



ANÁLISE DA OCORRÊNCIA E PREVALÊNCIA DE CROMOSSOMOS B EM FÊMEAS DE *Xyleus discoideus angulatus* (ORTHOPTERA - ROMALEIDAE)

MARCELYE MARIAM FREITAS DA SILVA; VILMA LORETO

RESUMO

Os cromossomos B são elementos extras dispensáveis no cariótipo de um organismo. A espécie de gafanhoto *Xyleus discoideus angulatus* (Orthoptera - Romaleidae), possui cariótipo $2n=23$, X0 (machos) e $2n=24$, XX (fêmeas) com cromossomos acrocêntricos. A espécie já possui dados de ocorrência de cromossomos B em machos do nordeste do Brasil, estes apresentaram 3 morfotipos diferentes, sendo acrocêntricos, heteropicnóticos em relação aos autossomos e diferentes em tamanho. O objetivo deste trabalho foi estudar citogeneticamente fêmeas de *Xyleus d. angulatus* amostradas em Pernambuco, analisando a ocorrência e prevalência de cromossomos B. Esta análise é importante devido ao baixo número de estudos citogenéticos de B em gafanhotos fêmeas. Para a obtenção de dados aplicou-se a técnica convencional de esmagamento de folículos, coloração com orceína lacto-acética a 2%, e posterior análise ao microscópio das células mitóticas do organismo para a identificação do número cromossômico. Os resultados obtidos foram analisados, fotografados e descritos quanto à presença e quantidade de cromossomo B em cada indivíduo. Ao todo foram analisadas 12 fêmeas de *Xyleus d. angulatus*, coletadas no ano de 2012 em Gurjaú, no município de Cabo de Santo Agostinho-PE. Destas, apenas três possuíam cromossomo B em seu cariótipo, $2n=25$, XX, +B, sendo um desses indivíduos portador de mosaicismo, e os demais apresentaram cariótipo sem alterações, $2n=24$, XX (0B). A prevalência de cromossomo B para essa população foi equivalente a 25%. Foi observado um aumento da prevalência de cromossomos B nas fêmeas da espécie *Xyleus discoideus angulatus* na população, comparada a de machos da mesma localidade. O aumento da ocorrência de B nas fêmeas analisadas pode se dar devido um aumento de mecanismo de acumulação nas mesmas, por conta da tendência de apresentar uma migração preferencial para o pólo da célula de fêmeas que originará os óvulos. Outra explicação proposta para o aumento da prevalência observada é quanto à função desses cromossomos, sendo possível que eles tenham causado alguma vantagem às fêmeas, frente a uma menor vantagem ou desvantagem nos machos. Além disso, os resultados permitiram inferir uma exclusão na ausência de cromossomos B observada anteriormente para os machos desta localidade.

Palavras-chave: Citogenética; Gafanhotos; Genética; Cariótipo; Pernambuco

1 INTRODUÇÃO

Cromossomos B, também chamados cromossomos supernumerários ou extras, se caracterizam como uma alteração cromossômica numérica que resultam em aumento do número cromossômico nos indivíduos das espécies que os possuem. Estes elementos extras foram descritos em mais de 15% de espécies de eucariotas e particularmente em insetos eles são muito frequentes (Camacho, 2005; Vilardi, 1986). Em gafanhotos são caracterizados como um polimorfismo e seus estudos servem de modelo para o entendimento sobre ocorrência, frequência e dinâmica evolutiva de populações deste tipo de cromossomo (Loreto et al., 2008;

Machado et al., 2014; Bernardino et al., 2017). Cromossomos B podem ser estudados citogeneticamente através de diferentes técnicas ou abordagens buscando compreender melhor sua natureza e evolução. Na análise convencional é possível classificar o cromossomo B quanto ao tipo, tamanho e morfologia (Harvey e Hewitt, 1979). Em algumas espécies, a transmissão e distribuição de cromossomos B para as células filhas ocorrem de maneira diferente aos outros cromossomos do complemento devido a não disjunção de cromossomos B que pode causar variação no número desses elementos entre as células de um mesmo indivíduo, resultando no direcionamento mitótico e meiótico e acumulação (Camacho et al., 2000).

