófase II (Figuras 10C e 10D) respectivamente, devido ao fato das cromátides já estarem separadas e em início do processo de desespiralização.

Também comparando os nossos dados com os do trabalho de Newton et al., 1972, para o gênero *Boophilus*, o que é descrito por estes autores para *B. microplus* como sendo uma Diacinese em Prófase I da Meiose, nós descrevemos como uma Anáfase II (Figuras 10A e 10B) da Meiose pelo fato das cromátides apresentarem-se separadas. Na figura de Newton et al. não há evidência de terminalização de quiasmas (o que caracteriza este estágio) e o próprio grau de espiralização dos cromossomos descarta a possibilidade de ser uma Diacinese.

As fases Metáfase I, Anáfase I e Prófase II não foram detectadas nos núcleos meióticos aqui analisados, provavelmente por serem estágios muito rápidos.

A detecção de figuras mitóticas (Figuras 4A, B, C, D, E e F) e meióticas abundantes (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10) em *B. microplus* só foi possível em estágio de Ninfa e de machos adultos. Foi observado no nosso trabalho como no de Oliver e Osburn, 1977, para *O. megnini* e *O. lagophilus*, uma relação entre período de início, quantidade de alimentação e desencadeamento dos processos de divisão celular em *B. microplus*. Este achado foi confirmado pelo fato de que em ovos e larvas infestantes analisadas não localizou-se divisões celulares, sendo que estes correspondem aos períodos onde o carrapato ainda não



alimentou-se.

Da mesma a associação entre fase alimentar e divisões celulares foi verificada em Neóginas jovens que apresentavam poucos núcleos em divisão mitótica. Nesta fase o processo de alimentação já está em estágio mais avançado e um claro declínio no número de placas metafásicas, ou outras fases, foi detectado.

Parece existir um período ideal para divisões havendo, portanto, certamente, relação íntima deste fato com os processos metabólicos que se desencadeiam ao início do engurgitamento. Essas observações, entretanto, precisam ser quantificadas, o que será feito em trabalho posterior.

#### 4.2 - Configurações e números cromossômicos

Como discutido por Oliver, 1965, para a maioria dos carrapatos *Metastricata* (ou *Ixodidae*), também chamados carrapatos duros ("hard ticks"), foi confirmado o número de cromossomos para *B. microplus* como sendo de  $2n = 22$  para fêmeas e  $2n = 21$  para machos com mecanismo de determinação sexual do tipo  $XX^O:XO^{\sigma}$  (Figura 11).

Porém, pontos de divergência surgem quanto à localização do centrômero observado no presente trabalho e no realizado por Oliver e Bremner, 1968, para *B. microplus* e outras espécies de carrapatos.

No trabalho que realizamos, a análise de núcleos meióticos e a montagem do cariótipo a partir destes, revelaram claramente a configuração metacêntrica dos cromossomos, inclusive

o X, com exceção do cromossomo número 10, que se mostrou acrocêntrico (Figuras 12 e 13). Este dado diverge do descrito por Oliver e Bremner que, mesmo observando preparações de núcleos meióticos, classificam os cromossomos de *B. microplus* como acrocêntricos.

Em cromossomos mitóticos a posição do centrômero não ficou evidente para nós (Figura 11). Gunn e Hilburn, 1991, obtiveram também esta ausência de clareza para localização de centrômeros em cromossomos mitóticos de linhagens de laboratório de *Amblyomma cajennense*, demonstrando ser esta característica própria de cromossomos mitóticos de carrapatos.

A técnica de bandeamento C, entretanto (como será discutido mais adiante), contribuiu para, de certa forma, reforçar a idéia de que seria possível que cromossomos mitóticos de *B. microplus* poderiam ser metacêntricos. Esta idéia contraria o que já foi descrito anteriormente por Oliver e Bremner, 1968, também para *B. microplus* e outras descrições para a maioria dos carrapatos onde os cromossomos mitóticos são tidos como acrocêntricos. As configurações das figuras 16, 17 e 18 são bastante elucidativas a este respeito.

