

CAROLINA DE BARROS MACHADO DA SILVA

**CROMOSSOMOS B E MAPEAMENTO FÍSICO DOS SÍTIOS DE DNAr 18S
E HISTONA H3 E H4 NO GAFANHOTO *Xyleus discoideus angulatus*
(ROMALEIDAE)**

**RECIFE
FEVEREIRO – 2011**

CAROLINA DE BARROS MACHADO DA SILVA

**CROMOSSOMOS B E MAPEAMENTO FÍSICO DOS SÍTIOS DE DNAr 18S
E HISTONA H3 E H4 NO GAFANHOTO *Xyleus discoideus angulatus*
(ROMALEIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Maria José de Souza Lopes
Departamento de Genética, CCB, Universidade Federal de Pernambuco.

Co-orientadora: Dr^a. Vilma Loreto da Silva
Departamento de Genética, CCB, Universidade Federal de Pernambuco.

**RECIFE
FEVEREIRO - 2011**

Silva, Carolina de Barros Machado da
Cromossomo B e mapeamento físico dos sítios de DNAr 18S e histona
H3 e H4 no gafanhoto *Xyleus discoideus angulatus* (ROMALEIDAE)/
Carolina de Barros Machado da Silva. – Recife: O Autor, 2011.

82 folhas : il., fig, tab.

Orientadora: Maria José de Souza Lopes.

Co-orientadora: Vilma Loreto da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2011.

Inclui bibliografia e apêndice.

1. Cromossomos 2. Gafanhoto 3. Genética I. Título.

575.7015

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-105

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

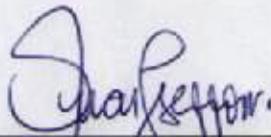
**Parecer da comissão examinadora da Dissertação de:
Carolina de Barros Machado da Silva**

Intitulada:

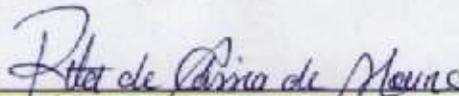
**Cromossomos B e mapeamento físico dos sítios de DNAr 18S e histona H3 e H4 no gafanhoto
Xyleus discoideus angulatus (Romaleidae)**

A comissão examinadora considera o presente trabalho

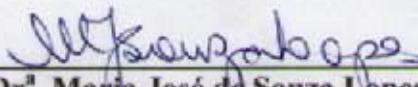
**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Carolina de Barros Machado da Silva
faz jus ao grau de Mestre em Ciências Biológicas pela UFPE. Recife, 25 de fevereiro de 2010.**



**1º Examinador: Profª. Drª. Ana Maria Benko Iseppon
Universidade Federal de Pernambuco / UFPE**



**2º Examinador: Profª. Drª. Rita de Cássia de Moura
Universidade de Pernambuco / UPE**



**Orientador: Profª. Drª. Maria José de Souza Lopes
Universidade Federal de Pernambuco / UFPE**

Dedico à Família Machado, Paulo, Rosana, Paula e Mariana, por estarem sempre ao meu lado nessa jornada! Agradeço a eles por todo amor e carinho. E, ao meu Avô, Augusto (*in memoriam*), pelos pequenos momentos que me fizeram sentir importante.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, renovado após cada provação que se apresenta e nos sonhos que se concretizaram, pela oportunidade de aprender e conviver com pessoas tão especiais e, principalmente, por iluminar meus caminhos mais escuros.

Aos meus pais, Paulo César e Rosana Andrade, e minhas irmãs, Paula e Mariana, que, com muito amor, carinho, compreensão e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM), pelo suporte científico para desenvolver esse trabalho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudos. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) pelos dois anos de Mestrado.

À professora Maria José de Souza Lopes pela orientação, incentivo, confiança e muita paciência durante todo esse trabalho. Agradeço também pelas broncas e comentários construtivos, feitos nos momentos oportunos, que me tornaram uma pessoa mais crítica e objetiva frente à ciência.

À minha co-orientadora Vilma Loreto da Silva pela amizade, apoio, por todas as dúvidas tiradas e pelas valiosas conversas durante o trabalho. Agradeço principalmente por me fazer amar o que faço, por sempre me incentivar a ler o próximo artigo e entender que é necessário buscar sempre mais do que eu sei.

Ao professor Carlos Salvador Carbonell, da Universidade de Montevideu, pela identificação taxonômica da espécie estudada e por mostrar que a idade não é limite para fazermos o que amamos.

À Marcela Souza Bernades, do Departamento de Genética, pelo auxílio na estatística empregada nos resultados do trabalho.

Às pessoas que me acompanham por um longo tempo (quase 14 anos) e que através deles sinto que amadureço cada dia um pouquinho mais: Adriano, Arthur, Elilma, Francisco, Guilherme, Hugo, Jerônimo, Rafael Costa, Rafael Branquinho, Roberta e Rodolfo. Agradeço a vocês por ser quem sou hoje. À Ruthanna por ser essa menina linda! Mesmo estando tão distante sei que você é a pessoa que posso contar de olhos vendados. Agradeço muito por todas as conversas, pelos SMS depois das festas, pelas saídas, pelos conselhos, pelos programas de índio e principalmente por entender esse meu jeito louco de ver a vida!

Aos meus amigos de faculdade Bruno Rafael, Bruno Vila Nova, Daniela Moura, Laura Leal e Mirela D'arc que apesar da falta de tempo ou da grande distância física entre nós, sempre se fizeram presentes por telefone ou por e-mail. A vocês agradeço por tudo que vivi e me tornei nos últimos seis anos. À Eloína Maria pela agradável companhia durante meus trabalhos, conselhos e por me dizer que aquilo eram primers inespecíficos.

A todas as pessoas que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Genética e Citogenética Animal (o melhor de todos!), em especial aos amigos Adriana, Albérico, Allison, Amanda, Cibele, Izaquiel, Jefferson, Jéssica, Kalyne, Katarina, Luana, Luiz, Marcos, Merilane, Santelmo, Suelen e Tyago, por me fazer crescer profissionalmente, pela ajuda na hora de pensar em como discutir esse trabalho, pelos almoços, pelo cinema, pelos jogos de dominó, por ficarem até tarde no Laboratório conversando potoca e principalmente pelas confraternizações e impresadinhos. Agradeço muito a vocês por me tirarem dos momentos mais chatos e estressantes desse mestrado! À Cirlene Maria pela grande amizade, conversas construtivas, boas gargalhadas e principalmente pela maravilhosa companhia de coleta, tenho certeza que não irei esquecer nenhuma delas nem das nossas fotos. E, à professora Neide Santos, por ser essa pessoa espetacular: humana, compreensiva e simpática, quase uma mãe para todos nós! Obrigada pela oportunidade no Estágio a docência (pode sempre contar comigo).

Aos meus professores de colégio, agora grandes amigos, Jordão, Luís Fernando, Marcos Bazante, Mauro Azevedo e Suzana por me incentivarem a seguir meus sonhos e por acreditarem, as vezes mais do que eu, que sou capaz de conseguir até mesmo o impossível.

E, a duas peças fundamentais para minha existência: Hugo e Carol Carolina, por terem me acompanhado durante todo esse tempo, proporcionando-me situações muito divertidas e ensinando que ninguém pode viver sozinho.

“É preciso força pra sonhar e perceber que a
estrada vai além do que se vê.”
Marcelo Camelo

RESUMO

Os cromossomos B são elementos genéticos adicionais ao complemento normal que se caracterizam por um comportamento não mendeliano de herança e pela falta de homologia com os cromossomos do cariótipo. O gafanhoto *Xyleus discoideus angulatus* apresenta ampla distribuição no Nordeste Brasileiro além de polimorfismos para cromossomo B. No presente trabalho, foram analisados cromossomos meióticos de diferentes populações de *X. d. angulatus* com a finalidade de avaliar a prevalência, distribuição e influência do cromossomo B no processo meiótico dessa espécie. Adicionalmente, foi determinada tanto a localização dos sítios de DNAr 18S quanto dos sítios de histonas H3 e H4. Os resultados obtidos revelaram a presença de um único cromossomo B, similar ao X quanto ao tamanho, morfologia, ciclo picnótico e comportamento meiótico, em 29 machos dos 402 exemplares estudados. A presença do cromossomo B foi observada em oito das 11 populações analisadas. Devido a essa ampla distribuição, é provável que o surgimento desse polimorfismo seja antigo. A técnica de FISH permitiu revelar, em indivíduos portadores do cromossomo B, os sítios do gene ribossômico 18S situados na região pericentromérica do cromossomo X e dos bivalentes G₃ e M₄. Adicionalmente, os resultados utilizando sonda para histonas H3 e H4 mostraram a presença de três sítios localizados nos bivalentes G₂, M₄ e no cromossomo X. A ausência de sítios dos genes 18S, H3 e H4 no cromossomo B reforçam a hipótese previamente proposta sobre a provável origem autossômica desse elemento extra.

Palavras chaves: *citogenética, FISH, polimorfismo, população*

ABSTRACT

The B chromosomes are additional genetic elements, characterized by a not Mendelian heritage behavior and lack of homology with the karyotype chromosomes. The grasshopper *Xyleus discoideus angulatus* shows a large distribution in the Brazilian Northeast and presents also B chromosome polymorphisms. In the present paper, meiotic chromosomes from different populations of *X. d. angulatus* were analyzed aiming to evaluate the prevalence, distribution and influence of the B chromosome in this species in the meiotic process. Additionally, the DNAr 18S sites location and the H3 and H4 histone were determined. The obtained results showed the presence of a single B chromosome, similar to X in size, morphology, picnotic cycle and meiotic behavior, in 29 male of the 402 studied specimens. The B chromosome presence was observed in eight of the 11 studied populations. Due to this large distribution, is likely that the appearance of this polymorphism was old. The FISH technique allowed to reveal, in individuals with the B chromosome, the ribossomic 18S gene site, located in the pericentromeric region of the X chromosome and in the bivalents L₃ and M₄. Additionally, the results using probes to H3 and H4 histones showed the presence of three sites located in the bivalent L₂, M₄ and X chromosome. The absence of sites for the genes 18S, H3 and H4 at the B chromosome reinforce the previously proposed hypothesis regarding the probable autosomic origin of this extra element.

Key words: *cytogenetic, FISH, polymorphism, population*

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

	Página
Figura 1 Exemplar de <i>Xyleus discoideus angulatus</i>	19
Figura 2 Diagrama mostrando diferentes mecanismos de acumulação de cromossomos B. a) Acumulação pré-meiótica, o cromossomo B passa por uma não-disjunção mitótica e as duas cromátides-irmãs direcionam-se para um único pólo. b) Acumulação meiótica, ocorre em fêmeas e baseia-se na migração preferencial do cromossomo B para o pólo viável. c) Acumulação pós-meiótica mostrando a não disjunção mitótica de duas cromátides de um cromossomo B e sua preferencial migração para o pólo germinativo (Camacho, 2005).	22
Figura 3 Esquema do modelo de evolução dinâmica dos cromossomos B parasitas no gafanhoto <i>Eyprepocnemis plorans</i> (Camacho, 2002).	23
Figura 4 Estrutura básica dos genes que codificam o RNAr 45S (DNAr) em eucariota. Uma única unidade do repeat (mais a porção adjacente do outro repeat) é mostrada. A região do espaço intergênico também pode ser visualizada (azul) (Raska et al., 2004).	33

Manuscrito 1

Figura 1 Coloração convencional em células meióticas de <i>Xyleus discoideus angulatus</i> com cromossomo B (a-c).a) leptóteno com associação entre X e B (seta). b) leptóteno sem a associação X/B. As setas indicam os cromossomos X e B. c) diplóteno, associação lado-a-lado entre o cromossomo X e B (seta). Indivíduo de <i>Xyleus discoideus angulatus</i> de Lagoa do Carro contendo variação interfolicular no número de cromossomos B (0B-2B) (d-f). d) diplóteno, 2n=23 (0B). e) diacinese, 2n=24 (1B). f) paquíteno, 2n=25 (2B). Barra = 5 µm	71
--	----

- Figura 2** Espermatídes do indivíduo de *Xyleus discoideus angulatus* de Lagoa do Carro contendo variação inter-folicular no número de cromossomos B (0B-2B). Em (a), coloração convencional. Impregnação com AgNO_3 (b, c) destacando espermatídes normais com um centríolo adjunto (cabeça de seta) e anormais (seta) com dois ou mais CAs. Barra = 5 μm 71
- Figura 3** Localização cromossômica dos sítios de DNAr 18S em células meióticas de *Xyleus discoideus angulatus* através da FISH. Em (a), células apresentando duas marcações, uma no bivalente G_3 e a outra no cromossomo X; Em (b), célula apresentando três sítios, localizados nos bivalentes G_3 , M_4 e no cromossomo X; em (c), célula apresentando heteromorfismo para o sítio presente no bivalente G_3 (Coloração DAPI em azul, sítios 18S em vermelho). Barra = 5 μm 72
- Figura 4** Localização cromossômica dos sítios de histona H3 (a) e H4 (b) em células meióticas de *Xyleus discoideus angulatus* através da FISH, situados nos bivalentes G_2 , M_4 e no cromossomo X. (Coloração DAPI em azul, sítios H3 e H4 em vermelho). Barra = 5 μm 72

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1

		Página
Tabela 1	Diferentes locais de coletas do gafanhoto <i>Xyleus discoideus angulatus</i> em Pernambuco.	69
Tabela 2	Frequência de associação entre o cromossomo X e o B em diferentes fases da meiose de machos de <i>Xyleus discoideus angulatus</i> .	69
Tabela 3	Prevalência de cromossomo B em onze populações de <i>Xyleus discoideus angulatus</i> provenientes de diferentes localidades do Estado de Pernambuco. Prevalência foi calculada como porcentagem de indivíduos portadores de B.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Cromossomos do cariótipo
AgNO₃	Nitrato de prata
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenoside-tri-phosphate</i>)
B	Cromossomo B, supernumerário, extra ou acessório
CA	Centríolo Adjunto
CMA₃	Cromomicina A ₃
DA	Distamicina
DAPI	4,6-diamidino-2-fenil-indol (<i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNAr	DNA ribossômico
DNAsat	DNA satélite
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>)
G	Autossomo de tamanho Grande
HC	Heterocromatina Constitutiva
ISH	Hibridização <i>in situ</i> (<i>In situ Hybridization</i>)
ITS	Espaçadores Internos Transcritos (<i>Internal transcribed spacer</i>)
M	Autossomo de tamanho Médio
m	Microespermátide
Mp	Macroespermátide
N	Espermátide normal
NTS	Espaçadores Não-Transcritos (<i>Non-transcribed spacer</i>)
P	Autossomo de tamanho Pequeno
p	Índice de significância
pb	pares de base
RNA	Ácido Ribonucléico
RON	Região Organizadora de Nucléolo
S	Unidade de Sedimentação
SSC	Solução Salina Citrato
X	Cromossomo X

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	16
REVISÃO DA LITERATURA	17
1. Considerações gerais sobre a família Romaleidae: Ênfase para o gênero <i>Xyleus</i>	17
2. Cromossomos B	19
2.1 Aspectos gerais	19
2.2 Cromossomos B em gafanhotos	24
2.3 Efeitos dos cromossomos B em gafanhotos	28
3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	31
3.1 Considerações gerais	31
3.2 Genes ribossomais: 18S e 5S	32
3.3 Família multigênica: histonas.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
MANUSCRITO 1	50
RESUMO	51
INTRODUÇÃO	52
MATERIAIS E MÉTODOS	53
Análise da prevalência e distribuição de cromossomos B	54
Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	55
RESULTADOS	56
DISCUSSÃO	58
AGRADECIMENTOS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
TABELAS E FIGURAS	69
CONCLUSÕES	73
ANEXO	74
APÊNDICE	81

INTRODUÇÃO

Acridoidea representa uma superfamília de gafanhotos com ampla distribuição mundial. Estudos citogenéticos são amplamente realizados nesse grupo, especialmente, em acridomorfos das regiões Paleártica e Neotropical. Entretanto, para essa última, análises com colorações diferenciais e técnicas moleculares têm sido pouco utilizadas. A maioria dos estudos está restrita à análise convencional, caracterizando para muitas espécies a presença de mecanismo de determinação sexual do tipo XX/X0, número diploide $2n=23$, X0 (machos) e $2n=24$, XX (fêmeas) e morfologia acro-telocêntrica.

Além dos cromossomos encontrados no complemento normal, algumas espécies apresentam elementos genéticos adicionais conhecidos como cromossomos B. Estes são caracterizados por um comportamento não-Mendeliano de herança e pela ausência de homologia com os demais membros do complemento. Apesar de serem constituídos geralmente por heterocromatina constitutiva, não são elementos geneticamente inertes. A sua presença no cariótipo de alguns organismos pode alterar a frequência e distribuição de quiasmas, produção normal de espermatídes, fertilidade e fecundidade. Em alguns casos, as características exofenotípicas também podem ser afetadas. Diferentes estudos têm revelado que em cromossomos B os diferentes fatores ambientais, seletivos, históricos e de transmissão são determinantes nas diferenças interpopulacionais destes elementos.

Apesar de existirem inúmeros estudos sobre cromossomo B analisando especialmente sua distribuição, origem, transmissão e integração com o genoma, pouco se sabe sobre sua composição. A técnica de FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente) tem revelado que a grande maioria dos cromossomos B estudados até o momento é constituída de DNA repetitivo, especialmente DNA satélite e DNA ribossômico. Recentemente, genes de histona H3 e H4, também têm sido utilizados em estudos de evolução e rearranjos cromossômicos desses elementos supernumerários, por serem altamente conservados evolutivamente.

Para gafanhotos, o organismo modelo no estudo de cromossomos B é a espécie *Eprepnemis plorans* (Acrididae), com mais de 50 tipos diferentes de cromossomo B. A família Romaleidae apresenta poucos casos de polimorfismos para cromossomos extras descritos na literatura. Os únicos exemplos são *Zoniopoda tarsata* e *Xyleus discoideus angulatus*. Esta última espécie está distribuída por todo Nordeste brasileiro, habitando diferentes ecossistemas; apresenta o cariótipo padrão para a família constituído de $2n=23$, X0 e $2n=24$, XX.

Uma vez que, *Xyleus discoideus angulatus* apresenta polimorfismo para cromossomo B e levando em consideração sua ampla distribuição na Região Nordeste, considerou-se que o uso de ferramentas citogenéticas (Convencional e FISH), além da análise de diferentes populações naturais do estado de Pernambuco contribuiu para o entendimento da dinâmica evolutiva deste elemento extra para a espécie.

OBJETIVOS

Objetivogeral

Caracterizar o cromossomo B quanto à distribuição, à prevalência e ao papel desse elemento extra na meiose de *Xyleus discoideus angulatus*, além do mapeamento físico do gene ribossomal, DNAr 18S e das histonas H3 e H4 no cariótipo da espécie.

Objetivosespecíficos

- 1 – Avaliar a distribuição e prevalência do cromossomo B em distintas populações, comparando estatisticamente os resultados obtidos;
- 2 – Avaliar a possível influência do cromossomo B no processo meiótico dessa espécie;
- 3 – Mapear cromossomicamente os sítios de DNAr18S e de histonas (H3 e H4) em diferentes indivíduos de distintas populações de *X. d. angulatus* portadores de cromossomo B;
- 4 – Oferecer subsídios cariotípicos para um melhor entendimento sobre a distribuição e prevalência de cromossomo B e o seu papel na evolução cariotípica da espécie.