Xyleus discoideus angulatus, pertence a família Romaleidae, que possui em sua maioria espécies com cariótipo conservado apresentando o número diploide $2n = 23$, X0 em machos e $2n = 24$, XX em fêmeas, com cromossomos acrocêntricos (Mesa et al., 1982), o que também é válido para esta espécie. A presença de cromossomos B em *Xyleus discoideus angulatus* foi primeiramente descrita por Souza e Kido (1995), em exemplares de Pernambuco. Os autores detectaram um elemento numericamente instável, que variou de um a dois em fêmeas da população de Igarassu-PE, com tamanho e morfologia semelhante ao X, de natureza heterocromática e com prevalência de 27,7%. Esta instabilidade foi atribuída ao direcionamento meiótico dos cromossomos B. Porém, Machado et al. (2014) verificaram que indivíduos machos não apresentavam esta variação numérica, o que caracteriza uma ausência de mecanismo de acumulação.

A investigação da possível origem do cromossomo supernumerário em *Xyleus discoideus angulatus* também foi realizada com base no padrão de HC e no mapeamento físico de genes de DNAr. Neste estudo, foi proposto que o cromossomo B se originou a partir de um autossomo, visto que a localização de um sítio de DNAr estava presente no cromossomo X e ausente no B (Loreto et al., 2008). Posteriormente, um grande levantamento de ocorrência e distribuição de cromossomos B em indivíduos machos de populações de Pernambuco (14 localidades) e do Ceará (5 localidades) foi realizado por Bernardino et al. (2017) onde foi possível verificar que nas populações em que o cromossomo B foi encontrado sua taxa de prevalência estava estável. Além disso, este trabalho também identificou novas variantes do cromossomo B indicando que eventos mutacionais relacionados com modificações nas sequências de DNA repetitivo do cromossomo B eram frequentes. Contudo, pouquíssimas informações estão disponíveis na literatura a respeito da ocorrência, prevalência e distribuição de cromossomos B em fêmeas das espécies que os possuem. Um dos poucos trabalhos foi com a espécie *Melanoplus femurrubrum* em que na população de fêmeas foi visto 9,1% dos indivíduos portando um cromossomo B metacêntrico que tinha uma taxa de transmissão para a prole acima de 80%, muito superior a proporção de transmissão mendeliana esperada de 50% (Lucov e Nur, 1973). Para *Xyleus d. angulatus*, a única análise de fêmeas, foi apenas para a população de Igarassu-PE. Desta forma, um estudo que possa verificar a ocorrência e a distribuição de cromossomos B em fêmeas seria de grande importância para entender quais os mecanismos envolvidos na transmissão deste cromossomo nas populações da espécie.

Assim, o trabalho possui como objetivo identificar a distribuição e prevalência de cromossomos B em fêmeas da espécie *Xyleus discoideus angulatus*. Fazendo para isso a verificação da ocorrência de cromossomos B em fêmeas de *Xyleus discoideus angulatus* em indivíduos do estado de Pernambuco, identificando o número de cromossomos B por fêmea através da contagem cromossômica e analisando comparativamente os resultados, somados aos da literatura, a fim de propor um entendimento sobre a dinâmica evolutiva de cromossomos B considerando a herança materna e paterna desse elemento extra.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a metodologia do trabalho foram utilizadas 12 fêmeas de *Xyleus d. angulatus* coletadas no município de Cabo de Santo Agostinho, no estado de Pernambuco em anos

anteriores, as quais foram identificadas pelo taxonomista Carlos S. Carbonell e guardadas na coleção entomológica do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH) - Universidade Federal de Pernambuco. Os gafanhotos foram capturados com a ajuda de uma rede entomológica e colocados em sacolas plásticas apropriadas, as quais foram transportadas para o laboratório.

Em relação ao material de fêmeas previamente obtido, as mesmas antes de serem sacrificadas passaram por uma etapa de aplicação de colchicina a 0,1% (6 horas). Pela ação da colchicina ocorre o bloqueio da divisão celular aumentando a chance de obter células metafásicas, ideais para a contagem do número cromossômico. As fêmeas foram anestesiadas usando um chumaço de algodão embebido com éter, dentro de um pequeno recipiente de vidro com tampa. Com o auxílio de uma tesoura foi feito um corte longitudinal na parte dorsal do indivíduo e com uma pinça foram retiradas suas gônadas e colocadas em tubo eppendorf com a solução fixador Carnoy, na proporção de 3ml de etanol para 1ml de ácido acético, juntamente com uma identificação do indivíduo, na identificação consta o número referente ao indivíduo, presente no livro de registro. Os tubos foram mantidos no freezer a -20 °C.