Os cromossomos autossômicos em meiose apresentam pouca diferença de tamanho entre si (Figuras 12 e 13), mas em mitose observou-se que havia uma diferenciação, principalmente em relação ao cromossomo X. Os autossomos maiores em núcleos mitóticos demonstraram manter um padrão em torno da metade do tamanho do X e sempre um autossomo do par número 3 apresentava uma constrição subterminal (Figuras 11 e 14). Esta constrição

também foi observada por Kanh, 1964, para *Haemaphysalis leporis palustris* e para *I. ricinus*, sendo que este autor descarta a possibilidade desta constrição ser um centrômero, pois nos carrapatos que ele analisou a região centromérica era bem evidente. O significado desta constrição será discutido mais adiante no item bandeamento NOR.

Diferentemente do que Kanh, 1964, analisou em figuras de Metáfase mitótica para *I. ricinus* (segundo o autor, Prostriata com mecanismo de determinação sexual XX:XY, onde destaca a dificuldade em discernir o cromossomo X dos demais autossomos), em *B. microplus* o cromossomo X é bem visível em Metáfases mitóticas sendo reconhecido pelo seu tamanho duas vezes maior que o maior cromossomo autossômico (Figura 14).

Há uma diferença visível, como também em *D. andersoni*, no tamanho do X por nós encontrado, quando comparado com os demais autossomos.

Em relação ao tamanho do cromossomo X em núcleos meióticos nossos dados concordam com os de Newton et al. 1972, que observaram pouca diferença do cromossomo sexual em relação aos autossomos (Figura 13).

Em figuras meióticas Oliver, 1968, para o carrapato *H. anatolicum excavatum*, e Newton et al., 1972, para *B. microplus*, detectaram a migração precoce do cromossomo X em Metáfase meiótica. Em nossas preparações de *B. microplus* não detectamos este comportamento do cromossomo X (Figuras 9A e 9B), mesmo porque foram poucas placas metafásicas detectadas, dentre os

muitos núcleos examinados.

Em algumas preparações para cromossomos mitóticos, observamos como Newton et al., 1972, pontes entre o cromossomo X (Figura 5) em Anáfase mitótica, mas isto parece não influenciar na segregação normal dos cromossomos, visto que não foram encontrados indivíduos com cromossomos supranumerários. Oliver et al., 1974, destacam no seu estudo a raridade de cromossomos supranumerários em Acari.

Apenas um indivíduo com núcleos poliplóides foi detectado dentre todos os 40 avaliados (Figura 15). Poliploidia em *B. microplus* foi relatada anteriormente num trabalho de Oliver e Bremner, 1968, como sendo consequência de reprodução partenogenética ocasional em condições naturais. Em nosso trabalho não temos elementos para sugerir a causa da poliploidia, já que as linhagens estudadas foram mantidas em condições de laboratório.

#### 4.3 - Bandeamento C

A técnica de bandeamento C foi fundamental neste estudo para determinar com maior clareza os pares cromossômicos. Diferentemente dos objetivos dos estudos de técnica de bandeamento realizados até então e analisados na introdução deste trabalho, visamos uma comparação entre os cromossomos dos indivíduos da mesma espécie e não comparações citotaxonômicas. No entanto, os resultados relatados em outras espécies de carrapatos sem dúvida auxiliam no sentido de obtermos parâmetros coerentes para a análise dos nossos dados.

Analisando o que se obteve para *B. microplus* verificamos que existe uma grande probabilidade de que a maioria das regiões heterocromáticas reveladas pelo bandeamento C estejam nas regiões teloméricas e não centrométricas, como relataram Gunn e Hilburn, 1989 e 1990, para as espécies de carrapatos estudadas.