REVISÃO DA LITERATURA

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ROMALEIDAE: ÊNFASE PARA O GÊNERO *Xyleus*

Acridoidea corresponde a uma superfamília da ordem Orthoptera com ampla distribuição mundial que agrupa sete famílias: Proscopiidae, Tristiridae, Ommexechidae, Romaleidae, Pauliniidae, Pyrgomorphidae e Acrididae. Todas essas famílias descenderam de um estoque de acridomorfos primitivos existente durante o Jurássico que se expandiu e diversificou durante o Terciário, devido ao surgimento das pradarias e o desenvolvimento de estepes e semi-desertos (Amedegnato, 1974; Carbonell, 1977).

De acordo com Carbonell (1977) a fauna atual de acridomorfos Neotropicais está constituída por três estratos faunísticos. Estes estratos foram agrupados de acordo com sua origem, distribuição geográfica e época de surgimento nessa região. A família Romaleidae está presente no estrato mais primitivo juntamente com Proscopiidae, Tristiridae e Ommexechidae. Nesse grupo é possível distinguir três linhagens: a mais antiga e divergente das demais famílias corresponde a Proscopiidae; Tristiridae é menos primitiva que a anterior e Ommexechidae e Romaleidae, que estão agrupados, formam a linhagem mais evoluída.

O centro de dispersão da família Romaleidae está localizado na região Amazônica. Amedegnato e Descamps (1982) identificaram quatro centros de dispersão, localizados em: Napo e Ucayali (porção oeste da floresta Amazônica) e Guiana e Madeira (na porção leste). Apesar de ter sua origem na região Neotropical, Romaleidae não é exclusiva desta região. Segundo Carbonell (1977) após o estabelecimento do canal do Panamá ou talvez antes desse evento, através do surgimento das cadeias de ilhas vulcânicas, os romaleídeos invadiram a América Central, México e a parte Sul da região Neártica. Destaca-se que alguns gêneros como *Brachystola*, *Dracotettix*, *Litoscirtus*, *Phrynotettix*, *Romalea*, *Taeniopoda* e *Tytthotyle* têm mostrado ocorrência na região Neártica.

Romaleidae apresenta mais de 80 gêneros e 200 espécies distribuídas em três subfamílias (Romaleinae, Acaucrinae e Trybliophorinae). Tem sido considerada a família Neotropical mais numerosa e diversificada de Acridoidea devido à sua grande irradiação adaptativa em diferentes ambientes, possuindo gêneros tanto em regiões semi-áridas (*Brasilacris*, *Helionotus*, *Staleochlora*, *Radacridium* e *Xyleus*) como em florestas úmidas (*Agriacris*, *Chromacris*, *Tropidacris*, alguns

representantes do gênero *Zoniopoda* e maioria dos representantes da tribo Phaeopariini) (Carbonell, 1977, 1984, 1986, 2002, 2007; Roberts e Carbonell, 1982, 1992).

Xyleus (Gistel, 1848) é um dos 48 gêneros da subfamília Romaleinae cujo centro de origem se localiza na região centro-sul da América do Sul. Este gênero ocorre em alguns estados do Brasil (Goiás, Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais e região Nordeste), norte da Argentina, Paraguai, Bolívia e parte do Peru. Atualmente apresenta uma distribuição geográfica descontínua, sendo encontrado no sul e norte da América do Sul, Leste dos Andes e América Central. Nessas regiões, o habitat é caracterizado por áreas de floresta seca, savana e regiões amplas com árvores e arbustos (Carbonell, 2004).

Como alguns gêneros da subfamília Romaleinae, *Xyleus* revelou problemas quanto à identificação e à distribuição geográfica. A revisão do gênero feita por Carbonell (2004), o qual considerou através da análise de diferentes características, principalmente, do complexo fálco e morfologias externas, 16 espécies que foram reunidas em quatro grupos: Discoideus, Laevipes, Attenuatus e Insignis. O grupo Discoideus abriga os representantes mais primitivos cuja morfologia externa e padrão de coloração são similares, com destaque a ocorrência de cores opacas nos tons de marrom, vermelho e verde. Dentre as características externas principais destaca-se o complexo fálco diferenciado dos demais grupos e o pronoto com a crista alta, geralmente crenulada na parte posterior e sulco transversal do pronoto bem marcado e profundo. O grupo está constituído por cinco subespécies: *Xyleus discoideus discoideus*, *X. d. angulatus*, *X. d. mexicanus*, *X. d. rosulentus* e *X. d. venezuelae*.

Xyleus discoideus angulatus (Stal, 1873) (Figura 1) é uma subespécie endêmica do Nordeste brasileiro, e está distribuída principalmente nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia. Habita diferentes ecossistemas, sendo os mais comuns a Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Carbonell, 2004). Morfologicamente, difere das demais subespécies do grupo Discoideus pela forma do cingulo, válvulas apicais endofálicas e número de espinhos na pata saltatória, que varia de nove a dez. O pronoto com lados nitidamente angulados é o traço mais característico para essa subespécie.



Figura 1: Exemplar de *Xyleus discoideus angulatus*

2 CROMOSSOMOS B

2.1 ASPECTOS GERAIS

O genoma de organismos eucariotas não é composto apenas por genes encontrados nos cromossomos A, que constituem o complemento diploide regular, mas por uma variedade de elementos genéticos que apresentam um mecanismo próprio de herança. Dentre eles, é possível destacar os transposons, alguns elementos responsáveis por distorcer a segregação, vários fatores citoplasmáticos e os cromossomos B (Jones e Rees, 1982; Camacho et al., 1997; Camacho et al., 2000). Estes últimos foram os primeiros a serem descritos na literatura (Wilson, 1907, apud Camacho, 2005).

Conhecidos também como supernumerários ou acessórios, os cromossomos B são elementos genéticos adicionais encontrados no cariótipo de diferentes organismos eucariotas. Por estarem presentes apenas em alguns indivíduos de certas populações são considerados elementos dispensáveis ao desenvolvimento normal dos portadores. No reino animal, mais de 500 espécies foram identificadas contendo esses elementos extras, sendo cerca de 80% dos casos encontrados na classe Insecta, principalmente nas ordens Coleoptera, Diptera e Orthoptera. Nesta última, mais intensivamente investigada, foram registradas aproximadamente 210 espécies com cromossomos B, sendo a maioria pertencente a gafanhotos da família Acrididae (Jones e Rees, 1982; Camacho, 2005).

Os cromossomos B são caracterizados pela ausência de homologia com os demais membros do cariótipo padrão e por seu comportamento não-Mendeliano de herança. Além disso, por serem mantidos em populações naturais por uma variedade de mecanismos de acumulação, são considerados parasitas do genoma. Geralmente possuem comportamento mitótico e/ou meiótico irregulares (instabilidade) permitindo a sua acumulação na linhagem germinativa (Camacho et al., 2000).

Devido à grande variação quanto ao tamanho e morfologia observados em diferentes espécies, Hewitt (1979) agrupou os cromossomos B em quatro categorias: a primeira apresenta cromossomos grandes (macrochromossomos) heterocromáticos, cujo tamanho é similar ao cromossomo X. São caracterizados pela estabilidade durante a divisão celular e, em muitos casos, podem ser derivados do cromossomo X. A segunda reúne o tipo mais comum, cromossomos pequenos cujo tamanho e forma são similares aos menores membros do cariótipo. São frequentemente heterocromáticos e apresentam instabilidade no ciclo de divisão celular. A terceira categoria contém elementos ainda menores do que qualquer membro do complemento, os minicromossomos B. Também apresentam instabilidade e ocorrem em grande número. Podem ser produtos da deleção dos cromossomos A ou de um macrochromossomo B. Por fim, a última categoria agrupa os cromossomos B com morfologia meta ou submetacêntrica (isocromossomos). Uma particularidade desse grupo é que cada isocromossomo durante a meiose formam um anel, resultante do pareamento quiasmático entre seus braços.

Diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar a origem desses elementos. Estudos citológicos e moleculares suportam a ideia de que muitos cromossomos B tenham surgido a partir de autossomos da própria espécie (origem intraespecífica), através de polissomias, ou originados de fragmentos centricos gerados por rearranjos cromossômicos, tais como: translocações Robertsonianas ou ampliações de regiões paracêntricas do fragmento centríco. Em alguns casos, o cromossomo sexual também é indicado como sendo o ancestral do cromossomo supernumerário, devido à grande similaridade em termos de comportamento meiótico, tamanho, morfologia e picnose (Camacho et al., 2000; Bugrov et al., 2004). Outra hipótese sugere que os cromossomos B poderiam ser derivados de cromossomos do complemento de espécies afins, como resultado de uma hibridização interespecífica. A existência de sequências de DNA específicas de cromossomos B de uma espécie que se encontram em outra espécie próxima proporciona uma evidência que corrobora esta hipótese (Camacho et al., 2000; Perfectti e Werren, 2001).

No momento de sua origem, era de se esperar que os cromossomos B apresentassem grandes similaridades com os membros do complemento, o suficiente para promover o pareamento e a recombinação entre os Bs e os cromossomos do complemento A dos quais eles se

originaram. Entretanto, esses elementos apresentaram uma diferenciação e evolução independente no cariótipo através de processos análogos ao “Muller ratchet” (acúmulo irreversível de mutações deletérias na ausência de recombinação) que resultam em um isolamento genético dentro do núcleo. Após o isolamento sináptico, os neo-cromossomos B seguem uma evolução molecular sujeita aos mesmos processos que atuam sobre os cromossomos univalentes, convergindo assim em uma degeneração cromossômica. Por isso terminam sendo um depósito de sequências de DNA repetitivo, DNA ribossômico (DNAr), transposons e outros elementos genômicos (Camacho et al., 2000). A ocorrência de mutações ou de algum mecanismo celular capaz de causar a rápida heterocromatização do cromossomo B poderia ser a base para a sua diferenciação intraespecífica. Por outro lado, os cromossomos B de origem interespecífica não são capazes de se parear com nenhum membro do cariótipo do hospedeiro atual, tornando-se, portanto elementos imediatamente univalentes que tendem a seguir seu próprio padrão evolutivo mais rapidamente do que na origem intraespecífica (Camacho, 2005).

A prevalência de cromossomos B em diferentes populações naturais depende de um conjunto de fatores que, geralmente, atuam simultaneamente: históricos (números de gerações desde o surgimento do elemento), de transmissão (intensidade de acumulação existente entre populações), seletivos (tolerância ecológica dos indivíduos com B) e aleatórios (flutuações genéticas sofridas por populações de tamanho finito). Mesmo com estudos extensivos, tem sido difícil avaliar a importância relativa de cada fator sobre a população estudada (Camacho et al., 2000).

O processo de transmissão e distribuição de cromossomos B para as células-filhas, na maioria das espécies, é similar ao que ocorre com os demais cromossomos do complemento. Porém, existem casos em que a não-disjunção desses elementos ocasiona uma acumulação, resultando em uma variação numérica de Bs entre células de um mesmo indivíduo. Essa acumulação pode acontecer antes, durante ou depois da meiose. Em um mecanismo pré-meiótico a acumulação é derivada da instabilidade mitótica dos Bs durante o desenvolvimento da linhagem germinativa. A acumulação meiótica tem sido preferencialmente descrita em fêmeas, sendo baseada na herança assimétrica, onde os cromossomos B tendem a migrar para apenas um dos pólos, geralmente, para aquele que formará a célula-ovo. O mecanismo pós-meiótico é raro em gafanhotos, ocorrendo comumente em plantas. Consiste em uma não-disjunção do cromossomo B durante a mitose seguida de uma migração preferencial de suas cromátides para um dos pólos na meiose, geralmente o pólo germinativo. A Figura 2 apresenta o esquema proposto por Camacho (2005).

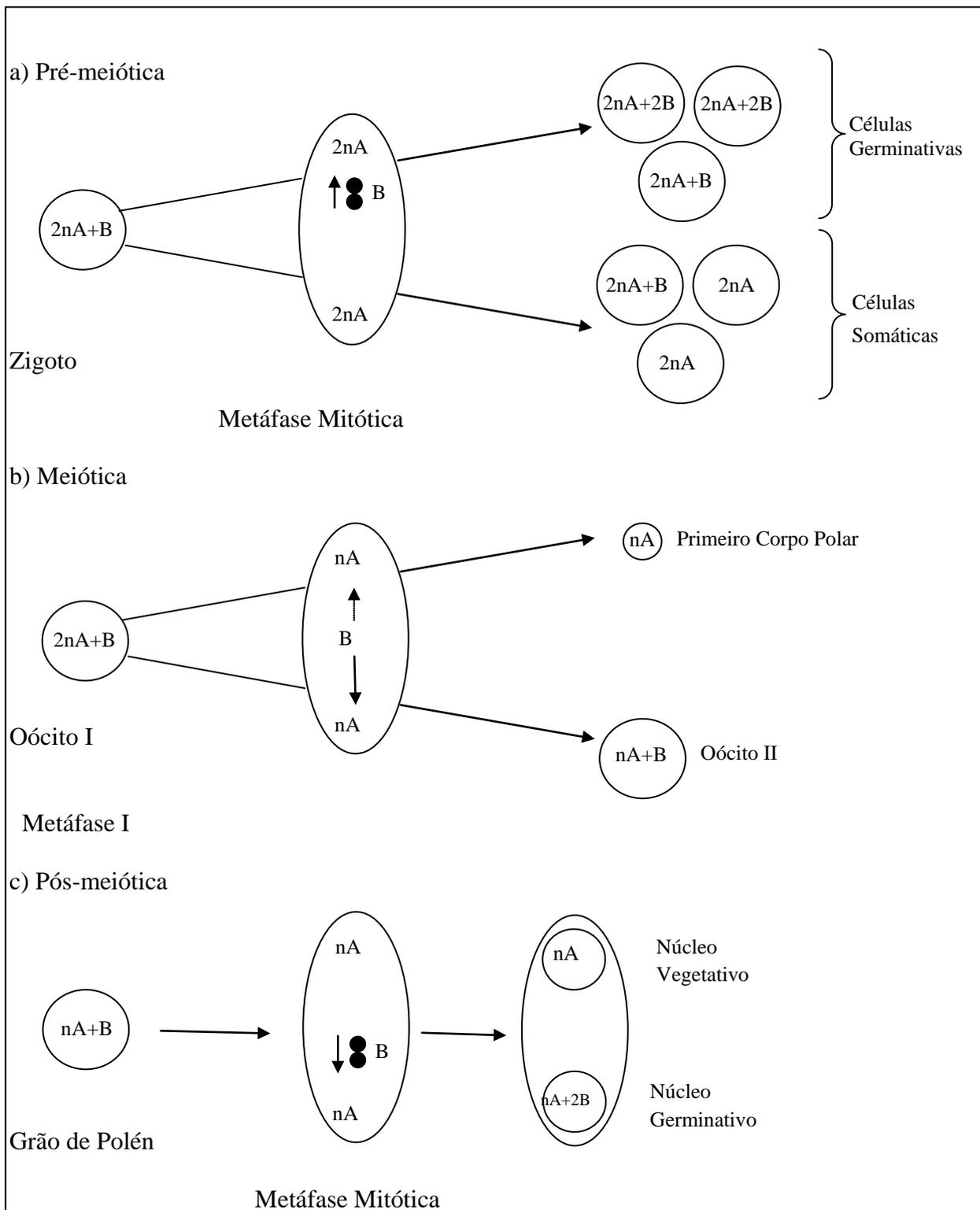


Figura 2: Diagrama mostrando diferentes mecanismos de acumulação de cromossomos B. a) Acumulação pré-meiótica, o cromossomo B passa por uma não-disjunção mitótica e as duas cromátides-irmãs direcionam-se para um único pólo. b) Acumulação meiótica, ocorre em fêmeas e baseia-se na migração preferencial do cromossomo B para o pólo viável. c) Acumulação pós-meiótica mostrando a não disjunção mitótica de duas cromátides de um cromossomo B e sua preferencial migração para o pólo germinativo (Camacho, 2005).

Para explicar a manutenção do polimorfismo de cromossomos B em populações naturais, dois modelos inicialmente foram propostos: 1. Modelo parasita: propõe que o elemento extra se

mantém pela ação de mecanismos de acumulação que contra-balanceiam com seus efeitos deletérios, no equilíbrio do hospedeiro (Östergren, 1945, apud Camacho et al., 2000) e 2. Modelo heterótico: assume que os cromossomos B, mesmo não possuindo mecanismos de direcionamento meiótico, são mantidos devido a efeitos benéficos ao equilíbrio dos indivíduos que os carregam em quantidades menores (White, 1973). Esses dois modelos clássicos sobre a evolução dos cromossomos B são estáticos, ou seja, assumem que a frequência dos supernumerários está em equilíbrio em populações naturais atuais. A diferença entre eles reside apenas em como esse equilíbrio é alcançado. Um terceiro modelo, diferente dos demais, conhecido como *Near-Neutral* foi descrito posteriormente por Camacho et al. (1997). Segundo o esquema representado abaixo (Figura 3), o cromossomo B é substituído por outro cromossomo supernumerário após sua neutralização pelo genoma A.

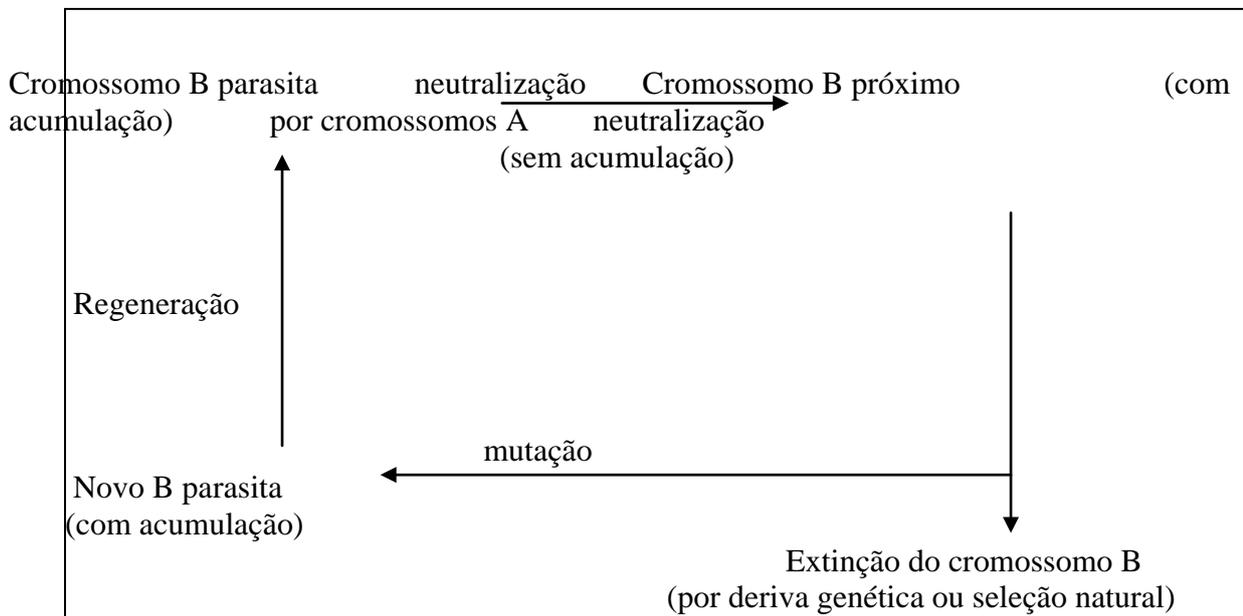


Figura 3: Esquema do modelo de evolução dinâmica dos cromossomos B parasitas no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Camacho, 2002)

Para que o cromossomo B se estabeleça em uma população, é necessária a existência de mecanismos de acumulação que facilitem a sua permanência inicial, aumentando sua frequência e impedindo sua eliminação do genoma hospedeiro. A perda desses mecanismos produz uma neutralização que posteriormente pode seguir dois caminhos: A eliminação do cromossomo supernumerário ou a regeneração do polimorfismo através de um processo de mutação, que substituirá o cromossomo B neutralizado por outro, recentemente surgido na população natural (Camacho et al., 2000).