Para a análise do cariótipo e identificação de ocorrência de cromossomos B, lâminas contendo células mitóticas foram obtidas a partir da técnica clássica de esmagamento de folículos ovarianos. Para o preparo de cada lâmina, com o auxílio de uma lupa, foram usadas seringas para separar um ou dois folículos da gônada e este foi colocado sobre uma lâmina limpa com o uso de uma pinça, posteriormente foi adicionada uma gota de ácido acético 45% e com o uso das seringas cortou-se o folículo em vários pedaços pequenos, para facilitar o espalhamento das células sobre a lâmina. Após alguns segundos o excesso de ácido foi retirado com um papel toalha e adicionada uma a duas gotas do corante orceína lacto-acética a 2%, esperando-se cerca de 5 minutos, para que a orceína pudesse corar os cromossomos, permitindo sua posterior visualização. Após esse tempo, foi colocada uma lamínula sobre o material com o corante, e segurando-a em uma parte com um papel toalha, bateu-se sobre o material nela presente com as “costas” de uma agulha, para assim espalhar o material sobre a lâmina, rompendo as células e expondo os cromossomos para a visualização, depois, segurando a lamínula sobre a lâmina para não escorregar, aplicou-se uma pressão com o dedo “esmagando” o material entre a lâmina e a lamínula. Por fim, a lâmina foi selada (“lutada”) usando esmalte nas bordas da lamínula para fixá-la sobre a lâmina e impedir o ressecamento do corante.

Após a preparação, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico para procura de células completas as quais foram contadas com relação ao seu número cromossômico, avaliando a presença de um cariótipo normal com 24 cromossomos, ou com a alteração, com 25 ou mais cromossomos. Após a análise, as melhores células foram documentadas a partir da utilização de uma câmera digital diretamente no microscópio óptico e as imagens celulares obtidas trabalhadas para ajuste de brilho e contraste.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo foram analisadas 12 fêmeas de *Xyleus d. angulatus* (Figura 1a, b), provenientes do estado de Pernambuco, estas foram coletadas no ano de 2012 em Gurjaú, no município de Cabo de Santo Agostinho-PE (Figura 2). Destes, apenas três indivíduos possuíam cromossomo B em seu cariótipo, $2n=25$, XX, +B (Figura 3b), sendo um desses indivíduos portadores de mosaicismos, apresentando tanto células com uma contagem normal, quanto células com a alteração. Os demais indivíduos apresentaram cariótipo sem alterações, $2n=24$, XX (0B) (Figura 3a). Assim, a prevalência de cromossomo B para essa população equivale a 25% (Gráfico 1a).

Figura 1: Espécie *Xyleus discoideus angulatus* (Orthoptera - Romaleidae). Indivíduo fêmea (a); Casal em cópula, sendo o indivíduo maior a fêmea e o menor o macho (b).