Esta afirmação parte do princípio de que comparando-se as marcações de bandeamento C em cromossomos de núcleos meióticos (Figura 18) que são, sem dúvida, metacêntricos, não havia nestes região heterocromática nos centrômeros, mas somente nos telômeros. Supondo-se que esta região heterocromática mantenha-se relativamente conservada ao longo dos processos de divisão celular as marcações obtidas em cromossomos mitóticos (Figura 16 e 17) poderiam ser, portanto, telômeros. Gunn e Hilburn, 1989, colocam que é possível a existência de heterocromatina em outros sítios que não no centrômero (ou ainda na região de NORs), mas não apresentam nenhuma evidência experimental neste sentido em carrapatos.

Para *B. microplus* o bandeamento C foi diferente do padrão obtido por bandeamento NOR (que será discutido mais adiante), não concordando com o que Gunn e Hilburn, 1989, observaram no carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Estes autores encontraram coincidência entre regiões marcadas por bandeamento C e NOR. No entanto, em um ponto nosso trabalho teve concordância ao dos autores citados: a região de provável NOR, que encontramos no par 3 foi também corada por bandeamento C, mas não havia marcação mais intensa nos pontos coincidentes. Aqueles autores justificam o excesso de marcação pelas duas técnicas no mesmo

local, como devido ao fato de que alguma classe de proteínas existentes no centrômero serem semelhantes as da NOR.

As duas bandas obtidas no par número 10 (Figura 16) em algumas preparações apresentavam uma má resolução sendo difícil de ser analisadas. Também ocorreram algumas variações nos tamanhos das bandas, sendo que este fato se deve, segundo o que Gunn e Hilburn, 1990, relataram em *D. occidentalis* ao grau de espiralização diferenciada dos cromossomos.

Os padrões de bandas Cs obtidos em *B. microplus* para os demais autossomos e para o cromossomo X, partindo-se do princípio que são todos metacêntricos, não coincide com as demais espécies já analisadas na introdução deste trabalho. Isto evidencia, portanto, que a técnica de bandeamento C revela aspectos muito particulares dos cromossomos de cada espécie. Tanto isto parece ser verdadeiro que Gunn e Hilburn, 1990, utilizando técnica de bandeamento C, além de outras, descreveram em *Amblyomma cajennense* diferentes aspectos envolvidos na variação do número cromossômico em linhagens de laboratório, detectando quais os cromossomos supranumerários em núcleos com números aberrantes.

#### 4.4 - Bandeamento NOR

Para *B. microplus*, como descrito por Hilburn et al., 1989, foram localizada um par de NORs (Figuras 20 e 21).

Uma das marcações, presentes em um dos autossomos maiores, provavelmente coincide com a região que mostra uma constrição subterminal em um dos autossomos do par 3 em

preparações convencionais (Figuras 11 e 14). Relação entre esta constrição e NORs já foi relatada anteriormente (Kanh, 1964; Gunn e Hilburn, 1990) para outros carrapatos.

Diferentemente das demais espécies de carrapatos estudados por Gunn e Hilburn, 1989, 1990 e 1991, *B. microplus* apresentou marcação para NOR em um dos braços de um cromossomo X. Esta marcação coincide com algumas de banda C, sem no entanto, estes pontos comuns serem mais intensamente corados nesta técnica, como relatado para *D. andersoni* (Gunn e Hilburn, 1990) que apresentava em banda C uma coloração mais intensa à presença de heterocromatina adicional associada a Região Organizadora de Nucléolo (NOR).

Se isto for verdadeiro o resultado obtido em *B. microplus*, com marcação coincidente de NOR e região heterocromática no par 3 e no cromossomo X podem indicar esta associação. Esta possível associação entre NOR e heterocromatina também é, interessante no sentido que reforça a idéia atual de que regiões heterocromáticas também possam eventualmente transcrever.

Não foi observado em *B. microplus* a associação entre NOR e nucléolo no estágio de Neógina analisado. Suporte a esta observação vem da proposta (Garcia et al., 1991) de que o nucléolo em *B. microplus* esteja intimamente associado a um processo de rápida síntese proteica durante a vitelogênese nos ovócitos. Este processo ocorreria a partir de uma amplificação de RNA que provocaria alterações detectáveis no aspecto do nucléolo em estágios sucessivos da vitelogênese.