Apesar de existirem inúmeros estudos sobre cromossomos B analisando especialmente sua distribuição, origem, transmissão e integração com o genoma normal, pouco se sabe sobre sua composição. A grande maioria dos cromossomos B estudados até o momento é constituída de DNA repetitivo, especialmente DNA satélite (DNAsat) e DNAr (Camacho, 2005; Bugrov et al., 2007).

2.2 CROMOSSOMOS B EM GAFANHOTOS

Cromossomos B são muito comuns em gafanhotos e constituem uma grande parcela dos principais polimorfismos encontrados. *Eyprepocnemis plorans* tem sido considerado modelo para estudos sobre o elemento extra dentro da ordem Orthoptera. Esse gafanhoto é bastante abundante ao longo da costa do Mediterrâneo (Península Ibérica e norte da África), Cáucaso, Turquia, Turcomenistão, Irã, sudoeste da Arábia e Grécia (Bakkali et al., 1999; Camacho et al., 2003; Abdelaziz et al., 2007). Apesar de ser constituída por quatro subespécies, estudos citológicos reportam a presença de cromossomos B apenas em *Eyprepocnemis plorans plorans*. Essa espécie apresenta um extenso polimorfismo de cromossomo B com mais de 50 tipos descritos com base no tamanho, posição de centrômero e padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva (HC)(Camacho et al., 2003).

Nos primeiros estudos realizados com *E. plorans* (Henriques-Gil et al., 1982) foram descritos quatro tipos diferentes de B de acordo com seu padrão de bandas C. Todos mitoticamente estáveis e com morfologia telo ou subtolocêntrica. O tipo mais comum foi o cromossomo B₁, enquanto B₃ foi o mais raro. Posteriormente, Henriques-Gil et al. (1984) determinaram para *E. plorans* 14 tipos diferentes de Bs. A comparação morfológica e a análise do pareamento meiótico dos diferentes tipos de cromossomos B sugeriram uma origem monofilética para os principais variantes, que teriam como ancestral o B₁. Os demais tipos (B₃, B₉, B₁₀ e B₁₁) teriam surgido independentemente.

Cabrero et al.(1999) analisando nove variantes de cromossomos B de sete populações geograficamente distintas (quatro da Espanha e três de Marrocos) de *E. plorans*, evidenciaram que os diferentes tipos de elementos extras observados apresentaram composição molecular similar, constituída primariamente de duas sequências específicas de DNA, DNAr e DNAsat 180 pb. Os tipos de B, entretanto, diferiram apenas na quantidade relativa das sequências, sugerindo uma origem comum partindo de um B ancestral que muito provavelmente foi o B₁, dada sua ampla distribuição geográfica na Península Ibérica e Marrocos. Todas as populações naturais de *E.*

plorans analisadas têm mostrado a presença de cromossomos B (Bakkali et al., 2002; Riera et al., 2004, Abdelaziz et al., 2007). A única exceção conhecida é uma região da bacia do rio Segura, na Espanha, onde as populações, isoladas geograficamente, não apresentam cromossomos extras, indicando que o cromossomo B ancestral se originou após o processo de colonização (Cabrero et al., 1997; Bakkali et al., 1999).

A manutenção do polimorfismo dos cromossomos B de *E. plorans* segue o modelo proposto por Camacho et al. (1997). O elemento parasita se estabelece em populações naturais devido a mecanismos de acumulação. Posteriormente, o genoma hospedeiro suprime esses mecanismos, através da expressão de genes específicos, resultando na neutralização do cromossomo B (Herrera et al., 1996). Depois desse processo, o supernumerário ou se extingue ou se regenera (Bakkali et al., 2002). Para a espécie, a regeneração do polimorfismo ocorreu em vários lugares da Península Ibérica: B₂ substituiu B₁ nas províncias de Granada e Málaga; B₅ substituiu B₁ em Fuengirola e o variante B₂ na população de Torrox (Málaga) está sendo substituído pelo B₂₄ (Zurita et al. 1998).

A grande maioria dos elementos extras tem sua origem derivada dos cromossomos do complemento normal. Em *E. plorans*, López-León et al. (1994), utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com duas sondas de sequências específicas de DNA (DNAr e DNAsat 180pb), sugeriram a provável origem para esses elementos. Os resultados revelaram que o cromossomo B₂ é composto de DNA repetitivo proximal e DNAr na região distal. A ordem desses dois tipos de sequências no B₂ é a mesma que no cromossomo X. Nenhum outro cromossomo é semelhante. Por essa razão, foi proposto que o variante B₂ provavelmente surgiu a partir do cromossomo X, perdendo toda a região eucromática e tendo as duas sequências posteriormente amplificadas.

Por outro lado, Cabrero et al.(2003a) analisando a localização cromossômica de três marcadores moleculares (DNAr 45S, DNAr5S, e DNAsat 180 pb) identificaram que o cromossomo B tem origem diferente dependendo da localização da população natural em estudo. Segundo os autores, os cromossomos B das populações ocidentais (Espanha e Marrocos) são provavelmente derivados da região paracentromérica do cromossomo X, por dois motivos: 1- Todos os espécimes estudados dessas populações apresentaram cromossomos X e B com sequências de DNAsat e DNAr 45S localizados exatamente na mesma ordem relativa ao centrômero; e, 2- Ambos, X e B, não apresentaram sequências de DNAr 5S. Por outro lado, em populações orientais (Cáucaso), o cromossomo B teria provavelmente derivado do autossomo P₁₁, pois em ambos foi possível visualizar os três marcadores moleculares. Esses dados resultaram na hipótese de que os cromossomos B em *E. plorans* teriam tido uma origem multiregional.

Considerando a provável origem intraespecífica dos elementos supernumerários em *E. plorans*, Teruel et al. (2009a) testaram a hipótese de origem do B a partir do cromossomo X, através da técnica de microdissecção com subsequente pintura cromossômica. A microdissecção do X e do B₂₄ foi feita utilizando células em diplóteno, com posterior amplificação dos produtos. A pintura cromossômica confirmou observações prévias de que estes cromossomos (X e B) possuem sequências de DNA repetitivo, especialmente DNAr 45S e DNAsat180pb. Entretanto, as sondas desses cromossomos também evidenciaram as regiões proximais de vários autossomos indicando que eles também contêm as sequências de DNA do X e B. Esses resultados, portanto, não ajudaram a confirmar se os cromossomos B são derivados do cromossomo X ou de um ou mais autossomos.

Outras espécies com diversidade numérica de Bs também tem sido descritas, é o caso de *Podisma sapporensis sapporensis* que possui sete morfotipos de cromossomo B, identificados com base no tamanho, morfologia e padrão de bandeamento C. Outra subespécie *P. s. krylonensis* apresenta um único morfotipo. Este cromossomo é de tamanho médio, acrocêntrico e diferente dos sete morfotipos observados em *P. s. sapporensis* (Bugrov et al., 2004).

O gafanhoto *Arcyptera fusca* é uma das espécies que apresenta polimorfismo numérico para o mesmo tipo de cromossomo B. López-Fernández e Gosálvez (1983) analisando diferentes populações identificaram um cromossomo B similar em tamanho e forma aos menores membros do cariótipo, que variou entre 0 e 4, sendo 2 o número mais comumente encontrado nos folículos. Os indivíduos portadores do B apenas mostraram variação numérica interfolicular. A variação observada foi resultado de não-disjunção do cromossomo B durante a pré-meiose, ocasionando a acumulação nas células da linhagem germinativa. Em *Locusta migratoria* o mecanismo de acumulação, que resulta na variação numérica de cromossomos B, também está baseado na não-disjunção preferencial do B na linhagem germinativa durante o desenvolvimento (Pardo et al., 1995; Castro et al., 1998)

Teruel et al. (2009b) descreveram os primeiros dados sobre a composição molecular dos cromossomos B em *Locusta migratoria*, através da técnica de microdissecção do cromossomo B e X, seguida da técnica de pintura cromossômica. Os resultados mostraram que o cromossomo B possui pelo menos dois tipos de sequências de DNA repetitivo comuns aos cromossomos do complemento padrão, sugerindo que a origem do B nessa espécie surgiu intraespecificamente. Uma dessas sequências está no cromossomo B, localizada na metade distal heterocromática deste cromossomo e na região pericentromérica de quase todos os cromossomos A e também no X. Outro tipo de sequência repetitiva foi localizada nas regiões eucromáticas não-centroméricas de todos os cromossomos do complemento e na parte intersticial da eucromatina proximal do cromossomo B.

Contudo, a pintura cromossômica não foi suficiente para confirmar, nessa espécie, qual cromossomo do cariótipo deu origem ao B.

Para a região Neotropical, polimorfismos de cromossomos B estão bem representados entre os gafanhotos do gênero *Dichroplus*. Estudos cariotípicos nas espécies *D. pratensis* e *D. elongatus* mostraram comportamento instável desse elemento durante o ciclo celular (Bidau, 1987; Clemente et al., 1994; Remis e Vilardi, 2004). *Dichroplus elongatus* se destaca pela presença de polimorfismos para a heterocromatina constitutiva na forma de segmento extra e também cromossomo B. Este último apresenta morfologia acrocêntrica sendo um pouco maior que o menor par do complemento. As populações com cromossomo B apresentaram variação numérica de 0 a 6 devido à ocorrência de mecanismos de acumulação durante a mitose e a meiose (Remis e Vilardi, 2004). Por outro lado, em *D. pratensis* o polimorfismo foi menos intenso, com o número de Bs variando de 0 a 4 nos folículos testiculares de indivíduos analisados (Bidau, 1987).

Uma categoria de cromossomos B que merece destaque quanto à morfologia são os isocromossomos. Esses elementos correspondem a cromossomos metacêntricos que tendem a formar quiasmas entre os braços, assumindo uma estrutura em anel. Acredita-se que sejam provenientes de um erro na disjunção dos centrômeros de cromossomos B acro ou telocêntricos resultando na formação de um cromossomo metacêntrico monocêntrico. Duas espécies apresentaram elementos supernumerários com essa característica: *Euplectrotettix shultzi* e *E. conspersus* (Vilardi, 1986a), cujos cromossomos extras apresentaram características muito similares, sugerindo um ancestral comum antes da separação dos táxons.

Na espécie *Metaleptea brevicornis adspersa*, a formação da estrutura em anel do isocromossomo B foi observada em quase todas as células analisadas, desfazendo-se apenas na anáfase I (Bidau, 1986). Posteriormente, Pastori e Bidau (1994) observaram que a conformação da estrutura em anel observada era mantida por quiasmas que ocorriam dentro de regiões eucromáticas localizadas nas extremidades do braço cromossômico. Grieco e Bidau (2000) analisando o comportamento meiótico desse isocromossomo B observaram a natureza dicêntrica desse elemento e propuseram duas hipóteses para sua origem: A primeira sugere a ocorrência de um mecanismo de translocação envolvendo dois cromossomos B ancestrais acrocêntricos e a segunda seria a produção de uma mudança tipo U entre cromátides irmãs de um cromossomo acrocêntrico. Essas mudanças tipo U surgiriam a partir de crossing-over anormais que poderiam ter ocorrido entre homólogos ou cromátides irmãs. Foi sugerido que a ocorrência desse evento entre as cromátides irmãs dentro de um braço curto de um acrocêntrico teria como resultado um isocromossomo dicêntrico mais um pequeno fragmento acêntrico.

Rammathocerus é um gênero também encontrado na Região Neotropical constituído por 13 espécies. Análises comparativas de sítios de DNAr em apenas quatro espécies desse gênero (*R. brasiliensis*, *R. palustris*, *R. bruneri*, *R. pictus*) identificaram a existência do cromossomo B apenas em *R. brasiliensis* (Loreto et al. 2008a), onde posteriormente foi observado um único morfotipo de cromossomo B, semelhante ao cromossomo X em tamanho, forma e heteropcnose (Loreto et al., 2008b).

A família Romaleidae apresenta poucos casos de polimorfismos para cromossomos B descritos na literatura. Provavelmente, devido ao fato de não ser extensivamente investigada. Os dois únicos exemplos são *Zoniopoda tarsata* (Vilardi, 1986b), com dois morfotipos de Bs; suas diferenças morfológicas sugerem que a origem desses elementos tenha ocorrido independentemente. E, a outra espécie, com ampla distribuição na região Nordeste do Brasil, é *Xyleus angulatus* (= *Xyleus discoideus angulatus*) (Souza e Kido, 1995), cujas fêmeas apresentaram uma variação de 1 a 2 cromossomos extras em suas células.

2.3 EFEITOS DOS CROMOSSOMOS B EM GAFANHOTOS

Embora a maioria dos cromossomos B descritos na literatura seja de natureza heterocromática, eles não são elementos geneticamente inertes. Sua ocorrência no cariótipo de certos indivíduos pode acarretar alterações tanto em traços morfológicos quanto em uma variedade de processos celulares e fisiológicos (Jones e Rees, 1982; Camacho, 2005).

Em gafanhotos, a presença de cromossomos B raramente produz consequências sobre os caracteres exofenotípicos. Entre estes poucos exemplos, Jones e Rees (1982) relataram que a presença de cromossomo B em *Camnilla pellucida* acarretou na diminuição no tamanho do fêmur em indivíduos machos. A variação do número de Bs também pode influenciar diferencialmente algumas características morfológicas. A análise de cruzamentos controlados em *Locusta migratoria* mostrou que em proles cujos parentais apresentavam mais de um cromossomo B, principalmente as fêmeas, havia alterações levemente significativas em alguns caracteres observados, como tamanho do corpo, quando comparada com parentais possuindo apenas um cromossomo B (Castro et al., 1998).

Por outro lado, esses elementos frequentemente afetam processos ou características associadas com a eficácia biológica de indivíduos portadores, tais como vigor, fertilidade e fecundidade (Camacho et al., 2000). A influência de cromossomo B pode derivar ou de sua simples

presença no cariótipo, resultando, por exemplo, na produção anormal de espermátides e alterações na frequência e distribuição de quiasmas (Bidau, 1987), ou da atividade de genes presentes neles, principalmente genes ribossomais. Cabrero et al.(1986) observaram que a fusão entre os cromossomos G_1 e B_2 do gafanhoto *E. plorans* ativou uma RON latente localizada na porção distal do braço longo do elemento extra. A ativação da RON latente resultou na redução da atividade das RONS dos bivalentes P_9 e P_{10} , provavelmente por efeito de competição entre elas. Além disso, machos com 1B mostraram um aumento da atividade das RONS no bivalente P_{11} e no X.

Um dos aspectos endofenotípicos mais afetados pela ocorrência de cromossomos B é a elevada frequência de espermátides anormais com conseqüente redução da fertilidade. *Dichroplus pratensis* apresentou espermátides que foram classificadas, de acordo com o tamanho e número de centríolos adjuntos (CAs), em três tipos: N (normal e haplóide, com 1 CA), Mp (macroespermátides, com 2 ou mais CAs) e m (microespermátide sem nenhum CA). Diferentes indivíduos analisados dessa espécie apresentaram variação inter e intrafolicular no número de cromossomos B, aumentando a produção de espermátides anormais, principalmente as macroespermátides, sendo o efeito mais acentuado em indivíduos portadores de folículos com grande número de cromossomos B (Bidau, 1987).

Estudos recentes têm mostrado que o cromossomo B_{24} em *E. plorans* também influenciou na produção de espermátides anormais. Segundo Teruel et al. (2009c) foram observados os três tipos de espermátides, através da impregnação com nitrato de prata, que evidencia os centríolos adjuntos, (macroespermátides, microespermátides e espermátides normais) em indivíduos machos apresentando ou não o cromossomo B. Os resultados revelaram que indivíduos com cromossomo B produzem, estatisticamente, mais espermátides anormais do que indivíduos 0B. Além do mais, indivíduos contendo um número ímpar de Bs (1 ou 3) apresentaram frequência de espermátides anormais maior (macroespermátides 2,64% e microespermátide 0,93%) do que o grupo de indivíduos contendo um número par (0 ou 2) (macroespermátides 1,07% e microespermátide 0,32%).

Outro efeito bastante observado em muitas espécies é a alteração da frequência e distribuição de quiasmas dos cromossomos A. Na maioria dos casos, o cromossomo B acarreta o aumento total da frequência de quiasmas. A análise de cromossomos B em *Cylindrotettix obscurus* mostrou dois Bs, sendo um de tamanho pequeno, telocêntrico e mitoticamente instável (B^T) e outro, um isocromossomo, de tamanho médio, submetacêntrico e estável (B^I). Ambos os tipos de B em *C. obscurus* aumentaram de forma significativa a produção de espermátides anormais (Confalonieri e Bidau, 1986). Posteriormente, Colombo (1989) analisou a frequência de quiasmas de *C. obscurus* visando detectar os efeitos dos dois morfotipos de B no

processo de recombinação. Os resultados revelaram que o B^I exerce uma maior influência na frequência total de quiasmas quando comparado com o B^T .

Remis (1989) analisando indivíduos da espécie *Amblytropidia australis*, coletados na província Entre Rios, Argentina, detectou a presença de cromossomos Bs telocêntricos e mitoticamente instáveis. A frequência de quiasma total e intersticial dos cromossomos A foram comparadas entre indivíduos com e sem B para determinar a influência do elemento extra sobre o processo de recombinação. Os resultados indicaram que apenas a frequência intersticial foi afetada pela presença do cromossomo B, sugerindo que esses elementos acarretaram um aumento da recombinação gênica. Por outro lado, a frequência e distribuição de quiasmas podem permanecer sem mudanças significativas mesmo com a presença de Bs. Isso ocorreu com diferentes indivíduos analisados de *Locusta migratoria* das populações de Gabias e Padul, Espanha (Viseras et al., 1988).