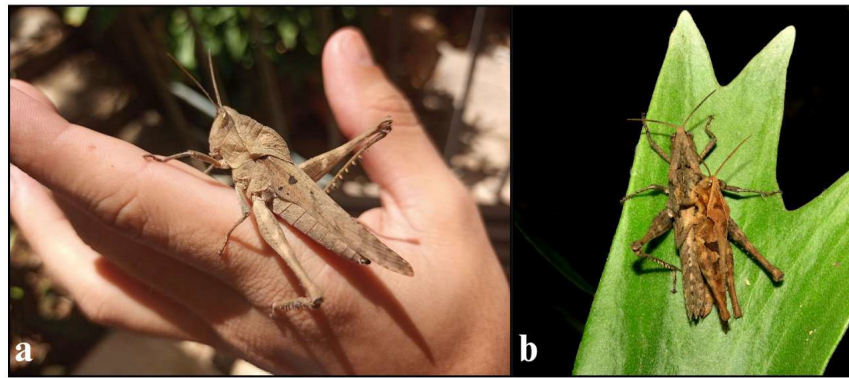
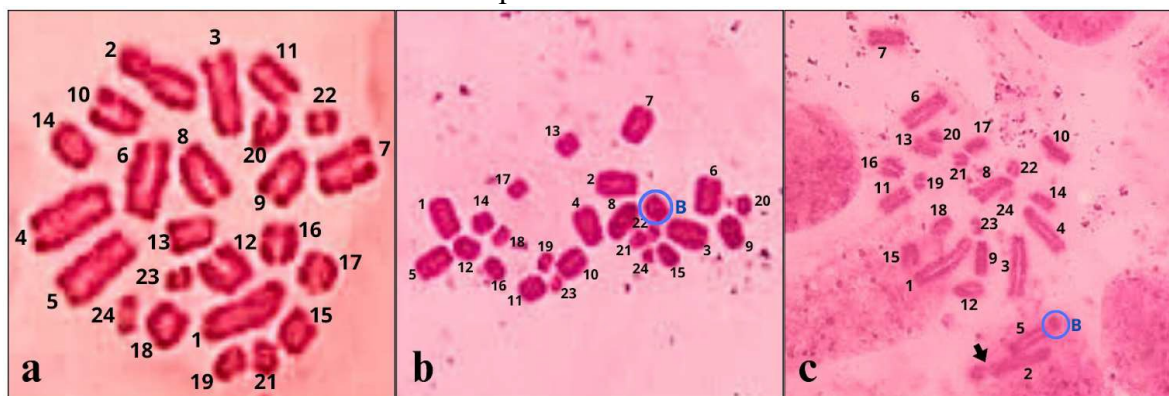


Figura 2: Mapa indicando município de coleta, Cabo de Santo Agostinho-PE, das fêmeas de *Xyleus d. angulatus*.



Figura 3: Análise convencional de células mitóticas de fêmeas de *Xyleus d. angulatus*, apresentando cariótipos: com $2n=24,XX$, (0B) (a); com um cromossomo B, possuindo $2n=25,XX,+B$ (b); e com um cromossomo B e uma possível origem de um segundo cromossomo B, sendo este e sua ligação com um dos cromossomos grandes identificado pela seta preta (c). Os círculos azuis em (b) e (c) indicam cromossomos B e os números identificam cada cromossomo do cariótipo.



Dados já publicados da ocorrência de cromossomos B em machos de *Xyleus d. angulatus* coletados no Cabo de Santo Agostinho em 2012 (Bernardino et al., 2017), podem ser comparados com os dados obtidos para as populações de fêmeas (Tabela 1). Para a população de machos foram analisados 32 indivíduos, dos quais nenhum apresentou alteração, possuindo prevalência, portanto, de 0%. Assim, comparando as fêmeas e machos coletados no Cabo de Santo Agostinho em 2012, a prevalência de B foi 25% maior nas fêmeas (25%) do que nos machos (0%). É válido ressaltar que, devido à observação de indivíduos fêmeas com B na população de Cabo de Santo Agostinho-PE, isto exclui a ausência de cromossomo B nesta população e indica, de fato, que a ausência de indivíduos machos com B descrita por Bernardino et al. 2017 pode estar associada a uma frequência muito baixa desse polimorfismo nesta

localidade e em indivíduos machos.

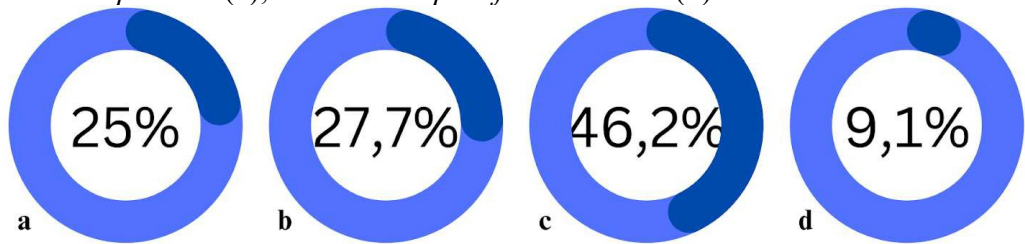
Tabela 1: Prevalência e quantidade de indivíduos com cromossomo B encontrados para a população de fêmea e macho do Cabo de Santo Agostinho-PE em 2012. *População analisada por Bernardino et al. (2017).