Provavelmente o nucléolo não tornou-se evidente nas preparações analisadas no presente trabalho devido ao fato de que a amplificação, ou até mesmo a estruturação nucleolar não estivessem ocorrendo nos estágios analisados.

#### 4.5 - Bandeamento G

Os resultados obtidos através das concentrações e tempos de exposição à tripsina usado no nosso material não foram conclusivos, pois não se obteve padrões claros de bandas, como encontrado para outros organismos apesar de exaustivas tentativas.

Embora novas concentrações e tempos possam ser utilizados para estudos posteriores nossa experiência com o material nos permite propor como mais promissores o uso de técnicas tais como as que utilizam colorações por fluorocromos (cromomicina A<sub>3</sub>, que revela regiões ricas em GC, e DAPI, que localiza regiões ricas em AT) e as que exploram os padrões de bandas gerados por endonucleases de restrição como Alu (padrões semelhantes a bandas C) e Hae III (padrão semelhante a bandas G).

Com o uso das técnicas acima mencionadas, além da de Acridina orange, até o momento não aplicadas a *Boophilus*, estamos precisos sobre o seu cariótipo dos que oferecidos pelas bandas G.



## 5 - RESUMO E CONCLUSÕES

Visando contribuir para o conhecimento do cariótipo de *Boophilus microplus* e assim obter informações sobre sua biologia básica que possam auxiliar no controle das infestações por este organismo em gado, no presente trabalho foram estudadas as constituições cromossômicas de 40 indivíduos de ambos os sexos nas fase de ninfa, neandro, gonandro e neógina.

Foram utilizadas técnicas de coloração convencional, de bandeamento C, G e NOR.

Com a técnica convencional utilizada obteve-se a confirmação do número cromossômico de  $2n = 22$  com determinação sexual do tipo XX:XO. Observou-se que o cariótipo de *B. microplus* é constituído de nove pares metacêntricos, inclusive o X, e de um acrocêntrico, apesar da constatação de outros autores de serem eles todos acrocêntricos. Nas preparações para cromossomos mitóticos a posição do centrômero não é evidente; no entanto, para cromossomos meióticos, observou-se com clareza a sua posição. Esta característica parece ser própria de cromossomos mitóticos de carrapatos segundo observações feitas para o gênero *Amblyomma*.

Nas figuras meióticas em testículo de macho adulto

(gonandro), não foi detectada a migração precoce do cromossomo X, descrita por outros autores, em placa metafásica, uma vez que elas foram raras nas preparações obtidas. Metáfase I, Anáfase I e Prófase II são de difícil detecção provavelmente por se constituírem de estágios muito rápidos.

Por bandeamento C, os pares apresentaram pouca quantidade de heterocromatina, predominando uma banda nas regiões teloméricas. O cromossomo sexual possui uma banda muito pequena em apenas um dos telômeros. O par número 3 apresenta uma banda maior que ocupa metade da cromátide e o par 10 (que é acrocêntrico) apresenta duas bandas, uma próxima e outra no centrômero. O estabelecimento dos pares foi facilitado pelo bandeamento C, sendo possível verificar que não havia polimorfismos entre eles e o mesmo padrão de bandas repetia para indivíduos diferentes, mesmo sendo de outras cepas. Em algumas preparações as bandas eram difusas, da mesma forma que outros autores encontraram, atribuindo esta diferença a graus de condensação diferentes dos cromossomos. Diferentemente dos trabalhos já descritos com bandeamento em carrapatos, a presença de heterocromatina foi indicada em *B. microplus* na maioria dos pares, para as regiões teloméricas e não apenas para os centroméricos.

Por bandeamento NOR, um dos cromossomos X e um cromossomo de um par autossômico demonstraram banda para a Região Organizada de Nucléolo (NOR). Uma freqüente constrição em Metáfase mitótica havia sido descrita para *Haemaphysalis leporis palustris*, sendo que uma destas constrições, provavelmente a mais terminal, seria um sítio de organização nucleolar. Em *B.*

microplus observou-se esta constrição e quando foi realizada coloração à base de prata caracterizou-se uma região NOR em um braço de um autossomo maior, provavelmente o mesmo do par 3. Também em um dos cromossomos X houve caracterização de uma banda NOR.