A produção anormal de espermátides e a frequência e distribuição de quiasmas não são as únicas características endofenotípicas afetadas pelo cromossomo B. Hewitt (1976) comparou o desenvolvimento embrionário padrão e o índice mitótico de indivíduos 0B, 1B e 2B do gafanhoto *Myrmeleotettix maculatus* durante a pré e pós-diapausa. A influência de um único cromossomo B não foi significativa. Entretanto, indivíduos com 2B apresentaram alterações no desenvolvimento de embriões machos durante o período de pré-diapausa, afetando a sua habilidade de sobrevivência. Alterações cromossômicas, tais como polissomias e aneuploidias, derivadas da presença do B em embriões, também foram observadas. Martín et al. (1996) utilizando indivíduos machos e fêmeas do gafanhoto *E. plorans* em cruzamentos controlados, obtiveram indícios prejudiciais da ocorrência do B sobre o sucesso reprodutivo. Embora os efeitos não sejam extremos, indivíduos com cromossomo B apresentaram uma clara tendência de redução no número de cruzamentos, além de um atraso na ocorrência do primeiro cruzamento, ou seja, demoraram mais para alcançar a maturidade sexual, provavelmente devido ao declínio do vigor ocasionado pelo elemento extra. Entretanto, indivíduos portadores do cromossomo B_{24} na população de Algarrobo (Málaga, Espanha) não apresentaram efeitos prejudiciais no tamanho da ninhada (número de ovos por postura), viabilidade do embrião e, principalmente, fertilidade dos óvulos, componente mais sensível ao parasitismo do B nessa espécie. Possivelmente, a ausência de efeitos seria devido à baixa virulência desse variante no cariótipo dos portadores (Manrique-Poyato et al., 2006).

3 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A hibridização *in situ* (ISH) é um método que permite localizar sequências de ácidos nucléicos (DNA e RNA) no citoplasma, organelas, cromossomos ou núcleo em organismos eucariotas. Essa técnica foi introduzida por Gall e Pardue (1969) que, utilizando sondas de RNA marcadas radiotivamente, localizaram sequências específicas de DNA no anfíbio *Xenopus laevis*. As primeiras hibridizações *in situ* foram realizadas com a utilização de sondas marcadas com radioisótopos. Entretanto, certas desvantagens causadas por esse tipo de marcação, como a instabilidade das moléculas radioativas, limitada resolução, longos períodos de exposição requeridos para a obtenção das radiografias e os riscos associados à radioatividade, impulsionaram o desenvolvimento de técnicas mais seguras e vantajosas (Levsky e Singer, 2003).

Métodos não-isotópicos foram desenvolvidos buscando o aprimoramento da técnica de hibridização, dentre eles destaca-se o uso de sondas marcadas por fluorocromos, de modo que a localização da molécula-alvo (DNA ou RNA) hibridizada com a sonda é feita através de um microscópio equipado com luz ultravioleta e jogo de filtros adequados. A partir de então, essa técnica ficou conhecida como Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) (Langer-Safer et al., 1982; Pinkel et al., 1986).

Dependendo da forma como ocorre a marcação da sonda na FISH, duas metodologias têm sido utilizadas: na marcação direta, nucleotídeos da sonda são ligados diretamente a fluorocromos, enquanto na indireta, os nucleotídeos são acoplados a uma molécula marcadora (mais comumente a biotina e a digoxigenina), a qual é posteriormente detectada por outra molécula (anticorpo contra a molécula marcadora) conjugada a um fluorocromo (Schwarzacher e Heslop-Harrison, 2001).

A metodologia da FISH requer, portanto, uma sonda particular, a qual, após várias etapas (marcação, hibridização e detecção), servirá para informar sobre a ocorrência e localização do DNA-alvo (ou RNA-alvo) no material citológico em estudo. As sondas podem ser sequências teloméricas e centroméricas, genes ribossomais 45S e 5S, DNA altamente repetitivo ou satélite, genes de cópia única, segmentos cromossômicos, braços cromossômicos, cromossomos inteiros, assim como o genoma total (Schwarzacher, 2003).

A FISH tem sido empregada na busca de informações que possibilitem a correta interpretação de rearranjos cromossômicos, na identificação de segmentos ou cromossomos, tanto

homólogos como homeólogos, no mapeamento gênico e na determinação dos grupos de ligação, assim como na obtenção de subsídios para o conhecimento da estrutura, função, evolução e organização molecular da cromatina e dos cromossomos, dentre muitos outros objetivos (Trask, 1991; Schwarzacher e Heslop-Harrison, 2000; Levsky e Singer, 2003).

Na citogenética, a FISH também tem sido amplamente utilizada para melhorar a caracterização do cariótipo, com detecção de marcadores citológicos através da localização cromossômica de sequências de DNA de uma grande variedade de espécies. Entre as principais sequências estudadas, particularmente em gafanhotos, destacam-se o DNA repetitivo, que inclui o DNA ribossomal e o DNA satélite (López-León et al., 1999; Cabrero et al., 2003a; Abdelaziz et al., 2007).

3.2 GENES RIBOSSOMAIS: 18S e 5S

A estrutura dos genes ribossomais é bastante conservada e pode ser encontrada em todos os eucariotas organizada em duas famílias multigênicas, compostas por unidades repetidas em tandem: o DNAr 45S e o 5S (Sumner, 2003). A classe maior do RNA ribossômico está organizada em clusters repetidos em tandem contendo os genes 18S, 5,8S e 28S. Os genes são separados por vários espaçadores denominados NTS (espaçadores não-transcritos) e ITS1 e ITS2 (espaçadores internos transcritos). Os NTS separam as unidades repetidas vizinhas; o ITS1 está localizado entre as regiões codificantes 18S e 5,8S; ITS2 está situado entre os genes 5,8S e 28S (Figura 4) (Sumner, 2003; Raska et al., 2004). Esses genes são transcritos a partir de uma grande unidade precursora, denominada 45S, que só após eventos pós-transcricionais origina essas moléculas de RNAr maduras (Weider et al., 2005). Esses repeats ribossômicos estão agrupados em sítios cromossômicos, presentes geralmente em um ou mais cromossomos, que correspondem às regiões organizadoras de nucléolos (RONs), responsáveis pela formação de nucléolo e síntese de ribossomos.

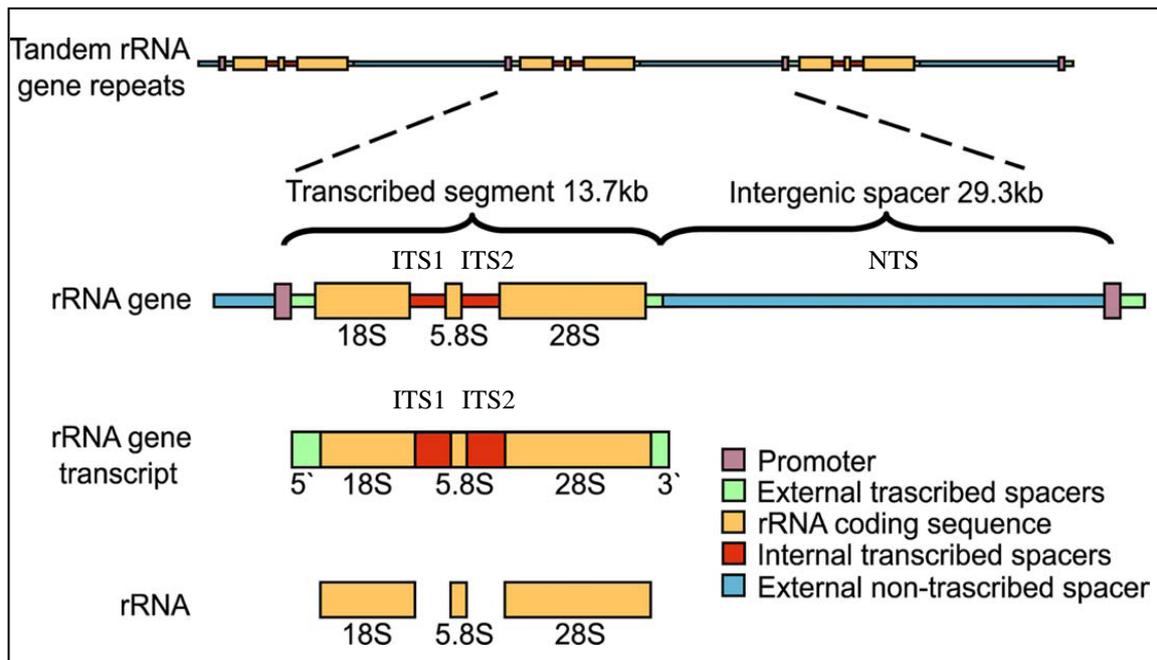


Figura 4: Estrutura básica dos genes que codificam o rRNA 45S (DNAr) em eucariota. Uma única unidade do repeat (mais a porção adjacente do outro repeat) é mostrada. A região do espaço intergênico também pode ser visualizada (azul) (Raska et al., 2004).

A classe menor do RNA ribossômico compreende o gene 5S que pode ser agrupado em simples ou múltiplos sítios dentro do genoma. Em eucariotas inferiores podem ser encontrados interespaçados com outros genes multicópias, incluindo o DNAr 45S. Nos eucariotas superiores genes 5S e 45S frequentemente estão em diferentes áreas dentro do genoma, porém também podem ser visualizados co-localizados em um mesmo cromossomo (Drouim e Monez de Sá, 1995; Sumner 2003). Os sítios de DNAr 5S não são encontrados nas RONS, diferente do DNAr 45S.

Tradicionalmente, a técnica de impregnação com nitrato de prata (AgNO_3) tem sido usada como um simples e confiável método para identificar a localização das RONS ativas na intérfase ou em cromossomos mitóticos e meióticos. Porém, essa técnica é limitada por identificar apenas as RONS que estiveram previamente ativas na transcrição do RNAr. Por outro lado, a FISH utilizando sondas ribossômicas combinada com a impregnação AgNO_3 tem permitido o estudo mais preciso das RONS identificando a atividade e localização das sequências ribossomais 45S (Sumner, 2003).

Em gafanhotos da região Neotropical, estudos das regiões organizadoras de nucléolos utilizando a FISH e mais amplamente a impregnação com AgNO_3 têm contribuído de forma significativa para a caracterização deste marcador cromossômico em diferentes espécies. Moura et al. (1996) descreveram o padrão de distribuição de RONS em espermatozóitos de diferentes espécies da família Proscopiidae, considerada um grupo relativamente antigo, cujos representantes são bem diferentes quando comparados cito e morfologicamente com as famílias Romaleidae e Acrididae.

Os resultados indicaram que, embora a impregnação com AgNO_3 das três espécies estudadas (*Tetanorhynchus silvai*, *Scleratoscopia protopeirae* e *S. spinosa*) revelassem remanescentes nucleolares, não foi possível identificar em quais cromossomos a RON estava localizada, provavelmente devido ao nível de condensação cromossômica. Em *S. protopeirae* e *T. silvai* foram observadas duas massas nucleolares em 50% das células analisadas, sugerindo a existência de no mínimo dois nucléolos, sendo um deles associado ao cromossomo X. Diferentemente dessas espécies, a impregnação com AgNO_3 revelou facilmente as RONs do proscopiídeo *Stiphra robustana* região intersticial dos pares autossômicos 6, 7 e 8 (Souza e Moura, 2000).

Mais recentemente, a técnica de FISH foi empregada nessas espécies com o objetivo de mapear os sítios de DNAr (45S e 5S), além da histona H3. A utilização de sonda 18S mostrou a presença de sítios em dois bivalentes (pares 6 e 7) de *S. robusta* e *T. silvai*, enquanto que nas duas espécies do gênero *Scleratoscopia* (*S. protopeirae* e *S. spinosa*) estava restrito ao par 7. Diferenças quanto à sua localização também foram observadas. Em *S. robusta* o sítio tem localização intersticial nos cromossomos portadores, enquanto que nas demais espécies o sítio estava localizado na região pericentromérica. O sítio 18S encontrado no bivalente 7 (presente nas quatro espécies analisadas) provavelmente deve indicar a localização cromossômica ancestral para esse gene em Proscopiidae. O segundo sítio observado em *S. robusta* e *T. silvai* (bivalente 6) representa uma condição derivada surgida a partir de determinados rearranjos cromossômicos. A diferença na localização do sítio 18S em *S. robusta* também foi decorrente de rearranjos, mais precisamente de uma inversão paracêntrica não acompanhada de mudanças na morfologia cromossômica (Cabral-de-Mello et al., 2011). Adicionalmente, comparando com os dados de AgNO_3 previamente obtidos por Souza e Moura (2000), Cabral-de-Mello et al. (2011) observaram um provável polimorfismo inter ou intrapopulacional quanto ao número e localização dos sítios de DNAr de *S. robusta*.

A análise de distribuição das RONs também tem sido utilizada em representantes da família Romaleidae, estando restrita a poucos gêneros. Em *Xestotrachelus robustus* a impregnação com AgNO_3 e a FISH revelaram um único sítio de RNAr 45S localizado na região pericentromérica do bivalente M_5 (Souza et al., 2003). As espécies *Chromacris nuptialis* e *C. speciosa*, por sua vez, apresentaram uma RON localizada no bivalente M_6 . Em *C. nuptialis* esse sítio foi presente na região pericentromérica, enquanto que em *C. speciosa* o sítio mostrou localização proximal. Foi sugerido que a diferença observada quanto à posição do sítio seja resultado de eventos, tais como inversão paracêntrica, amplificação da heterocromatina ou crossing-over desigual, que podem ter levado à modificação da posição do sítio, que era originalmente pericêntrica, para a localização proximal em *C. speciosa* (Loreto et al., 2005).

Polimorfismos quanto ao número de sítios de RNAr 45S são incomuns em romaleídeos neotropicais. O único registro dessa variabilidade foi observado no gafanhoto *Xyleus discoideus angulatus*. Souza et al. (1998), utilizando sonda ribossômica (pTa71), detectaram para a espécie sítios de DNAr 45S localizados nas regiões proximais dos bivalentes G₃, M₄ e cromossomo X, coincidindo com as RONS identificadas pela AgNO₃. Porém estudo recente (Loreto et al., 2008b) mostrou, através da utilização da mesma sonda ribossômica, resultados diferentes: os sítios de DNAr estavam presentes apenas no bivalente G₃ e no cromossomo X. A natureza dessa variação permanece incerta, sendo necessários mais estudos com a finalidade de elucidar essa questão.

A análise de distribuição das RONS utilizando apenas AgNO₃ são mais comuns. *Radacridium nordestinum* e *R. mariajoseae* apresentaram apenas uma RON ativa, porém diferiram quanto aos cromossomos portadores. Na primeira espécie o remanescente nucleolar foi localizado na região intersticial do par G₂, e na segunda, na região proximal do cromossomo X (Rocha et al., 1997). Em *Phaeoparia megacephala* também foi observada uma única RON, porém com localização na região proximal do bivalente M₆ (Pereira e Souza, 2000).

Outros acridídeos neotropicais, também foram analisados apenas com impregnação com AgNO₃. É o caso dos leptysmíneos *Cornops aquaticum*, *C. frenatum frenatum*, *Stenacris xanthochlora*, *Tucayaca parvula* e *Stenopola dorsalis*. As quatro primeiras espécies apresentaram três RONS localizadas apenas nos autossomos, as duas espécies do gênero *Cornops* apresentaram RONS nos mesmos bivalentes (M₃, M₅ e P₉), enquanto *T. parvula* e *S. xanthochlora* apresentaram os sítios ribossomais localizados nos pares M₈, P₉ e P₁₀. Por outro lado, *S. dorsalis* apresentou apenas duas RONS, encontradas nos bivalentes M₅ e M₆ (Rocha et al, 2004). *Belosacris coccineipes*, por sua vez, apresentou três RONS localizadas nas regiões pericentroméricas dos bivalentes P₉, P₁₀ e P₁₁ (Loreto e Souza, 2000).

As espécies *Schistocerca pallens* e *S. flavofasciata* também tiveram seu padrão e distribuição de RONS identificados. Segundo Souza e Melo (2007), a impregnação com AgNO₃ mostrou que em *S. flavofasciata* existe uma RON na região intersticial do bivalente M₅, enquanto que em *S. pallens* foram localizadas RONS nos bivalentes M₅ e M₆. A FISH, com sondas ribossômicas 45S, foi utilizada em *S. pallens* revelando sítios nos pares M₅ e M₆ coincidindo com os resultados encontrados com a técnica de AgNO₃.

Loreto et al.(2008a) descreveram o padrão de distribuição de RONS em cinco espécies. A impregnação com AgNO₃ revelou RONS ativas apenas na região pericentromérica do bivalente P₉ em *Rhammatocerus brunneri*, *R. palustri*, *R. pictus* e *Amblytripidia* sp. Contudo, em *R. brasiliensis* foi detectado RONS nas regiões pericentroméricas dos autossomos M₄ e M₆, além do P₉. A FISH com a sonda ribossômica pTa71, permitiu mapear todos os sítios de DNAr. Nas cinco espécies

analisadas, a FISH confirmou RONS ativas visualizadas com AgNO₃: P₉ em todas as espécies e sítios adicionais em M₄ e M₆ em *R. brasiliensis*.

Espécies de gafanhotos ocorrentes no Velho Mundo também têm sido estudadas através da técnica de FISH, especialmente para o mapeamento cromossômico de genes ribossomais 45S. *Stauroderus scalaris* destaca-se por apresentar o maior número de RONS silenciosas descritas na literatura. A impregnação com AgNO₃ identificou a presença de uma única RON ativa na região pericentromérica do autossomo G₃ (Cabrero e Camacho, 1986; López-León et al., 1999). Posteriormente, o uso da FISH, com sonda 45S, revelou que os sítios de DNAr estavam associados à heterocromatina da região pericentromérica de todos os cromossomos do complemento. Embora a marcação mais intensa tenha correspondido a RON localizada no bivalente G₃. A inatividade da maioria das sequências ribossomais sugeriu a presença de um alto número de cópias de gene RNAr inativas nos blocos de HC pericentroméricos. Foi proposto que esta inatividade baseia-se na hipótese de que a ativação das RONS é realizada sequencialmente em ordem de tamanho. Neste caso, o cromossomo G₃ teria a capacidade de fornecer RNAr suficiente para a demanda celular nesta espécie (López-León et al., 1999).

Padrões de distribuição de RONS também foram utilizados para caracterizar duas espécies do gênero *Chorthippus*: *C. brunneus* e *C. jacobsi*. A impregnação com AgNO₃ mostrou quatro RONS ativas em ambas as espécies, localizadas próximas ao centrômero do braço curto dos autossomos G₂ e G₃. Contudo, através da FISH foi observado que, além dos 4 sítios presentes nas duas espécies, *C. brunneus* apresentou sequências adicionais de DNAr em um pequeno sítio presente na extremidade distal do cromossomo X não evidenciado pela técnica de AgNO₃. Duas hipóteses foram propostas para explicar a inatividade dessas sequências de DNAr, localizadas no cromossomo X: 1. A ocorrência de silenciamento dessa RON ancestral; 2. A transposição de genes ribossomais não funcionais de autossomos para o cromossomo X (Bridle et al., 2002). Estudos semelhantes também descreveram sítios ribossômicos nos pares G₂ e G₃ em duas outras espécies de *Chorthippus*: *Chorthippus parallelus* e *C. erythropus*. Tanto a impregnação com AgNO₃ quanto a técnica de FISH detectaram não apenas os bivalentes G₂ e G₃ como portadores da RON, mas também a porção distal do cromossomo X das duas espécies estudadas (Gosálvez et al., 1988; Bella et al., 1990, 2007).