Amostras	Indivíduos com cromossomo B	Total de indivíduos	Prevalência de B (%)
Fêmeas	3	12	25
Machos*	0	32	0

A análise de fêmeas de *Xyleus d. angulatus* por Souza e Kido (1995), em exemplares da população de Igarassu-PE, encontrou uma prevalência de 27,7% (Gráfico 1b). Comparativamente à prevalência de cromossomo B encontrada para as fêmeas aqui analisadas, sendo de 25%, a população de Igarassu-PE apresentou uma prevalência de 2,7% maior que a do Cabo de Santo Agostinho-PE. Contudo, visto que o percentual observado nestas duas localidades de Pernambuco se aproxima, isto pode indicar um valor de estabilidade para a frequência de B em fêmeas de *Xyleus d. angulatus*. Análise de outras populações de fêmeas serão importantes para confirmar este valor de estabilidade.

Em um estudo realizado por Manrique-Poyato et al. (2006) com indivíduos da espécie *Eyprepocnemis plorans* coletados em Algarrobo (Málaga, Espanha) em 2002, 2003 e 2004, foi observado ocorrência de cromossomo B em fêmeas, com prevalência de 41%, 53% e 45%, respectivamente, com um total de prevalência equivalente a 46,15% (Gráfico 1c), onde das 104 fêmeas analisadas por eles, 48 apresentaram cromossomo B. Assim, as fêmeas de *E. plorans* apresentaram prevalência, aproximadamente, 21,15% maior que as de *Xyleus d. angulatus* analisadas. Porém, se comparadas com as fêmeas da espécie *Melanoplus femurrubrum*, estudadas quanto à presença de cromossomo B, por Lucov e Nur (1973), as fêmeas de *Xyleus d. angulatus* apresentaram prevalência 15,9% maior que as de *Melanoplus femurrubrum*, as quais possuíam prevalência de apenas 9,1% (Gráfico 1d). Lucov e Nur (1973) também demonstraram que a alta taxa de transmissão do B encontrada em suas análises foi devido à sua segregação preferencial no oócito secundário durante a anáfase I. E afirmaram ainda que a tendência de acumulação durante a oogênese pode caracterizar o B de muitos gafanhotos.

Gráfico 1: Prevalências de cromossomo B nas populações de fêmeas de: *Xyleus d. angulatus* do Cabo de Santo Agostinho-PE (a); de *Xyleus d. angulatus* de Igarassu-PE (b); de *Eyprepocnemis plorans* (c); e de *Melanoplus femurrubrum* (d).



Assim, visto tamanho aumento da prevalência de cromossomos B comparado com a prevalência encontrada nos machos para o mesmo período de tempo e localidade, é válido propor que o aumento da ocorrência de B nas fêmeas analisadas tenha ocorrido por conta de um aumento de mecanismo de acumulação nas mesmas, devido a transmissão dos cromossomos B para as próximas gerações seguir uma segregação não mendeliana (Camacho, 2022), e possuir como característica uma migração preferencial para o pólo da célula de fêmeas que originará os óvulos (Burt e Trivers, 2006). Do mesmo modo, o fato de obter prevalência menor que *Eyprepocnemis plorans* e maior que *Melanoplus femurrubrum* pode indicar que as fêmeas

de *Xyleus d. angulatus* apresentaram este aumento de mecanismo de acumulação frente a espécie *M. femurrubrum*, porém não a *E. plorans*. Outra explicação para o aumento da prevalência observada nas fêmeas, diz respeito à função dos cromossomos Bs. Estes comumente não agregam vantagens ou desvantagens ao indivíduo que os possui, contudo um estudo realizado por Ahmad et al. (2020) revelou diferentes questões sobre a composição genética, sobrevivência evolutiva, manutenção e papel funcional dos cromossomos Bs dentro da célula. A anotação funcional das sequências B mostrou que o cromossomo B compreende regiões de fragmentos de genes, genes novos e genes intactos, que codificam um conjunto diversificado de funções relacionadas a processos biológicos importantes, como metabolismo, morfogênese, reprodução, transposição, recombinação, ciclo celular e funções dos cromossomos que podem ser importantes para seu sucesso evolutivo. Além disso, eles podem ser restritos à linhagem germinativa, sendo assim menos prejudiciais ao desequilíbrio dos indivíduos e, portanto, mais tolerados por eles (Camacho et al., 2000; Camacho, 2005). Assim, é possível que os cromossomos B tenham causado alguma vantagem às fêmeas, fazendo com que tenham sido encontradas mais fêmeas com B, do que comparado às vantagens ou desvantagem de estarem nos machos.