Para bandeamento G não obteve-se o padrão esperado de formação de bandas que permitisse um reconhecimento dos pares, mesmo sendo testadas concentrações e tempos diferentes de exposição a tripsina. Desta forma, sugerimos ao invés de novas tentativas com tripsina, o uso de endonucleoses de restrição, de fluorocromos e de acridina orange para melhor resolução da estrutura cromossômica de *Boophilus microplus*.

## BIBLIOGRAFIA

- BIANCHI, M.S.; BIANCHI, O.N.; PANTELIAS, G.E.; WOLFF, S.; 1985. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. Chromosoma. 91: 131-136.
- BANERJEE, S.K.; BANERJEE, S.; MUKHERJEE, A.S.; 1988. Silver nitrate stained non-ribosomal cistrons in Drosophila hydei polytene chromosome. Drosophila information service. June, Dis. 67-10.
- BICUDO, H.E.M.; 1982. Silver staining and the nucleolar organizing activity in Drosophila species of the Muller complex and their hybrids. Rev. Brasil Genet. V, 1, 31-50 (Brazil J. Genetics).
- BICUDO, H.E.M.C.; REVAZZI, L.M.; NANYA, S.; 1992. Simplified ag-staining technique for nucleolar organizing regions and nucleoli. Rev. Brasil Genet. 15, 1, 199-200. (Brazil J. Genetics).
- BLOOM, S.E.; GOODPASTURE, C.; 1976. An improved technique for selective silver staining of Nucleolar Organizer Regions in human chromosomes. Hum. Genet. 34, 199-206.
- COMINGS, D.E.; AVELINO, E.; OKADA, T.A. & WYANDT, H.E. 1973. The mechanism of C- and G- banding of chromosomes. Exp. Cell Res. 77: 469-493.
- EPHRUSSI, B. and BEADLE, G.W.; 1936. A technique of transplantation for Drosophila melanogaster. Amer. Natur. 70: 218-225.
- FLECHTMANN, C.H.W.; 1973. Acaros de importância médico-veterinária. São Paulo, Nobel. 192 p.
- GARCIA, R.N.; ESTANIECKI, R.F.; GARCIA, C.; GARCIA, S.M.L.; 1991. Ovogênese e fecundação em Boophilus microplus. In: III Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre, RS, Brasil. p. 55.
- GONZALES, J.C.; 1975. O controle do carrapato dos bovinos. Porto Alegre, Sulina, 104 p.

- GUNN, S.J.; HILBURN, L.R.; Differential staining of tick chromosomes: Techniques for C-Banding and silver-staining and Karyology of Rhipicephalu sanguineus (Latreille). J. Parasitol. 75(2): 239-245.
- GUNN, S.J.; HILBURN, L.R.; 1990. Cytosystematics of five North American Dermacentor (Acari: Ixodidae) species. J. Med. Entomol. 27(4): 620-627.
- GUNN, S.J.; HILBURN, L.R.; 1991. Karyotypic variation in laboratory lines of Amblyomma cajennense. Aneuploidy and evidence of an autosomal translocation. J. Med. Entomol., 28(3): 350-356.
- HAYASHI, F. 1986. Chromosome number of the lizard tick, Ixodes asanumai (Acarina: Ixodidae). Int. J. Acarol. 12(4): 221-213.
- HOLMQUIST, G. 1979. The mechanism of C-banding: depurination and beta-elimination. Chromosoma 72: 203/224.
- HOWELL, W.M.; 1977. Visualization of ribosomos gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. Chromosoma. 62, 361-367.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. Experientia 36: 1014-1015.
- KAELBLING, M.; MILLER, D.A.; MILLER, O.J.; 1984. Restriction enzyme banding of mouse metaphase chromosomes. Chromosoma. 90: 128-132.
- KAHN, J.; 1964. Cytotaxonomy of tick. Quart. J. micr. Sci., Vol. 105, pt. 1, pp. 123-37.
- MAIA, V.; LANGGUTH, A.; 1993. Constitutive heterochromatin polymorphism and NORs in Proechimys cuvieri Peter, 1978 (Rodentia, Echimyidae). Rev. Brasil. Genet. 16, 1, 145-154 (Brazil J. Genetics).
- MEZZANOTTE, R. 1986. The selective digestion of polytene and mitotic chromosomes of Drosophila melanogaster by the Alu-I and Hae III restriction endonucleases. Chromosoma 93: 249-255.
- MEZZANOTTE, R.; FERRUCI, L.; VANNI, R.; BIANCHI, V.; 1983. Selective Digestion of Human Metaphase Chromosomes by Alu I Restriction Endonuclease. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. Vol. 31, N<sup>o</sup> 4, pp. 553-556.
- NEWTON, W.H.; PRICE, M.A.; GRAHAM, O.H.; TREVINO, J.L. 1972. Chromosome Patterns in Mexican Boophilus annulatus and B. microplus. Ann. Ent. Soc. Am. 65(2): 508-512.