Apesar do alto grau de conservação cariotípica encontrado em gafanhotos, especialmente na superfamília Acridoidea, os sítios cromossômicos contendo DNAr 45S apresentam grande variabilidade quanto à distribuição e número. Cabrero e Camacho (2008) analisaram a expressão e localização cromossômica do DNAr 45S em 49 espécies, divididas em seis subfamílias. O número de cromossomos apresentando as sequências de DNAr variou de um a dez enquanto que a

localização cromossômica mais comum, cerca de 52,4% dos loci de DNAr, estavam na região proximal do centrômero. As duas subfamílias mais representativas foram Gomphocerinae e Oedipodinae. Os cromossomos 2, 3 e X foram especialmente frequentes como portadores do sítio de DNAr nas espécies com $2n=17,X0$ de Gomphocerinae, enquanto os cromossomos 6 e 9 foram mais comuns em Oedipodinae. Esse padrão encontrado na maioria das espécies de cada subfamília representa uma localização consensual de DNAr em um ancestral para Gomphocerinae e outro para Oedipodinae. Esses dados corroboraram com estudos prévios utilizando a localização das regiões organizadoras de nucléolos ativas através da impregnação com nitrato de prata.

A variação intra e interespecífica na localização do DNAr 45S observada em genomas dos gafanhotos poderia ser explicada por no mínimo três diferentes mecanismos: 1. Rearranjos cromossômicos estruturais, tais como translocações ou inversões; 2. Recombinação ectópica. Esta hipótese sugere um alto número de loci de DNAr em espécies com DNAr terminais, permitindo rearranjos de DNAr sem efeitos deletérios a outros loci; 3. Transposição de poucos repeats para novas regiões no mesmo ou em diferentes cromossomos, ampliações desse novo pequeno loci e deleção do loci maior original (Cabrero e Camacho, 2008).

A variabilidade no número e localização de sequências ribossomais vistas entre espécies do mesmo gênero pode ser evidenciada para gêneros de uma mesma subfamília, como mostra o trabalho de Cabrero et al.(2003b). Neste estudo, os autores compararam a localização das sequências de DNAr entre cinco representantes de gafanhotos da subfamília Eyprepocnemidinae. O número de bivalentes portando a sequência foi variável. Os sítios foram vistos no par P_9 em *Thisoicetrinus pterostichus*, P_9 e P_{10} em *Eyprepocnemis unicolor*, M_8 e P_{11} em *Heteracris adspersa*, P_9 , P_{10} e P_{11} em *Shirakiacris shirakii* e P_9 e P_{11} para *E. plorans* da região dos Cárpatos. Esses resultados sugeriram que o número de sítios de DNAr ancestral em Eyprepocnemidinae foi restrito entre um a três dos quatro menores autossomos do complemento (M_8 - P_{11}). O cluster mais conservado estaria localizado no cromossomo P_9 , presente em quatro das cinco espécies analisadas. Análises cariotípicas prévias mostraram para essas espécies que o cromossomo P_9 é megamérico. Em um estudo sobre localização cromossômica de RONS em 21 espécies de gafanhotos, por meio da impregnação com $AgNO_3$ (Rufas et al.1985), foi sugerido que cromossomos megaméricos possuem a localização cromossômica ancestral da RON dentro da família Acrididae.

A variação inter-individual no número e na localização de sequências 45S também pode ser observada. Estudos empregando FISH detectaram variabilidade de sítios em distintas populações de *E. plorans*. Bakkali et al., (2001), Cabrero et al.(2003a) e López-León et al.(2008) identificaram que as populações mais a leste (Cáucaso) mostraram o DNAr restrito aos bivalentes (P_9 e P_{11}) e as oeste (Espanha e Marrocos) na maioria dos cromossomos, incluindo o X. Recentemente, Abdelaziz et al.

(2007) observaram que uma população da Grécia da mesma espécie apresentou um número intermediário de sítios ribossômicos (apenas quatro), localizados nos cromossomos P₉, P₁₀, P₁₁ e X. Segundo os autores, a alta variedade de DNAr dentro do genoma da espécie *E. plorans*, pode estar associada à presença de elementos móveis.

A análise por FISH de segmentos supernumerários, que contém RONS, tem mostrado importantes resultados sobre a provável origem dessa heterocromatina constitutiva extra. Em *Pyrgomorpha conica*, o uso da FISH com sonda 45S, revelou sítios nas regiões dos segmentos supernumerários presentes nos bivalentes M₅ e M₆ (Suja et al., 1993). Provavelmente, as RONS presentes nos segmentos extras poderiam ter surgido por amplificação das regiões organizadoras de nucléolo originais (região pericentromérica do M₅ e M₆) e estariam silenciadas por metilação do DNA, pois as mesmas não estavam marcadas pelo nitrato de prata. A localização de um sítio de DNAr no segmento supernumerário localizado distalmente no bivalente P₁₀ de *Oedipoda fuscocincta* deu suporte a hipótese de que este segmento poderia ter surgido a partir de uma translocação da região proximal do bivalente M₉, pois é neste último que está localizada o único sítio ativo de RON (Cabrero et al., 1998).

Estudos envolvendo a utilização de sondas ribossômicas 5S são escassos em gafanhotos. Loreto et al.(2008a) utilizando sonda de DNAr 5S em *Rhammatocerus brasiliensis* identificaram que os sítios corresponderam a pequenos sinais nas regiões pericentroméricas dos autossomos G₂, G₃, M₅ e P₁₁, além de um sítio intersticial no G₃ e um na região pericentromérica do cromossomo B. Esses resultados, juntamente com os dados de 45S, sugeriram que a origem do cromossomo B para essa espécie provavelmente foi autossômica. Cabral-de-Mello et al. (2011) também utilizaram sondas 5S em quatro espécies da família Proscopiidae e identificaram um único sítio localizado no cromossomo 4.

3.3 FAMÍLIA MULTIGÊNICA: HISTONAS

As histonas formam um conjunto de pequenas proteínas encontradas em todos os organismos eucariotas. Essas proteínas participam de um importante papel na compactação do DNA formando a estrutura básica do empacotamento, o nucleossomo. Além disso, as histonas também participam do controle da regulação gênica. Existem cinco tipos de histonas que podem ser classificadas em dois grupos principais de acordo com a sua estrutura e função: as histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4) as quais formam complexos multiprotéicos e interagem com o DNA para

formar o nucleossomo e a histona ligadora (H1) que se prende ao DNA unindo os nucleossomos adjacentes (Sumner, 2003).

Os genes das histonas centrais e da ligadora estão organizados em clusters contendo algumas cópias repetidas. Em invertebrados esses genes são encontrados em um arranjo em *tandem* (Nei e Rooney, 2005). Por sua vez, em vertebrados o arranjo foi perdido e os genes podem ser encontrados espaçados pelo genoma (Thatcher e Gorovsky, 1994). Em geral, as sequências gênicas das histonas são conservadas dentro e entre espécies. As proteínas H3 e H4 são consideradas mais conservadas evolutivamente e suas sequências de aminoácidos são praticamente idênticas em distintos organismos. Desta forma, esses genes podem ser considerados marcadores cromossômicos ideais para estudos de evolução cromossômica (Zhang et al., 2007).

A localização cromossômica de genes de histonas através da técnica de FISH tem sido pouco descrita e estudada. Alguns grupos de organismos tiveram essa localização determinada, entre eles humano, alguns roedores e invertebrados marinhos. Zhang et al. (2007), por exemplo, determinaram a localização do gene H3 em quatro espécies de moluscos (*Chlamys farreri*, *C. nobilis*, *Patinopecten yessoensis* e *Argopecten irradians*). Os resultados mostraram diferenças em termos da localização, número e intensidade de sinal entre as espécies sugerindo a ocorrência de duplicação ou perda da sequência gênica ao longo da evolução das espécies. Por sua vez, Eírin-López et al. (2004) estudando a localização dos genes de histonas na espécie de molusco bivalve *Mytilus galloprovincialis* observou que a localização preferencial ocorreu na região telomérica de dois pares cromossômicos.

Os estudos de FISH, em gafanhotos, utilizando sondas de gene de histonas são escassos. O primeiro trabalho foi de Cabrero et al. (2009) que analisaram a localização cromossômica dos genes das histonas H3 e H4 em 35 espécies de gafanhotos distribuídos em sete subfamílias de Acrididae. A FISH realizada separadamente com os genes H3 e H4 mostrou que em todas as espécies analisadas um único sítio foi localizado em apenas um par autossômico do cariótipo. Em vinte e uma espécies, cujo cariótipo corresponde à $2n=23, X0$, foi identificado que a maioria das espécies apresentou o sítio na região intersticial do bivalente 8. A exceção foi observada em *Pezotettix giornae*, que apesar do sítio estar no autossomo 8 sua localização foi na região pericentromérica. Em duas espécies de *Eyprepocnemis* cujas sequências de H3 e H4 estavam localizadas distalmente no bivalente 2 e em *Tropidopola graeca* que também teve o sítio na porção distal, porém estava presente no bivalente 5. Todas as 14 espécies com $2n=17, X0$ apresentaram os sítios de histonas na porção intersticial do braço curto do cromossomo 3. Para investigar se havia co-localização desses dois genes, foi realizado o duplo-FISH em 11 espécies escolhidas aleatoriamente. Os resultados revelaram que em todos os casos, ambos os genes estavam presentes no mesmo sítio cromossômico,

indicando uma grande conservação na localização dos genes de histona em acridídeos, além de fornecer importantes evidências da evolução cariotípica da subfamília Gomphocerinae. Estudos anteriores sobre a variação cromossômica dessa subfamília (Hewitt, 1979), identificaram a ocorrência de três eventos de fusões cêntricas, que acarretaram em uma redução do número diplóide $2n=23,X0$ para $2n=17,X0$. Portanto, Cabrero et al. (2009), ao observarem a mesma localização intersticial do sítio H3-H4 em autossomos acrocêntricos de espécies $2n=23,X0$ e autossomos metacêntricos em espécies $2n=17,X0$, sugeriram a existência de um ancestral comum antes do rearranjo cromossômico (fusões cêntricas). Porém são necessários estudos adicionais, utilizando outros marcadores moleculares, para confirmar tal hipótese.

O uso da FISH para genes da histona H3 foi de fundamental importância na determinação da ancestralidade do cromossomo B no gafanhoto *Locusta migratoria*. Com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre o conteúdo molecular e origem do cromossomo B, Teruel et al. (2010) mapearam diversas sequências (DNAr 45S e 5S; DNA telomérico e genes de histona H3-H4) nos cromossomos A e B. As análises mostraram que os sítios de DNAr 45S estavam localizados nos bivalentes 2, 6 e 9, enquanto que a sonda 5S identificou dois sítios na porção intersticial do bivalente 3, dois sítios intersticiais no cromossomo 9 e apenas um na região centromérica do bivalente 11. A sonda de DNA telomérico hibridizou na porção terminal de todos os cromossomos, inclusive no B. Esses resultados indicaram que o cromossomo B não deve ter origem a partir dos cromossomos 2, 3, 6, 9 e 11. Por outro lado, a sonda H3 além de marcar o bivalente 8 na região intersticial, mostrou um sítio existente na porção proximal do cromossomo B. O duplo-FISH utilizando as sondas das histonas H3 e H4, revelou que ambas apresentaram co-localização no cromossomo 8 e no B. Esses resultados indicaram fortemente que o cromossomo B de *L. migratoria*, apresenta uma ancestralidade autossômica (Teruel et al., 2010).

Para região Neotropical, Cabral-de-Mello et al. (2011), utilizaram sondas de histona H3, em quatro espécies de proscopiídeos da América do Sul (*Tetanorhynchus silvai*, *Scleratoscopia protopeirae*, *Scleratoscopia spinosa* e *Stiphra robusta*). Todas apresentaram um único sítio, que também estava co-localizado com o gene 5S situado no cromossomo 4. Apenas em *T. silvai* os sítios estavam presentes mais distantes do centrômero, enquanto que nas demais espécies a localização foi pericentromérica. Foi sugerido que provavelmente o sítio formado pela histona H3 e o RNAr 5S represente uma condição ancestral existente entre os artrópodes no geral. Considerando que Proscopiidae é um grupo antigo em gafanhotos, a condição de associação entre esses dois genes poderia representar uma condição basal antes da diversificação dos gafanhotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELAZIZ, M. et al. Physical mapping of rDNA and satDNA in A and B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* from a Greek population. **Cytogenet Genome Research**, 119: 143-146. 2007.
- AMEDEGNATO, C. Les genres d'acridiens néotropicaux, leur classification par familles, sous-familles et tribus. **Acrida**, 3: 193-204. 1974.
- AMEDEGNATO, C.; DESCAMPS, M. Dispersal center of the Amazonian acridids. **Acta Amazonica**, 12 (1): 155-165. 1982.
- BAKKALI, M. et al. The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa. I. B variants and frequency. **Heredity**, 83: 428-434. 1999.
- BAKKALI, M. et al. Population differences in the expression of nucleolus organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Protoplasma**, 217: 185-190. 2001.
- BAKKALI, M.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa: II. Parasitic and neutralized B₁ chromosomes. **Heredity**, 88:14-18. 2002.
- BELLA, J. L.; GOSÁLVEZ, J.; HEWITT, G. M. Meiotic imbalance in laboratory produced hybrid males of *Chortippus parallelus parallelus* and *Chortippus parallelus erythropus*. **Genetics Research Cambridge**, 56:43-48. 1990.
- BELLA, J. L. et al. The origin of the *Chortippus parallelus* hybrid zone: chromosomal evidence of multiple refugia for Iberian populations. **Journal Evolution Biology**, 20: 568-576. 2007.
- BIDAU, C. J. Effects on cytokinesis and sperm formation of a B-isochromosome in *Metaleptea brevicornis adspersa* (Acridinae, Acrididae). **Caryologia**, 39 (2): 165-177. 1986.
- BIDAU, C. J. Influence of a rare unstable B-chromosome on chiasma frequency and nonhaploid sperm production in *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae). **Genetica**, 73: 201-210. 1987.
- BRIDLE, J. R. et al. Low levels of chromosomal differentiation between the grasshoppers *Chortippus brunneus* and *Chortippus jacobsi* (Orthoptera; Acrididae) in northern Spain. **Genetica**, 114: 121-127. 2002.

- BUGROV, A. G. et al. Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma sapporensis* (Orthoptera, Acrididae). **Cytogenetic Genome Research**, 106: 284–288. 2004.
- BUGROV, A. G. et al. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). **Chromosome Research**, 15: 315-325. 2007.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C. et al. Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. **Cytogenetic and Genome Research**, 132 (1-2): 89-93. 2011.
- CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Cytogenetic studies in gomphocerinae grasshopper. II. Chromosomal location of active nucleolar organizing regions. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, 28: 540-544. 1986.
- CABRERO, J. et al. Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. **Chromosome Research**, 5: 194-198. 1997.
- CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CAMACHO, J. P. M. Ribosomal DNA in a supernumerary chromosome segment of the grasshopper *Oedipoda fuscocincta* confirms its origin by translocation. **Hereditas**, 129: 15-18. 1998.
- CABRERO, J. et al. Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**, 83: 435-439. 1999.
- CABRERO, J. et al. Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosoma**, 112: 207-211. 2003a.
- CABRERO, J. et al. Comparative FISH analysis in five species of Eyprepocnemidine grasshoppers. **Heredity**, 90: 377-381. 2003b.
- CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. **Chromosome Research**, 16: 595-607. 2008.
- CABRERO, J. et al. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshopper. **Chromosome Research**, 17: 397-404. 2009.

CAMACHO, J. P. M. et al. Evolution of Near-neutral B-chromosome. In: Henriques-Gil, N., Parker, J. S. and Puertas, M. J. (eds). **Chromosomes Today**. Chapman & Hall, London. 1997. p. 301-318.

CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, 355: 163-178. 2000.

CAMACHO, J. P. M. Evolución de cromosomas parasitos. In: Soler, M. (ed). **Evolución: La base de la biología**. Proyecto Sur de Ediciones. 2002. p. 453-461.

CAMACHO, J. P. M. et al. The B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* and the intragenomic conflict. **Genetica**, 117: 77-84. 2003.

CAMACHO, J. P. M. B chromosomes. In: GREGORY, T. R. (ed). **The Evolution of the Genome**. Elsevier Academic Press. 2005. p. 224-289.

CARBONELL, C. S. Origin, evolution and distribution of the Neotropical acridomorph fauna (Orthoptera): A preliminar hypothesis. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Tomo, 36 (1-4): 153-175. 1977.

CARBONELL, C. S. *Radacridium nordestinum*: a New Genus and Species of Romaleid Grasshopper from the Brazilian Caatinga (Orthoptera, Acridoidea). **Proceedings the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 136: 123- 129. 1984.

CARBONELL, C. S. Revision of the Neotropical Genus *Tropidacris* (Orthoptera, Acridoidea, Romaleidae, Romaleinae). **Proceedings the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 138(2): 366-402. 1986.

CARBONELL, C. S. The Grasshopper Tribe Phaeopariini (Acridoidea: Romaleidae). **Publications on Orthopteran Diversity**, 2002. 148p.

CARBONELL, C. S. The genus *Xyleus* Gistel 1848 (Acridoidea, Romaleidae, Romaleinae). **Journal of Orthoptera Research**, 13 (1): 63-133. 2004.

CARBONELL, C. S. The genus *Zoniopoda* Stal 1873 (Acridoidea, Romaleidae, Romaleinae). **Journal of Orthoptera Research**, 16 (1): 1-33. 2007.

CASTRO, A. J. et al. No harmful effects of a selfish B chromosome on several morphological and physiological traits in *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae). **Heredity**, 80: 753-759. 1998.

CLEMENTE, M. et al. Supernumerary heterochromatin, chiasma conditions and abnormal sperm formation in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera): intra and interpopulation analysis. **Caryologia**, 47 (3-4): 265-279. 1994.

COLOMBO, P. C. Effects of B-chromosomes on recombination in *Cylindrotettix obscurus* (Leptysminae: Acrididae). **Caryologia**, 42 (1): 65-79. 1989.

CONFALONIERI, V. A.; BIDAU, C. J. The B-chromosomes of two species of *Cylindrotettix* (Leptysminae, Acrididae). **Genetica**, 68: 87-95. 1986.

DROUIM, G.; MONEZ DE SÁ, M. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat unit of other multigene families. **Molecular Biology Evolution**, 12: 481-493. 1995.

EIRÍN-LÓPEZ, J. M. et al. Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with “orphon” features. **Journal of Molecular Evolution**, 58: 131-144. 2004.

GALL, J.G.; PARDUE, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 69: 378-383. 1969.

GOSÁLVEZ, J. et al. A hybrid zone between *Chortippus parallelus parallelus* and *Chortippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): chromosomal differentiation. **Genome**, 30: 621-626. 1988.

GRIECO, M. L.; BIDAU, C. J. The dicentric nature of the metacentric B chromosome of *Metaleptea brevicornis adspersa* (Acridinae, Acrididae). **Heredity**, 81: 639-646. 2000.