4 CONCLUSÃO

As análises foram feitas para a amostra populacional do município do Cabo de Santo Agostinho-PE, e os resultados obtidos foram analisados e comparados com dados da literatura, permitindo o entendimento sobre a dinâmica evolutiva de cromossomos B.

Foi observado um aumento da prevalência de cromossomos B nas fêmeas da espécie *Xyleus discoideus angulatus* na população, comparada a de machos da mesma localidade. O aumento da ocorrência de B nas fêmeas analisadas pode se dar devido um aumento de mecanismo de acumulação nas mesmas, por conta da tendência de apresentar uma migração preferencial para o pólo da célula de fêmeas que originará os óvulos. Outra explicação proposta para o aumento da prevalência observada é quanto à função desses cromossomos, sendo possível que eles tenham causado alguma vantagem às fêmeas, frente a uma menor vantagem ou desvantagem nos machos.

Além disso, os resultados permitiram inferir uma exclusão na ausência de cromossomos B observada anteriormente para os machos desta localidade, devido à observação de indivíduos fêmeas com B na população, bem como indica que esta ausência pode estar associada a uma frequência muito baixa desse polimorfismo nesta localidade.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Syed F. et al. B chromosomes of multiple species have intense evolutionary dynamics and accumulated genes related to important biological processes. **BMC genomics**, v. 21, p. 1-25, 2020. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-020-07072-1>. Acesso em: 17 jan. 2024.

BERNARDINO, Andrezza CS et al. B chromosome variants of the grasshopper *Xyleus discoideus angulatus* are potentially derived from pericentromeric DNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 152, n. 4, p. 213-221, outubro, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000480036>. Acesso em: 15 jan. 2024.

BURT, Austin; TRIVERS, Robert. **Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements**. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, 2006.

CAMACHO, Juan Pedro M. B-chromosome evolution. **Phil Trans R Soc Lond B**, v. 355, p. 163-178, 2000. Disponível em: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1572824500759556736>. Acesso em: 15 jan. 2024.

CAMACHO, Juan Pedro M. B chromosomes. **The evolution of the genome**. Academic Press, p. 223-286, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012301463-4/50006-1>. Acesso em: 15 jan. 2024.

CAMACHO, Juan Pedro M. Non-Mendelian segregation and transmission drive of B chromosomes. **Chromosome Research**, v. 30, n. 2-3, p. 217-228, junho, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10577-022-09692-7>. Acesso em: 17 jan. 2024.

HARVEY, A. W.; HEWITT, G. M. Chromosomes slow development in a grasshopper. **Heredity**, v. 42, p. 397–401, junho, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/hdy.1979.43>. Acesso em: 15 jan. 2024.

LORETO, Vilma et al. Possible autosomal origin of macro B chromosomes in two grasshopper species. **Chromosome Research**, v. 16, p. 233-241, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10577-007-1188-0>. Acesso em: 15 jan. 2024.

LUCOV, Zipora; NUR, Uzi. Accumulation of B-chromosomes by preferential segregation in females of the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. **Chromosoma**, v. 42, n. 3, p. 289-306, setembro, 1973. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00284776>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MACHADO, C. B. et al. B chromosome prevalence and physical mapping of 18S rDNA and H4 histone sites in the grasshopper *Xyleus discoideus angulatus* (Romaleidae). **Genet Mol Res**, v. 13, p. 7052-7060, março, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4238/2014.March.26.4>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MANRIQUE-POYATO, M. I. et al. Causes of B chromosome variant substitution in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Chromosome Research**, v. 14, p. 693-700, setembro, 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10577-006-1081-2>. Acesso em: 03 fev. 2024

MESA, A.; FERREIRA, A.; CARBONELL, G. S. Cariología de los acridoideos neotropicales: estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones. **Annales de la Société Entomologique de France (ns)**. Taylor & Francis, v. 18, n. 4, p. 507-526, outubro, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21686351.1982.12278337>. Acesso em: 15 jan. 2024.

SOUZA, M. J.; KIDO, L.M.H. Variability of constitutive heterochromatin in karyotypes of representatives of the family Romaleidae (Orthoptera). **Rev. Brasil. Genet.**, v. 18, n. 4, p. 517-520, 1995. Disponível em: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571417124053818368>. Acesso em: 15 jan. 2024.

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