

Este exemplar corresponde à redação
final da tese defendida pela
Sra. Marly Magalhães Dantas
e aprovada pela Comissão
Julgadora.



03/12/90

MARLY MAGALHÃES DANTAS

**Efeitos de choques de temperatura sobre
fenótipos nucleares de Triatoma infestans
Klug, em condições de insetário da SUCEN de
Mogi-Guaçu, S.P.**

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

30/09/924

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luíza Silveira Mello

Campinas, 1990.

D235e

13169/BC

As adversidades da vida testam a nossa capacidade de resistência; se conseguirmos superá-las, nos tornaremos mais fortes.

Aos meus filhos

Rosely e Christian,

que juntos, transmitiram
calor afetoso, carinho e
compreensão, à distância
sempre souberam me
estimular dando-me todo
apoio necessário para que
eu concretizasse este
objetivo,

dedico.

Aos meus pais

Mário e Afra,

que edificaram a base da minha
carreira profissional e
auxiliaram-me em todos os
momentos possíveis.

Aos meus irmãos

Maria do Carmo (in memoriam),

Marlene,

Mário e

Milton,

pelo grande amor que nos une,

ofereço.

Meu especial agradecimento,

À Profa. Dra. Maria Luíza Silveira Mello

Inúmeras dificuldades tive que enfrentar para chegar até aqui; o fato porém de ter conseguido superá-las, deve-se em grande parte, não aos meus méritos, mas à compreensão, apoio, ajuda e excelente orientação, desta pessoa maravilhosa, digna dos mais altos elogios pelo seu valor como cientista, como profissional e como ser humano.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelos sábios ensinamentos, pelas importantes críticas e sugestões durante o decorrer deste trabalho que sem dúvida alguma muito contribuíram para aprimorá-lo, por sua valiosa participação na pré-banca e sobretudo pelo apoio, carinho e amizade demonstrados durante uma fase muito difícil da minha vida.

Aos Professores Dra. Rita Maria Pereira Avancini e Dr. Sérgio Furtado dos Reis, pelas críticas, correções e excelentes sugestões apresentadas durante a análise prévia deste trabalho.

A SUCEN de Mogi-Guaçu (S.P.), nas pessoas do Sr. Antenor Nascimento Ferraz Filho e Sra. Vera Lúcia C.C. Rodrigues, pela participação neste trabalho e colaboração no fornecimento dos insetos utilizados nesta pesquisa.

Aos Professores Dr. Ângelo Luiz Cortelazzo, Dr. Edson Rosa Pimentel, Dra. Laurecir Gomes, Dra. Maria Lúcia Furlan Wada, Dra. Mary Anne Heidi Dolder e Dra. Shirley Recco-Pimentel, pela solicitude com que sempre me atenderam.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível superior (CAPES), através do Plano Institucional de Capacitação de Docentes (PICD), pela bolsa de estudos que me foi concedida e ao CNPq, pelo financiamento de parte dos equipamentos utilizados neste trabalho.

À Universidade Federal de Sergipe (U.F.S.), pela liberação para o meu afastamento.

Aos Professores do Departamento de Biologia da U.F.S., por terem facilitado a minha vinda para a realização deste curso, colaborando nas aulas práticas da disciplina Biologia Geral.

Ao colega de disciplina, Prof. Ronaldo Ribeiro de Oliveira, que assumiu minhas responsabilidades didáticas, substituindo-me para que eu pudesse buscar o que hoje apresento.

À Profa. Dra. Maria Mendes Conceição, pelo muito que contribuiu para minha formação em nível de graduação.

Ao Prof. Antônio Carlos C. Barreto, atual chefe do Departamento de Biologia da U.F.S., pela amizade e disposição constante para auxiliar.

Ao Prof. Edivaldo Rosas dos Santos pelo estímulo, amizade e confiança.

À colega Sílvia Regina Pérgamo de Miranda, companheira de luta, pela amizade, solidariedade, colaboração constante, críticas, sugestões e por tudo que aprendi durante estes anos que estive a seu lado.

Ao colega prof. Hernandes Carvalho Faustino pela disposição em ajudar sempre, pelas sugestões, assistência, apoio e amizade.

Aos colegas Prof. Sebastião Roberto Taboga e Prof. Maurício José Lopes Vaz do Amaral, pela ajuda, sugestões e amizade.

Aos colegas Ana Lúcia, Cristiana, Estela, Isabel, Kátia, Letícia, Marcelo, Marcos, Nazário, Rejane, Selma e Verinha, pelo agradável convívio e amizade

A Mário, Francisco e D. Luíza, pelo apoio e auxílio técnico.

À Cidinha, Lillian e Sidney, pela presteza e amabilidade demonstradas sempre que solicitados.

À D. Irma, D. Maria e Ester, pela atenção dispensada e o carinho com que sempre me trataram.

À Sra. Anna Gagliardi, Diretora Técnica da Biblioteca do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela valiosa colaboração na revisão das referências bibliográficas.

Às funcionárias da biblioteca do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo atendimento solícito e auxílio na obtenção do material bibliográfico.

À Carmen Sílvia Zickel, pelo auxílio prestado nos "pepinos" do microcomputador.

A Toninho e Joaquim pela cordialidade e presteza nos serviços de xerox.