HENRIQUES-GIL, N.; SANTOS, J. L.; GIRALDEZ, R. B-Chromosome polymorphism and interchromosomal chiasma interference in *Eyprepocnemis plorans* (Acrididae; Orthoptera). **Chromosoma** (Berl), 85: 349-359. 1982.

HENRIQUES-GIL, N.; SANTOS, J. L.; ARANA, P. Evolution of a complex B-chromosome polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosoma** (Berl), 89: 290-293. 1984.

- HERRERA, J. A. et al. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**, 76: 633- 639. 1996.
- HEWITT, G M. Meiotic drive for B-chromosomes in the primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). **Chromosoma**, 56, 381–391. 1976.
- HEWITT, G. M. **Grasshopper and Crickets**. **Animal Cytogenetics**, vol. 3: Insecta/Orthoptera. Gebruder Borntraeger, Berlin - Stuttgart, 1979.pp: 58-69.
- JONES, R. N.; REES, H. **B Chromosomes**. Academic Press London. 1982. 266p.
- LANGER-SAFER, P. R.; LEVINE, M. WARD, D. C. Immuno-cytological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 79: 4381-4385. 1982. 1986.
- LEVSKY, J. M.; SINGER, R. H. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. **Journal of Cell Science**, 116: 2833 – 2838. 2003.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GOLSÁVEZ, J. The chromosome system in three species of the genus *Arcyptera* II. Unstable B-chromosomes in *A. fusca* (Pall.). **Genetica**, 62: 41-46. 1983.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D. et al. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Research**, 2: 87-92. 1994.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Unusually high amount of inactive ribosomal DNA in the grasshopper *Stauroderus sacalariis*. **Chromosome Research**, 7: 83-88. 1999.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D. et al. Differences in ribosomal DNA distribution on A and B chromosomes between eastern and western populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans plorans*. **Cytogenet Genome Research**, 121: 260-265. 2008.
- LORETO, V.; SOUZA, M. J. Karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions (NORs) in *Belosacris coccineipes* (Acrididae – Leptysminae). **Genetics and Molecular Biology**, 23: 575-579. 2000.
- LORETO, V. et al. A comparative cytogenetic analysis between the grasshopper species *Chromacris nuptialis* and *C. speciosa* (Romaleidae): constitutive heterochromatin variability and rDNA sites. **Genetica**, 125: 253-260. 2005.

- LORETO, V. et al. Comparative analysis of rDNA location in Five Neotropical gomphocerine grasshopper species. **Genetica**, 132: 95-101. 2008a.
- LORETO, V. et al. Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. **Chromosome Research**, 16: 233-241. 2008b.
- MANRIQUE-POYATO, M. I. et al. Causes of B chromosome variant substitution in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosome Research**, 14: 693-700. 2006.
- MARTÍN, S.; ARANA, P.; HENRIQUES-GIL, N. The effect of B chromosomes on mating success of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genetica**, 97: 197-203. 1996.
- MOURA, R. C.; SOUZA, M. J.; TASHIRO, T. Cytotaxomic characterization of the genera *Scleratoscopia* and *Tetanorhynchus* (Orthoptera – Proscopiidae). **Cytologia**, 61: 169 – 178. 1996.
- NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, 39:121-152. 2005.
- PARDO, M. C. et al. Mitotic instability of B chromosomes during embryo development in *Locusta migratoria*. **Heredity**, 74: 164-169. 1995.
- PASTORI, M. C.; BIDAU, C. J. The B-isochromosome of *Metaleptea brevicornis adspersa* (Acrididae) found in northern corrientes (Argentina). **Revista Brasileira de Genética**, 17 (1): 47-51. 1994.
- PEREIRA, L. G.; SOUZA, M. J. Nature and distribution of constitutive heterochromatin and NOR location in the grasshopper *Phaeoparia megacephala* (Romaleidae, Orthoptera). **Cytobios**, 103: 111-119. 2000.
- PERFECTTI, F.; WERREN, J. H. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. **Evolution**, 55 (5): 1069-1073. 2001.
- PINKEL, D.; STRAUME, T. GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 83: 2934-2938.
- RASKA, I. et al. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. **Biology of the Cell**, 96: 579-594. 2004.

- REMIS, M. I. Effects of supernumerary heterochromatin on chiasma condition in two species of Acrididae (Orthoptera). **Genetica**, 79: 53-61. 1989.
- REMIS, M. I.; VILARDI, J. C. Mitotically unstable B chromosome polymorphism in the grasshopper *Dichroplus elongatus*. **Cytogenetic Genome Research**, 106: 359-364. 2004.
- RIERA, L. et al. Evolutionary dynamics of a B chromosome invasion in island populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Journal of Evolutionary Biology**, 17: 716-719. 2004.
- ROBERTS, H. R.; CARBONELL, C. S. Revision of the grasshopper genera *Chromacris* and *Xestotrachelus* (Orthoptera, Romaleidae). **Proceedings of the California Academy of Sciences**, 43 (4): 43-58. 1982.
- ROBERTS, H. R.; CARBONELL, C. S. Revision of the genera *Agriacris* Walker 1870 and *Staleochloranov*. (Orthoptera, Romaleidae). **Journal of Orthoptera Research**, 1: 75-106. 1992.
- ROCHA, M. F.; SOUZA, M. J.; TASHIRO, T. Karyotypic variability in the genus *Radacridium* (Orthoptera, Romaleidae, Romaleinae). **Cytologia**, 62: 53-60. 1997.
- ROCHA, M. F.; SOUZA, M. J.; MOURA, R. C. Karyotypic analysis, constitutive heterochromatin and NOR distribution in five grasshopper species of the subfamily Leptysminae (Acrididae). **Caryologia**, 57 (1): 107 – 116. 2004.
- RUFAS, J. S.; ESPONDA, P.; GOSÁLVEZ, J. NOR and nucleolus in the spermatogenesis of acridoid grasshoppers. **Genetica**, 66: 139-144. 1985.
- SCHWARZARCHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. **Practical in situ hybridization**. Bios Scientific Publishers, Oxford. 2000. 203p.
- SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. Practical in situ hybridization (Book Review). **Chromosome Research**, 9: 81-82. 2001.
- SCHWARZACHER, T. **DNA, chromosomes, and in situ hybridization**. NRC Research Press, 2003. Disponível em: <<http://genome.nrc.ca>>. Acesso em 20 jun. 2010.
- SOUZA, M. J.; KIDO, L. M. H. Variability of constitutive heterochromatin in karyotypes of representatives of the family Romaleidae (Orthoptera). **Brazilian Journal of Genetics**, 18 (4): 517-520. 1995.

SOUZA, M. J.; RUFAS, J. S.; ORELLANA, J. Constitutive heterochromatin, NOR location and FISH in the grasshopper *Xyleus angulatus* (Romaleidae). **Caryologia**, 51 (1): 73-80; 1998.

SOUZA, M. J.; MOURA, R.C. Karyotypic characterization and constitutive heterochromatin in the grasshopper *Stiphra robusta* (Orthoptera Proscopiidae). **Cytobios**, 101: 137 – 144. 2000.

SOUZA, M. J.; HAVER, P. R. O.; MELO, F. Karyotype, C- and fluorescence banding patterns, NOR location and FISH in the grasshopper *Xestotrachelus robustus* (Romaleidae). **Caryologia**, 56 (3): 261-267. 2003.

SOUZA, M. J.; MELO, N. F. Chromosome study in *Schistocerca* (Orthoptera – Acrididae – Cyrtacanthacridinae): Karyotypes and distribution patterns of constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions (NORs). **Genetics and Molecular Biology**, 30 (1): 54-59. 2007.

SUJA, J. A.; GARCIA DE LA VEGA, C.; RUFAS, J. S. Meiotic stability of B chromosomes and production of macrospermatids in *Aiolopus strepens* (Orthoptera: Acrididae). **Genome**, 29: 5-10. 1987.

SUJA, J. A. et al. Supernumerary heterochromatic segments associated with the nucleolar chromosomes of *Pyrgomorpha conica* (Orthoptera) contain methylated rDNA sequences. **Chromosoma**, 102: 491-499. 1993.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: Organization and Function**. Blackwell Science Ltd., UK. 2003. 287p.

TERUEL, M. et al. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Research**, 125: 286-291. 2009a.

TERUEL, M. et al. Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Chromosome Research**, 17: 11-18. 2009b.

TERUEL, M. et al. Abnormal spermatid formation in the presence of the parasitic B₂₄ chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Sexual Development**, 3: 284-289. 2009c.

TERUEL M. et al. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. **Chromosoma**, 119: 217 – 225. 2010.

THATCHER, T. H.; GOROVSKY, M. A. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3 and H4. **Nucleic Acids Research** 22 (2): 174-179. 1994.

TRASK, B. J. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. **Trends in Genetics**, 7: 149 – 154. 1991.

VILARDI, J. C. Isocromosomas B e irregularidades en dos especies de *Euplectrotettix* (Orthoptera: Acrididae). **Mendeliana**, 7 (2): 125-137. 1986a.

VILARDI, J. C. Parallel polymorphisms for interstitial C-bands and B-chromosomes in *Zoniopoda tarsata* (Orthoptera: Romaleidae). **Caryologia**, 39 (3-4): 365-380. 1986b.

VISERAS, E.; SALCEDO, F. J.; CAMACHO, J. P. M. The B chromosomes of *Locusta migratoria*. II. Effects on chiasma frequency. **Genome**, 30: 118-123. 1988.

WEIDER, L. J. et al. The functional significance of ribosomal (r) DNA variation: Impacts on the evolutionary ecology of organisms. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, 36: 219-242. 2005.

WHITE.M. J. D. **Animal Cytology and Evolution**. Third edition. Cambridge University Press, London. 1973. 961p.

ZHANG, L. et al. Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorphia) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops. **Genetica**, 130: 193-198. 2007.

ZURITA, S. et al. Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. **Evolution**, 52 (1): 274-277. 1998.

Manuscrito

Prevalência de cromossomos B e mapeamento físico dos sítios de DNAr 18S e histonas H3 e H4 no gafanhoto Xyleus discoideus angulatus (Romaleidae)

A ser submetido para a revista Genetica (ISSN: 0016-6707)

Prevalência de cromossomos B e mapeamento físico dos sítios de DNAr 18S e histonas H3 e H4 no gafanhoto Xyleus discoideus angulatus (Romaleidae)

Carolina Machado*, Luiz Cipriano Neto, Vilma Loreto, Maria José de Souza

Departamento de Genética, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, 50740-600, Brasil; Tel: +55 8121267827; Faz: +55 8121268521; E-mail: carolbioms@gmail.com

*Correspondência do autor

PALAVRAS-CHAVES: citogenética, FISH, polimorfismo, população

RESUMO

O gafanhoto *Xyleus discoideus angulatus* apresenta ampla distribuição no Nordeste Brasileiro além de polimorfismos para cromossomo B. No presente trabalho, foram analisados cromossomos meióticos de diferentes populações de *X. d. angulatus* com a finalidade de avaliar a prevalência, distribuição e influência do cromossomo B no processo meiótico dessa espécie, bem como mapear cromossomicamente os sítios de DNAr 18S e das histonas H3 e H4. Os resultados obtidos revelaram a presença de um único cromossomo B, similar ao X quanto ao tamanho, morfologia, ciclo picnótico e comportamento meiótico, em 29 machos dos 402 exemplares estudados. Das 11 populações analisadas, oito apresentaram cromossomo B indicando uma ampla distribuição desse elemento extra, provavelmente devido ao surgimento antigo desse polimorfismo. A presença do cromossomo B no cariótipo da espécie aumentou a produção de espermatídes anormais (macroespermátides) em indivíduos da população de Lagoa do Carro. Por sua vez, a técnica de FISH revelou a existência de dois padrões para os sítios do gene ribossômico 18S, um com dois

sítios, localizados na região pericentromérica do bivalente G₃ e cromossomo X e o outro padrão com três sítios presentes nos bivalentes G₃ e M₄ e cromossomo X, todos situados na região pericentromérica. Provavelmente, a variação observada no número de sítios de DNAr 18S seja resultado de mecanismos de translocações e transposições, responsáveis pela dispersão da sequência ribossômica no genoma da espécie. A utilização de sondas H3 e H4 revelaram a presença de três sítios localizados nos bivalentes G₂, M₄ e cromossomo X. Esse resultado foi incomum quando comparado com algumas espécies da Família Acrididae e Proscopiidae. Rearranjos cromossômicos devem ter atuado, resultando nessa variação observada.

INTRODUÇÃO

Além dos cromossomos encontrados no complemento normal, algumas espécies de eucariotas apresentam elementos genéticos adicionais conhecidos como cromossomos B ou supernumerários. Estes são caracterizados por um padrão não-Mendeliano de herança e pela ausência de homologia com os demais membros do complementocariotípico. Apesar de serem constituídos geralmente por heterocromatina, não são elementos geneticamente inertes. A sua presença no cariótipo de alguns organismos pode alterar a frequência e distribuição de quiasmas, produção normal de espermátides, fertilidade e fecundidade. Em alguns casos, as características exofenotípicas também podem ser afetadas (Jones e Rees 1982; Camacho et al. 2000).

Quanto à origem desses elementos extras, duas hipóteses são propostas, na primeira, estudos citológicos e moleculares suportam a ideia de que muitos cromossomos B são resultados de cromossomos do próprio complemento diploide (origem intraespecífica), surgidos através de polissomias ou dos fragmentos cênicos gerados por rearranjos cromossômicos (Teruel et al. 2009a; Teruel et al. 2009b). A outra hipótese sugere que os cromossomos B podem ser derivados de cromossomos A de espécies estreitamente relacionadas, como resultado de uma hibridização interespecífica (Perfectti e Werren 2001).

No reino animal, cerca de 80% das espécies com cromossomos supernumerários são encontrados na Classe Insecta, principalmente nas ordens Coleoptera, Diptera e Orthoptera. Nesta última ordem, a família Acrididae, mais intensivamente investigada, apresenta maior número de espécies com polimorfismo para esse elemento, enquanto que em Romaleidae este tipo de cromossomo foi descrito apenas em *Zoniopoda tarsata* e *Xyleus angulatus*(= *Xyleus discoideus angulatus*) (Jones e Rees 1982; Vilardi 1986; Souza e Kido 1995; Camacho 2005).

Xyleus discoideus angulatus é uma espécie endêmica do Nordeste brasileiro, que apresenta polimorfismos para cromossomo B. Por apresentar uma ampla distribuição, ocorrendo em diferentes ecossistemas, sendo mais comum a Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Carbonell, 2004), torna-se um importante organismo para estudos populacionais referentes ao elemento extra. Seu cariótipo foi descrito primeiramente por Mesa et al. (1982), com número diploide de $2n=23,X0/2n=24,XX$. Posteriormente, técnicas clássicas e moleculares de citogenética, tais como bandamento C, fluorocromos bases específicos (CMA₃/DA/DAPI), impregnação com nitrato de prata e FISH (DNAr 18S), foram utilizadas para análise da heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolos (Souza e Silva-Filha 1993; Souza e Kido 1995; Souza et al. 1998; Loreto et al. 2008).

No presente trabalho, foram analisados cromossomos meióticos de diferentes populações de *X. d. angulatus* com a finalidade de avaliar a prevalência, distribuição e influência do cromossomo B no processo meiótico dessa espécie. Adicionalmente, foi determinado tanto a localização dos sítios de DNAr 18S, considerando as possíveis diferenças populacionais existentes, quanto os sítios de histonas H3/H4, sendo este último considerado um estudo inédito para a família Romaleidae. Ambas as análises tiveram o objetivo de melhor compreender a dinâmica evolutiva do cromossomo B de *X. d. angulatus* frente as características cariotípicas da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram analisados 402 indivíduos machos do gafanhoto *Xyleus discoideus angulatus* (Stal, 1873) coletados em 11 diferentes localidades do Estado de Pernambuco, Brasil (Tabela 1).

Os indivíduos machos foram anestesiados com éter, para a retirada dos testículos, sendo esses fixados em etanol e ácido acético (3:1). Para as análises cromossômicas as lâminas foram preparadas utilizando a técnica clássica de esmagamento de folículos testiculares. Aquelas utilizadas para coloração convencional foram coradas comorceína lacto-acética 2%, enquanto que as usadas para impregnação com AgNO₃ e FISH foram preparadas com adição de uma gota de ácido acético a 45%. As lâminas sem corante foram cobertas com lamínulas e imersas em nitrogênio líquido.

Análise e prevalência do cromossomo B

A análise cromossômica e identificação de indivíduos com ou sem cromossomo B foi realizada através da técnica de coloração convencional. Para cada indivíduo foram analisados em média 12 folículos.

Para determinar se a prevalência do cromossomo B diferiu entre as populações estudadas, foi realizado o teste χ^2 a partir dos valores obtidos em análises laboratoriais. A correlação entre a prevalência do elemento supernumerário e a altitude do habitat das populações naturais foi realizada através da Correlação de Spearman. A normalidade dos dados foi verificada através do teste Shapiro-Wilk. Todas as análises estatísticas estavam de acordo com Zar (1996) e foram realizadas usando o programa STATISTICA 6.0, com nível de significância igual a 0,05.

A impregnação com nitrato de prata (AgNO₃) foi realizada de acordo com a técnica descrita por Rufas et al. (1983), com algumas modificações para o tempo. As preparações citológicas foram pré-tratadas com 2x SSC a 60°C por 10 minutos e impregnadas com uma solução de AgNO₃ diluída

em água destilada (1:1) (pH da solução foi ajustado com ácido fórmico). As lâminas foram cobertas com lamínulas e incubadas em câmara úmida a 70°C, por 2 minutos.

As imagens em campo claro foram obtidas através de uma câmera fotográfica Canon Powershot A430, 4,0 mega pixels, acoplada a ocular do microscópio Olympus.

Hibridização in situ Fluorescente (FISH)

O DNA genômico da espécie foi extraído a partir dos músculos das patas saltatórias de acordo com a metodologia de Ayres et al. (2002). Posteriormente, o DNA genômico foi utilizado para obter as sondas dos genes de DNAr 18S e H3/H4 usando *primers* universais para as sequências: DNAr 18S (Cabral-de-Mello et al., 2010); histona H3 (Colgan et al., 1998); histona H4 (Pineau et al., 2005). Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a amplificação das sequências e avaliar o tamanho de cada fragmento. As sondas foram marcadas com digoxigenina (dig-11-dUTP).

A técnica de FISH foi realizada de acordo com a metodologia de Moscone et al. (1996) em 10 indivíduos com cromossomo B. As lâminas contendo as preparações citológicas, foram submetidas a uma série de desidratação alcoólica (70% e 96%). Em seguida, foram tratadas com RNase (1 hora) e pepsina (20 minutos). Após cada tratamento, lavagens com 2xSSC foram realizadas com a finalidade de estabilizar a estrutura cromossômica. Após essa etapa, 1µL de sonda foi adicionado a 9µL de solução de hibridização (5 µL de formamida 100%, 2 µL de sulfato de dextran a 50%, 1µL de 20xSSC, 1 µL de DNA bloqueador) e desnaturados a 75°C durante 10 minutos. A solução de hibridização foi aplicada nas lâminas desnaturadas e cobertas com lamínulas 24x24 mm. A hibridização ocorreu em câmara úmida a 37°C por um período de 48 horas. Nos banhos pós-hibridização, as lâminas foram submetidas a sucessivas lavagens em 2xSSC (a temperatura ambiente), 2xSSC (42°C) e 0,1xSSC (42°C).