- OLIVER, J.H. Jr.; 1965. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea) II Multiple sex chromosomes. Chromosoma 17, 323-327.
- OLIVER, J.H. Jr.; 1966. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea) I. Karyotypes of the two Ornithodoros species (Argasidae) restricted to Australian. Ann.Ent.Soc.Am. 59: 144-171.
- OLIVER, J.H. Jr. & BREMMER, K.C. 1968. Cytogenetics of tick. III chromosomes and sex determination in some Acaestralian hard tick (Ixodidae). Ann.Ent.Soc.Am. 61: 837-844.
- OLIVER, J.H. Jr. 1968. Cytogenetics of ticks (Acari-Ixodoidea). 8. Chromosomes of six species of Egyptian Hyalomma (Ixodidae). J. Parasit. 58(3): 611-613.
- OLIVER, J.H. Jr. & BRINTON, L.P. 1972. Cytogenetics of tick (Acari: Ixodoidea). 7. Spermatogenesis in the Pacific coast tick, Dermacentor occidentalis Mary (Ixodidae). J. Parasitol. 58: 365-379.
- OLIVER, J.H. Jr.; TANAKA, K. & SAWADA, M. 1974b. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea). 14. Chromosome of nine species of asian haemaphysalines. Chromosoma 45: 445-456.
- OLIVER, J.H. Jr. & OSBURN, R.L. 1977. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea). 15. Notes on chromosomes and maturation of Otobius megnini and O. lagophilus. J. Parasit. 63: 176-178.
- OLIVER, J.H. Jr. 1985. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea). 17. Chromosomes of two Amblyomma species from the Galapagos Islands. J.Kans.Entomol.Soc. 58(3): 549-553.
- PEREIRA, H.C.; 1982. Revisão taxonômica e morto biológica - Boophilus microplus (Canestrini, 1887). Rio de Janeiro, Químico Divisão Veterinária, 105 p.
- RAMOS, C.M.; 1976. Investigaciones realizadas en el campo de la parasitología veterinária - El ciclo parasitário de carrapato. Ministério do Desenvolvimento de Agropecuária. Fac. Cien. Nat. Far., Ed. Esp. Univ. Paraná.
- SHAH-FISCHER, M.; SAY, R.R.; 1989. Manual of tropical veterinary parasitology. p. 360-361.
- SOUZA, M.J.; SILVA FILHA, M.H.N.L.; 1993. Effects of extra chromosome segments on chiasma distribution in Xylens angulatus (Ortoptera: Romaleidae). Rev. Brasil. Genet. 16, 1, 23-33 (Brazil. J. Genetics).
- SUMMER, A.T.; 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell. Res. 75. 304-306.
- SUMMER, A.T. 1982. The Nature and Mechanisms of Chromosome Banding. Can.Genet.Cytog. 6: 59-87.