Para a detecção da marcação com digoxigenina, o anticorpo primário foi sheep anti-digoxigenina (Roche 1 207 741) e o anticorpo secundário foi o sheep anti-rabbit conjugado com FITC (Dako F0135). Após a aplicação de cada anticorpo foram realizadas três lavagens (5 min) com 1xPBS/0,1%Tween20. A coloração dos cromossomos foi feita com 4,6- diamidino-2-fenilindole (DAPI) e montadas com Vectashield (Vector Burlingame, CA, USA). As fotomicrografias das hibridizações foram obtidas através do microscópio Leica conectado a um sistema de fluorescência e acoplados a uma câmera. As imagens das células capturadas pelo programa CW4000 tiveram ajustes de brilho/contraste modificados no Adobe Photoshop CS5.

RESULTADOS

Um macro-cromossomo B similar ao X quanto à morfologia, ao ciclo picnótico variável, comportamento meiótico e de tamanho levemente menor, foi observado em 29 dos 402 exemplares machos cariotipados (Figura 1a-c). Associações, do tipo lado-a-lado ou ponta-a-ponta, foram visualizadas entre o B e cromossomo X (Figura 1c), ocorrendo preferencialmente no início do ciclo meiótico (prófase I). Com o avanço da divisão celular, a frequência de associação diminuiu (Tabela 2).

A distribuição e prevalência do cromossomo B foram analisadas em onze diferentes populações do Estado de Pernambuco, distribuídas em três regiões distintas, quanto ao clima e vegetação: Litoral, Zona da Mata e Agreste. A presença do macro-cromossomo B foi observada em oito das onze populações analisadas (Tabela 3). Dos 29 indivíduos portadores de cromossomo B, 28 mostraram a presença de apenas um B. Um único indivíduo, pertencente à população de Lagoa do Carro, mostrou variação intra-individual com relação ao número de cromossomos B. Este exemplar apresentou variação inter-folicular de 0 a 2 cromossomos B. Devido à grande semelhança observada no tamanho e morfologia possivelmente trata-se do mesmo cromossomo B. Com relação à condição intra-folicular, o número de cromossomos supernumerário mostrou-se constante. Do

total de 14 folículos testiculares analisados, três apresentaram células com número diploide $2n=23$ (0B) (Figura 1d); cinco, $2n=24$ (1B) (Figura 1e) e seis com $2n=25$ (2B) (Figura 1f).

Nas populações contendo o cromossomo B, os valores de prevalência, apesar de diferentes, com variação entre 3,03% (Goiana - IPA) e 26,67% (São Lourenço da Mata - EET) (Tabela 3), não apresentaram nenhuma diferença significativa entre as populações naturais através do teste de qui-quadrado ($\chi^2= 11,10$; $gl=7$; $p=14,067$). Adicionalmente, a análise da Correlação de Spearman mostrou que não existe relação significativa entre a prevalência de B e a altitude das localidades de coletas ($r = -0,657$; $gl = 5$; $p = 0,1$).

Indivíduos portadores do cromossomo B apresentaram espermátides anormais (macroespermátides) as quais foram observadas através da impregnação com nitrato de prata ($AgNO_3$). As macroespermátides quando marcadas com $AgNO_3$ apresentaram dois ou mais centríolos adjuntos (CAs) diferente das espermátides normais que mostraram um único CA (Figura 2a-c). Para investigar a influência do cromossomo B na produção de espermátides anormais, foram calculadas as frequências de macroespermátides em diferentes indivíduos da população de Lagoa do Carro, com constituição cariotípica 0B e 1B. Adicionalmente, a frequência de macroespermátides também foi analisada no exemplar com variação inter-folicular de Bs (0B-2B). Os resultados revelaram que indivíduos sem cromossomo B apresentaram menor taxa de espermátides anormais (2,39%) quando comparados com a frequência encontrada nos portadores do elemento extra (1B = 7,44%; 0B-2B = 11,49%).

O uso de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), em indivíduos portadores de cromossomo B da espécie analisada, permitiu o mapeamento cromossômico dos sítios de DNAr 18S e das histonas H3 e H4. Os resultados utilizando sonda de DNAr 18S revelaram dois tipos de padrões distintos: quatro indivíduos apresentaram dois sítios de DNAr 18S nas regiões pericentroméricas do cromossomo X e bivalente G_3 (Figura 3a) e seis indivíduos mostraram três sítios de 18S localizados na região pericentromérica dos bivalentes G_3 e M_4 e no cromossomo X (Figura 3b). Também foi

observado um indivíduo heterozigoto para o sítio localizado no cromossomo G₃ (Figura 3c).

A FISH utilizando sondas de histonas H3 revelou que os sítios dessas proteínas estavam localizados na região proximal do bivalente G₂ e na região pericentromérica dos cromossomos M₄ e X (Figura 4a). Por outro lado, os sítios da histona H4 foram observados nos mesmos cromossomos, entretanto todos estavam situados na região pericentromérica (Figura 4b).

DISCUSSÃO

A ocorrência de cromossomo B em *X. d. angulatus* foi descrita pela primeira vez por Souza e Kido (1995). Neste estudo, diferentes fêmeas da população de Igarassú (Pernambuco) foram analisadas através do bandeamento C, que identificou a natureza parcialmente heterocromática do elemento extra. Adicionalmente, foi observada uma instabilidade numérica desse elemento extra, provavelmente decorrente de mecanismo meiótico de acumulação. Diferentemente das fêmeas, os machos analisados no presente trabalho não apresentaram variação numérica de cromossomo B, indicando uma estabilidade meiótica, caracterizada pela ausência de mecanismos de acumulação.

A presença do cromossomo B em oito das onze populações de *X. d. angulatus* analisadas indicou uma ampla distribuição desse elemento extra no estado de Pernambuco. A existência de distância física entre as áreas de coleta e o fato das espécies do gênero *Xyleus* apresentarem baixa habilidade para o voo (Carbonell 2004), torna pouco provável a hipótese de fluxo gênico recente entre as populações. Provavelmente essa ampla distribuição seja resultado de um surgimento antigo desse polimorfismo, tendo ocorrido em uma população inicial que se dispersou juntamente com a migração de indivíduos para outros habitats.

Para as três localidades que não apresentaram indivíduos com cromossomo B (Cabo de Santo Agostinho (Gurjaú), Nazaré da Mata e Surubim) provavelmente, diferente das demais populações cujo cromossomo B estava presente, a população ancestral de cada localidade não apresentava indivíduos com cromossomo B, resultando assim na ausência atual observada.

Contudo, não deve ser descartada a hipótese de que a frequência desse cromossomo seja muito baixa nessas três populações naturais e o tamanho da amostra não foi suficiente para encontrá-lo. Serão necessários estudos posteriores, aumentando o número de amostras para se confirmar a ausência de cromossomos B nessas localidades.

Apesar das populações portadoras de cromossomos B em *X. d. angulatus* estarem distribuídas em três zonas climáticas, com características próprias e diferenciadas de clima e vegetação, não foi observada uma relação entre prevalência do cromossomo B e ambiente das populações. Segundo Camacho et al. (2000), a prevalência do cromossomo B não depende exclusivamente do fator ecológico, sendo necessários analisar também os eventos históricos (números de gerações desde o surgimento desse elemento), de transmissão (intensidade de acumulação existente entre populações) e aleatórios (flutuações genéticas sofridas por populações de tamanho finito) que ocorre nas populações naturais. Portanto, a variação da prevalência observado no presente estudo pode estar sendo afetada por um dos três fatores ou então pela ação simultânea dos mesmos.

A frequência basal de espermátides anormais observada em indivíduos sem B de *X. d. angulatus* foi de 2,39%. Esse valor triplicou (7,44%) em indivíduos que apresentaram apenas um B, enquanto que para o exemplar de Lagoa do Carro (0B-2B) a frequência aumentou para 11,49%, provavelmente esse aumento, em comparação aos portadores de 1B, seja devido à instabilidade meiótica observada nesse único indivíduo. Esse aumento na frequência de macroespermátides decorre de diferentes eventos como inibição da citocinese e fusão nuclear ou celular induzida pela presença do cromossomo B (Suja et al., 1986). Os valores das frequências de espermátides anormais são semelhantes aos observados em outras espécies de gafanhotos, tais como *Sphingonotus coeruleus* (3-14%) (Gosálvez et al. 1985), *Metaleptea brevicornis adspersa* (8,59%) (Bidau 1986) e *Dichroplus pratensis* (3-10%) (Bidau 1987). O aumento da produção de espermátides anormais ocasionada pelo cromossomo B afeta a eficácia biológica dos portadores, uma vez que seu real

efeito sobre o processo de espermiogênese pode ser significativo, pois uma espermátide com nível diploide e presença de dois centríolos adjuntos (CAs) implica na eliminação de duas possíveis espermátides normais, afetando assim a fertilidade do indivíduo portador. Por outro lado, a ausência de microespermátides nos indivíduos com cromossomo B indica um favorecimento da prevalência desse elemento extra na espécie, uma vez que o B não será eliminado durante a divisão meiótica na forma de micronúcleos (microespermátides).

Em *X. d. angulatus* também foram observadas similaridades entre os cromossomos B e X quanto ao comportamento meiótico, tamanho, morfologia e heteropicnose. Segundo Camacho et al. (2000) esse tipo de similaridade e ocorrência de associação entre B e X, são observados com frequência em diferentes espécies. Na grande maioria dos casos, essa situação ocorre devido à origem do cromossomo B, cujo ancestral seria o cromossomo sexual. Um exemplo dessa derivação é o cromossomo B₂ de *Eyrepocnemis plorans* (López-León et al. 1994), cujas sequências de DNA repetitivo proximal e DNAr na região distal coincidem apenas com o cromossomo X.

Entretanto, a FISH utilizando sondas de DNAr 18S e histona H3 e H4 em *X. d. angulatus* reforçaram a ideia de que a ocorrência de similaridades entre B e X, além de uma forte associação meiótica observada durante a prófase I, pode não ser resultado da origem do cromossomo B a partir do X. Isso porque tanto o gene ribossômico 18S quanto as histonas H3 e H4 estão presentes na região pericentromérica do X e ausentes no cromossomo B. Adicionalmente a esses resultados, técnicas de bandeamento C e fluorocromos bases-específicos (CMA₃/DA/DAPI) mostraram padrões diferentes de blocos e composição heterocromática entre esses cromossomos (Souza et al. 1998; Loreto et al. 2008).

Rebollo et al. (1998) sugeriram uma outra hipótese para explicar as similaridades observadas entre X e B que não seja a origem. Segundo os autores os cromossomos univalentes necessitam de estratégias para se manterem no genoma, impedindo a ocorrência de erros durante a orientação cromossômica na placa equatorial (metáfase I) e aumentando sua eficiência de transmissão para

células-filhas. Provavelmente, a associação aquiasmática observada entre B e X em *X. d. angulatus* pode ter contribuído para a transmissão desse elemento extra com consequente permanência do genoma.

Através da FISH foi possível observar também uma variação inter-individual no número de sítios de DNAr 18S, que mostrou dois padrões: indivíduos portadores de dois sítios e outros com três sítios. Mecanismos tais como, translocações e transposições, têm sido destacados na literatura como responsáveis pela dispersão das sequências ribossomais nos genomas e inclusive tem sido descritos para outras espécies de gafanhotos (Cabrero e Camacho 2008; Loreto et al. 2008).

Heteromorfismos de DNAr 18S não são incomuns em gafanhotos. Variação quanto ao tamanho, número e localização dos sítios foram descritos na literatura para esta condição (Souza e Moura, 2000; Cabral-de-Mello et al., 2010). Crossing-over desigual e deleção, envolvendo segmentos de cromossomos homólogos, geralmente são considerados mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais das RONS (Carvalho e Dias, 2007). Provavelmente um dos eventos resultou na perda do sítio em um dos homólogos do bivalente G₃ no indivíduo heterozigoto de *X. d. angulatus*.

Em *X. d. angulatus*, a FISH utilizando sondas de histonas H3 e H4, revelou que os sítios dessas proteínas estão localizados nos bivalentes G₂, M₄ e no cromossomo X, situação incomum para a maioria dos gafanhotos que apresentaram tais genes localizados em um único sítio, como visto por Cabrero et al. (2009) em espécies da família Acrididae. Das 35 espécies estudadas, 21 possuíam cariótipo semelhante a *X. d. angulatus* (2n=23,X0), porém os resultados diferiram tanto no número de sítios marcados com a sonda H3 quanto a localização cromossômica: apenas um sítio de H3 foi identificado em um autossomo, geralmente o cromossomo 8, cuja localização se encontrava na região intersticial. Adicionalmente em 11 espécies, escolhidas aleatoriamente, foi realizado o duplo-FISH H3/H4. Os resultados revelaram que em todos os casos ambos os genes estavam co-localizados no mesmo sítio cromossômico. Teruel et al. (2010) utilizaram o duplo-FISH para

mapear os sítios de histonas H3 e H4 no gafanhoto *Locusta migratoria*. A análise também relevou que esse sítio estava localizado no cromossomo 8. Cabral-de-Mello et al. (2011) analisando os sítios de H3 em quatro espécies da família Proscopiidae revelaram a existência de um único sítio, situado no par 4, diferente do que foi observado em representantes da família Acrididae. As diferenças encontradas entre representantes das famílias Acrididae, Proscopiidae e em *X. d. angulatus* devem estar associadas a rearranjos cromossômicos entre elas, contudo ainda são necessários novos estudos a fim de determinar a natureza dessas variações.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Carlos Salvador Carbonell da Universidade de Montevideo, Uruguai, pela identificação taxonômica da espécie. À Cirlene Silva pelo apoio técnico e auxílio nas coletas. À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco) pela concessão de bolsa de mestrado e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por recursos financeiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelaziz M, Teruel M, Chobanov D, Camacho JPM.; Cabrero J (2007) Physical mapping of rDNA and satDNA in A and B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* from a Greek population. **CytogenetGenome Res**, 119: 143-146

Ayres CFJ, Romão TPA, Melo-Santos MAV, Furtado AF (2002) Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Mem.Insti.Oswaldo Cruz**, 97 (6): 871-875

Bidau CJ (1986) Effects on cytokinesis and sperm formation of a B-isochromosome in *Metaleptea brevicornis adspersa* (Acridinae, Acrididae). **Caryologia**, 39 (2): 165-177

Bidau CJ (1987) Influence of a rare unstable B-chromosome on chiasma frequency and nonhaploid sperm production in *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae). **Genetica**, 73: 201-210

Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius germinates* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, 104: 393 – 400

Cabral-de-Mello DC, Martins C, Souza MJ, Moura RC (2011) Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. **CytogenetGenome Res**, 132 (1-2): 89-93

Cabrero J, López-León MD, Gómez R, Castro AJ, Martín-Alganza A, Camacho JPM (1997) Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. **Chromosome Res**, 5: 194-198

Cabrero J, Camacho JPM (2008) Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. **Chromosome Res**, 16:595–607

Cabrero J, López-León MD, Teruel M, Camacho JPM (2009) Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshopper. **Chromosome Res**, 17: 397-404

Camacho JPM. (2005) B chromosomes. In: Gregory TR (ed). **The Evolution of the Genome**. Elsevier Academic Press, pp 224-289

Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 355: 163-178

Carbonell CS (2004) The genus *Xyleus* Gistel 1848 (Acridoidea, Romaleidae, Romaleinae). **J Orthoptera Res**, 13 (1): 63-133

Carvalho RA, Dias AL (2007) Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. **Braz. arch. biol. Technol.**, 50 (1): 41-146

Colgan DJ, McLauchlan A, Wilson GDF *et al.* (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Aust Jour Zool**, 46:419–437

Gosálvez J, De la Vega G, Rufas C, Lopez-Fernandez C (1985) Unstable B-chromosomes producing abnormal spermatid nuclei in *Sphingonotus coeruleans* (Orthoptera). **Arch Biol (Bruxelles)**, 96:15-22

Henriques-Gil N, Arana P (1990) Origin and substitution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Evolution**, 44: 747-753

Jones RN, Ree H (1982) **B Chromosomes**. Academic Press, London.

López-león MD, Neves N, Schwarzacher JS, Heslop-Harrison (Pat), Hewitt GM, Camacho JPM (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Res**, 2: 87-92

Loreto V, Cabrero J, López-León MD, Camacho JPM, Souza MJ (2008) Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. **Chromosome Res**, 16: 233-241

Mesa A, Ferreira A, Carbonell GS (1982) Cariología de los acridoideos neotropicales: Estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones. **Ann Soc Entomol (N. S.)**, 18 (4): 507-526

Moscone EA, Matzke MA, Matzke AJM (1996) The use of combined FISH/ GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploids tobacco. **Chromosoma**, 105: 231 – 236

- Perfectti F, Werren JH (2001) The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. **Evolution**, 55 (5): 1069 – 1073
- Pineau P, Henry M, Suspène R (2005) A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. **Mol Biol Evol**, 22: 582-588
- Rebollo E, Martín S, Manzanero S, Arana P (1998) Chromosomal strategies for adaptation to univalency. **Chromosome Res**, 6: 515-531
- Rufas JS, Gosálvez J, Lopez-Fernandez C, Cardoso h (1983) Complete dependence between Ag-NOR's and C-positive heterochromatin revealed by simultaneous Ag- NOR C-banding method. **Cell Biol Int Rep**, 7: 275-281
- Souza MJ, Silva-Filha MHNL (1993) Effects of extra chromosome segments on chiasma distribution in *Xyleus angulatus* (Orthoptera: Romaleidae). **Rev Bras Genét**, 16 (1): 23-33
- Souza MJ, Kido LMH (1995) Variability of constitutive heterochromatin in karyotypes of representatives of the family Romaleidae (Orthoptera). **Rev Bras Genét**, 18 (4): 517-520
- Souza MJ, Rufas JS, Orelana J (1998) Constitutive heterochromatin, NOR location and FISH in the grasshopper *Xyleus angulatus* (Romaleidae). **Caryologia**, 51: 73-80
- Souza MJ, Moura RC (2000) Karyotypic characterization and constitutive heterochromatin in the grasshopper *Stiphra robusta* (Orthoptera, Proscopiidae). **Cytobios**: 101: 137–144
- Suja JA, Gosálvez J, Rufas JS (1986) A cytogenetic analysis in *Psophus stridulus* (L.) (Orthoptera: Acrididae): B-chromosome and abnormal spermatid nuclei. **Genetica**, 70: 217-224

Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM (2009a) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Res**, 125: 286-291

Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A, Camacho JPM (2009b) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Chromosome Res**, 17: 11-18

Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. **Chromosoma**, 119: 217 – 225

Vilardi JC (1986) Parallel polymorphisms for interstitial C-bands and B-chromosomes in *Zoniopoda tarsata* (Orthoptera: Romaleidae). **Caryologia**, 39 (3-4): 365-380

Zar JH (1996)**Biostatistical analysis**. Third editions Prentice-Hall International Editions, New Jersey

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Diferentes locais de coletas do gafanhoto *Xyleus discoideus angulatus* em Pernambuco.

Região	Local	Número de indivíduos	Coordenadas Geográficas	Distância	Altitude
Litoral	Cabo de Santo Agostinho (Gurjaú)	23	08° 17' 13'' S : 35° 02' 06'' W	33 Km	29m
Zona da Mata	Goiana (IPA)	39	07° 33' 38'' S : 35° 00' 09'' W	62Km	13m
	Nazaré da Mata	25	07° 44' 31'' S : 35° 13' 40'' W	65 Km	89m
	Lagoa do Carro	60	07° 50' 41'' S : 35° 19' 11'' W	60 Km	128m
	São Lourenço da Mata (EET)	15	08° 00' 08'' S : 35° 01' 06'' W	16 Km	58m
Agreste	Bezerros	44	08° 14' 00'' S : 35° 47' 49'' W	101 Km	470m
	Caruaru (PEPJVS)	58	08° 17' 00'' S : 35° 58' 34'' W	140 Km	800m
	Gravatá	26	08° 12' 04'' S : 35° 33' 53'' W	85 Km	447m
	João Alfredo	33	07° 51' 21'' S : 35° 15' 18'' W	106 Km	328m
	Saloá (FB)	21	08° 58' 33'' S : 36° 41' 15'' W	263 Km	725m
	Surubim	57	07° 49' 59'' S : 35° 45' 17'' W	130 Km	394m

EET - Estação Ecológica de Tapacurá
 FB - Fazenda Brejo
 IPA - Instituto de Pesquisa Agrícola
 PEPJVS - Parque Ecológico Professor João Vasconcelos Sobrinho

Tabela 2: Frequência de associação entre o cromossomo X e o B em diferentes fases da meiose de machos de *Xyleus discoideus angulatus*.

	Leptóteno		Zigóteno		Paquíteno		Diplóteno		Diacinese		Metáfase I	
	X+B	X/B	X+B	X/B	X+B	X/B	X+B	X/B	X+B	X/B	X+B	X/B
No. de células	735	284	354	195	373	248	333	323	149	259	68	118
%	72,1	27,8	64,5	35,5	60,1	39,9	50,8	49,2	36,5	63,5	36,6	63,4

X+B = associação; X/B = não associação.

Tabela 3: Prevalência de cromossomo B em onze populações de *Xyleus discoideus angulatus* provenientes de diferentes localidades do Estado de Pernambuco. Prevalência foi calculada como porcentagem de indivíduos portadores de B.

Região	Localidade	Indivíduos 0B	Indivíduos 1B	Total	Prevalência
Litoral	Cabo de St. Agostinho (Gurjaú)	23	0	23	0%
	Goiana (IPA)	32	1	33	3,03%
Zona da Mata	Nazaré da Mata	25	0	25	0%
	Lagoa do Carro	53	7*	60	11,67%
	São Lourenço da Mata (EET)	11	4	15	26,67%
	Bezerros	38	6	44	13,64%
	Caruaru (PEPJVS)	55	3	58	5,17%
Agreste	Gravatá	22	4	26	15,38%
	João Alfredo	30	3	33	9,09%
	Saloá (FB)	27	1	28	3,57%
	Surubim	57	0	57	0%
Total		373	29	402	7,21%

EET - Estação Ecológica de Tapacurá

FB - Fazenda Brejo

IPA - Instituto de Pesquisa Agrícola

PEPJVS - Parque Ecológico Professor João Vasconcelos Sobrinho

* Um indivíduo apresentou variação inter-folicular de 0 a 2 cromossomos B.

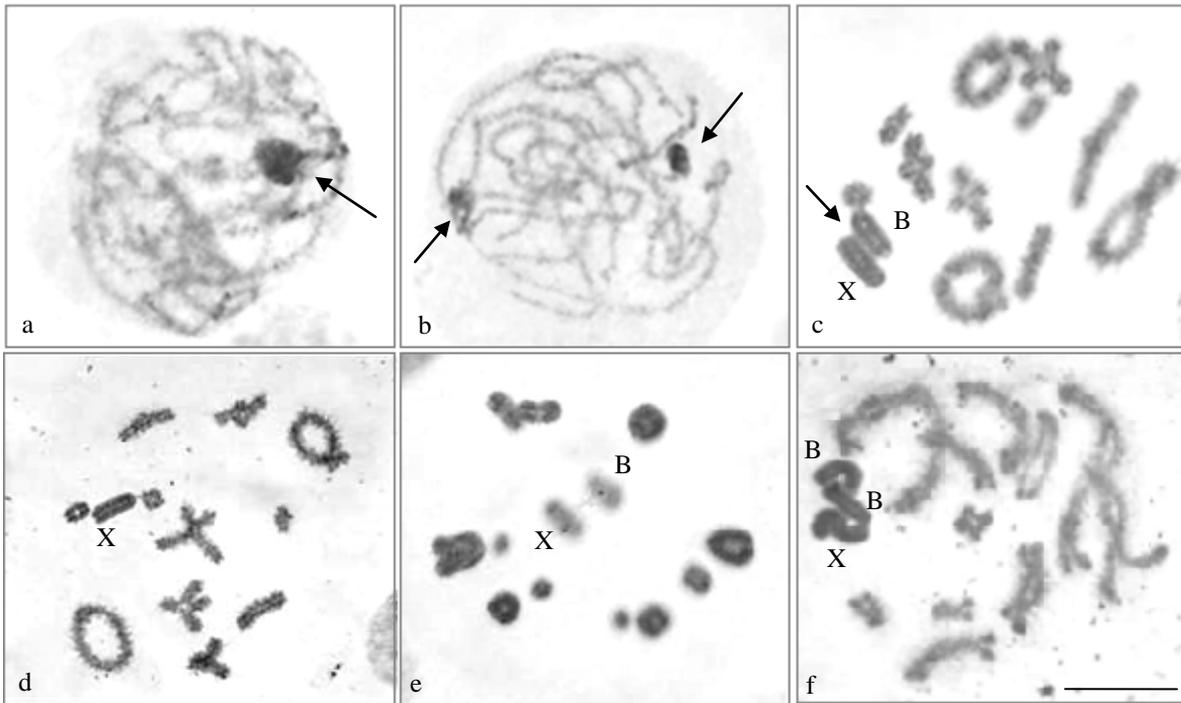


Figura 1: Coloração convencional em células meióticas de *Xyleus discoideus angulatus* com cromossomo B (a-c). a) leptóteno com associação entre X e B (seta). b) leptóteno sem a associação X/B. As setas indicam os cromossomos X e B. c) diplóteno, associação lado-a-lado entre o cromossomo X e B (seta). Indivíduo de *Xyleus discoideus angulatus* de Lagoa do Carro contendo variação inter-folicular no número de cromossomos B (0B-2B) (d-f). d) diplóteno, $2n=23$ (0B). e) diacinese, $2n=24$ (1B). f) paquíteno, $2n=25$ (2B). Barra = $5\mu\text{m}$

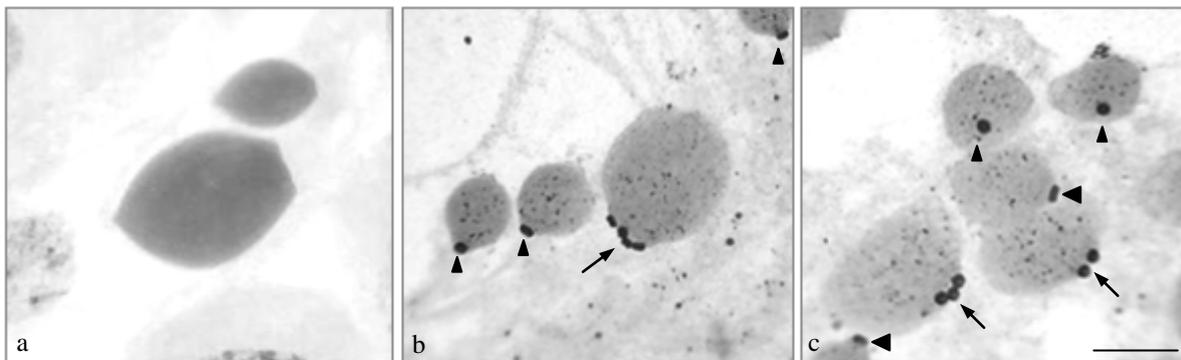


Figura 2: Espermátides do indivíduo de *Xyleus discoideus angulatus* de Lagoa do Carro contendo variação inter-folicular no número de cromossomos B (0B-2B). Em (a), coloração convencional. Impregnação com AgNO_3 (b, c) destacando espermátides normais com um centríolo adjunto (cabeça de seta) e anormais (seta) com dois ou mais CAs. Barra = $5\mu\text{m}$

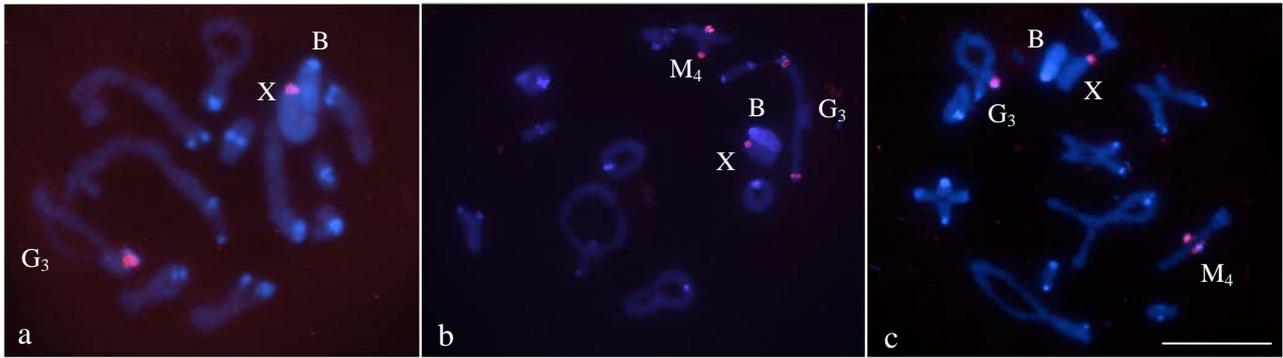


Figura 3: Localização cromossômica dos sítios de DNAr 18S em células meióticas de *Xyleus discoideus angulatus* através da FISH. Em (a), células apresentando duas marcações, uma no bivalente G_3 e a outra no cromossomo X; Em (b), célula apresentando três sítios, localizados nos bivalentes G_3 , M_4 e no cromossomo X; em (c), célula apresentando heteromorfismo para o sítio presente no bivalente G_3 (Coloração DAPI em azul, sítios 18S em vermelho). Barra = 5 μm

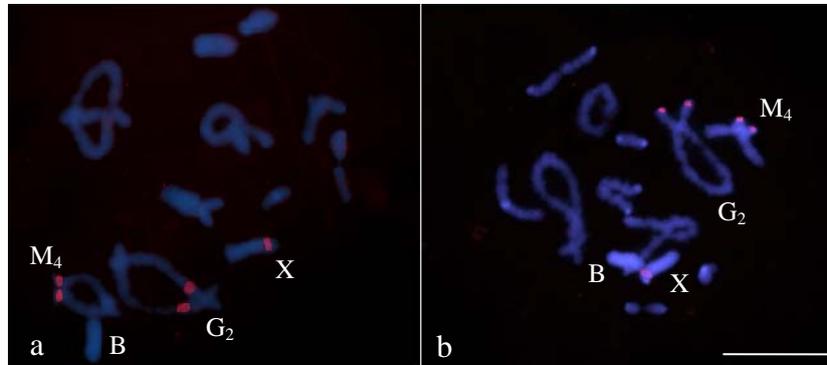


Figura 4: Localização cromossômica dos sítios de histona H3 (a) e H4 (b) em células meióticas de *Xyleus discoideus angulatus* através da FISH, situados nos bivalentes G_2 , M_4 e no cromossomo X. (Coloração DAPI em azul, sítios H3 e H4 em vermelho). Barra = 5 μm

CONCLUSÕES

1. A ampla distribuição do cromossomo B observada em diferentes populações do Estado de Pernambuco indica que esse polimorfismo em *X. d. angulatus* deve ser antigo, ocorrendo numa população inicial e dispersando-se juntamente com a migração de indivíduos. Entretanto, populações naturais sem cromossomo B, provavelmente não apresentavam na população ancestral de cada localidade indivíduos portadores do elemento extra.
2. A presença do cromossomo B no cariótipo de *X. d. angulatus* determinou alterações na taxa de espermátides anormais. Possivelmente, o aumento observado na frequência de macroespermátides tenha contribuído para uma diminuição de espermátides viáveis, assim como a inexistência de microespermátides constitui-se em um possível mecanismo para a manutenção adequada da prevalência de B nas populações.
3. De acordo com os marcadores cromossômicos (mapeamento de sítios de genes DNAr 18S e de histonas H3 e H4) utilizados no presente trabalho e de estudos citogenéticos prévios, o cromossomo B não apresenta origem a partir do cromossomo sexual. Provavelmente as similaridades observadas, além da forte associação entre esses cromossomos, seja resultado de estratégias genômicas e citológicas para o elemento extra permanecer no genoma da espécie.
4. Mecanismos de translocações e transposições podem ser responsáveis pela variação no número de sítios de DNAr 18S observados em *X. d. angulatus*.

ANEXO

GENETICA (Qualis A2)

ISSN: 0016-6707

Instructions for authors

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

- Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- Word template
Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- **Journal article**
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
 - **Article by DOI**
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
 - **Book**
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
 - **Book chapter**
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
 - **Online document**
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
 - **Dissertation**
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
- Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php
- For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
- **EndNote style**

Table

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

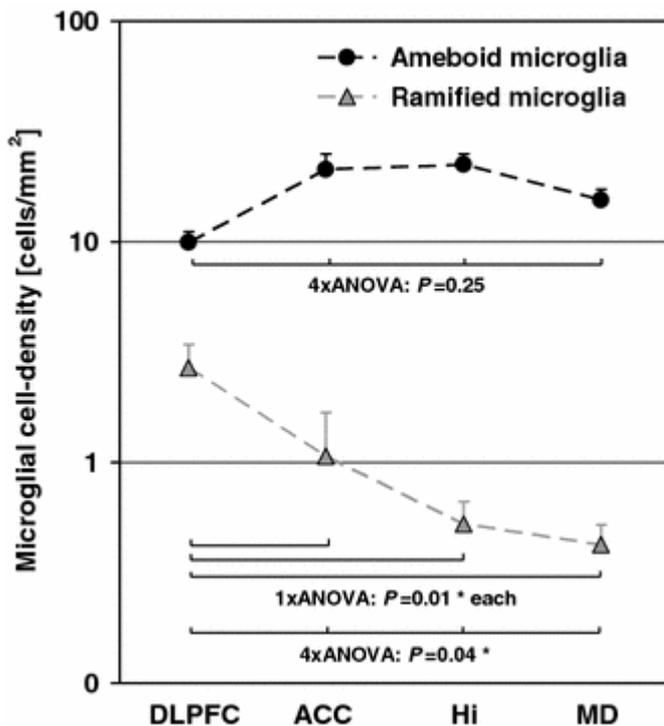
Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

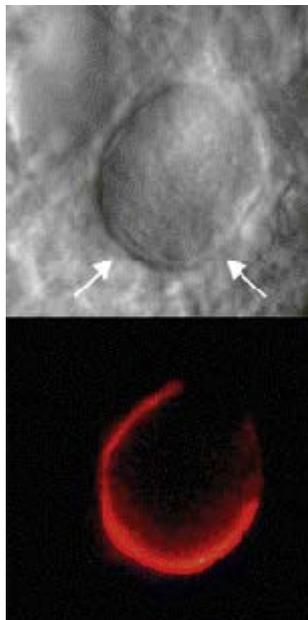
Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

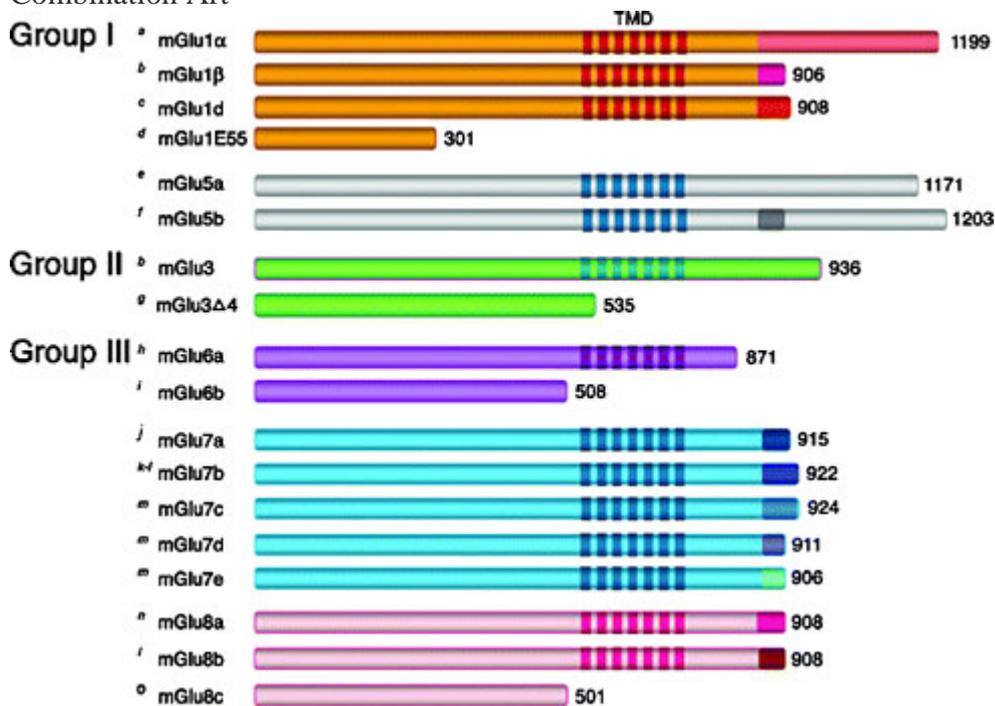
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

APÊNDICE

APÊNDICE A – Frequência de espermátides com diferentes números de centríolos adjuntos (CAs) encontradas em exemplares 0B da população de Lagoa do Carro.

Número de células analisadas	Número de Centríolo Adjunto (CA)	Frequência
1471	1 CA	97,61%
35	2 CAs	2,32%
1	3 CAs	0,07%
Total = 1507		100%

APÊNDICE B – Frequência de espermátides com diferentes números de centríolos adjuntos (CAs) encontradas em exemplares 1B da população de Lagoa do Carro.

Número de células analisadas	Número de Centríolo Adjunto (CA)	Frequência
2763	1 CA	92,56%
202	2 CAs	6,76%
15	3 CAs	0,50%
4	4 CAs	0,13%
1	6CAs	0,05%
Total = 2985		100%

APÊNDICE C – Frequência de espermátides com diferentes números de centríolos adjuntos (CAs) encontradas no exemplar de Lagoa do Carro (0B-2B).

Número de células analisadas	Número de Centríolo Adjunto (CA)	Frequência
1017	1 CA	88,51%
121	2 CA	10,53%
5	3 CA	0,44%
6	4 CA	0,52%
Total = 1149		100%