A Roosevelt, pelo apoio e valiosa ajuda em momentos difíceis.

A Verinha e Marina, que me acolheram em sua moradia proporcionando-me com isto, um ponto de apoio para que eu conseguisse mover as primeiras barreiras que porventura encontrasse pelo caminho.

Ao Prof. Jessé Cláudio de Lima Costa, que sempre me encorajou a enfrentar os desafios.

Todas estas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, certamente representam uma parcela da presença de Deus na minha vida. Dedicando, oferecendo e agradecendo a estas particularmente, na verdade estive como um todo rendendo graças ao Criador. A Este, eu nem sei como agradecer!

ÍNDICE

pag .

INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	11
1. Material	11
2. Métodos	12
2.1. Curvas de Sobrevivência	12
2.2. Choques de temperatura	12
2.3. Obtenção dos preparados	14
2.4. Métodos de Coloração	14
2.4.1. Reação de Feulgen	14
2.4.2. Basofilia após tratamento com protamina .	15
2.5. Observações e Contagens	16
RESULTADOS	17
1. Níveis de sobrevivência dos insetos	17
2. Fenótipos nucleares: Descrição visual	23
3. Micronucleação	27
4. Frequência dos diferentes fenótipos nucleares	29
5. Basofilia nuclear após tratamento com clupeína	32

DISCUSSÃO	41
1. Choque de temperatura: efeitos sobre fenótipos nucleares e sobrevivência dos insetos	41
2. Algumas considerações sobre o fenótipo nuclear "descompactado"	52
CONCLUSÕES	60
RESUMO	63
SUMMARY	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

INTRODUÇÃO

É amplamente conhecido que em condições de choque de temperatura ou sob a ação de outro agente estressante, os organismos desde os mais simples como as bactérias até os mais complexos como o ser humano, respondem da mesma forma: apresentam no seu padrão de transcrição gênica e síntese protéica, um conjunto de alterações a que se dá o nome de resposta ao choque térmico (ASHBURNER & BONNER, 1979; THOMAS et alii, 1981; NEIDHART et alii, 1984; LINDQUIST, 1986; SCHLESINGER, 1986; BONATO & JULIANI, 1987; LINDQUIST & CRAIG, 1988).

Em síntese, o que ocorre é uma rápida e transitória reprogramação das atividades celulares para assegurar a sobrevivência do organismo durante o período de "stress", protegendo os componentes essenciais das células contra os danos que aquele agente poderia causar e, permitindo em tempo hábil uma retomada das atividades celulares normais durante o período de recuperação (BURDON, 1986).

O trabalho pioneiro sobre a resposta dos organismos ao choque térmico foi realizado em larvas de *Drosophila busckii* por RITOSSA (1962), no qual ficou demonstrado que o padrão de pufação dos cromossomos politênicos na glândula salivar dessa mosca, característico em determinada fase do seu desenvolvimento, modificava-se

após o choque térmico. Da mesma forma, o tratamento com agentes químicos tais como dinitrofenol e salicilato de sódio, produzia alterações comparáveis às promovidas pelo choque térmico.

Alguns anos mais tarde, TISSIERES et alii (1974), observaram que esta mudança no padrão de pufação, provocada pelo choque de temperatura, era acompanhada por uma síntese de um grupo específico de proteínas, as quais são hoje coletivamente referidas como proteínas de choque térmico ou *hsp's* (do inglês, heat shock proteins). Desde então, inúmeros trabalhos foram realizados neste campo, utilizando-se além de *Drosophila* (McKENZIE et alii, 1975; McKENZIE & MESELSON, 1977; MAYFIELD et alii, 1978; MIRAULT et alii, 1978; SONDERMEIJER & LUBSEN, 1978; ASHBURNER & BONNER, 1979; LINDQUIST, 1980), outros organismos tais como, bactérias (LEMEAUX et alii, 1978), protozoários (FINK and ZEUTHEN, 1980), leveduras (McALISTER et alii, 1979), fungos (FRANCIS & LIN, 1980), vegetais (BASZCZYNSKI et alii, 1982; YACOOB & FILION, 1986), aves (KELLEY & SCHLESINGER, 1978; ATKINSON, 1981; ATKINSON et alii, 1983; COLLIER & SCHLESINGER, 1986; NAGATA et alii, 1986), mamíferos (CRAIG, 1975; THOMAS et alii, 1981; van BERGEN & LINNEMENS, 1987;) e também variando-se as condições de "stress", as quais induzem a síntese de proteínas aparentemente similares, se não idênticas às aquelas sintetizadas por ação do choque térmico (LEWIS et alii, 1975; KELLEY & SCHLESINGER, 1978; GUTTMAN &

GOROVSKY, 1979; ATKINSON et alii, 1983; AMARAL et alii, 1988; COURGEON et alii, 1988).

Deste modo, ficou comprovado que a resposta das células ao "stress" é um fenômeno ubíquo em todos procariontes e eucariontes até então estudados (KIMPEL & KEY, 1985); e que inclui processos regulatórios nos três níveis da expressão gênica: transcrição, processamento de RNA e tradução (LIS et alii, 1978; LINDQUIST & DIDOMENICO, 1985).

A nível molecular, o que acontece é uma ativação de alguns genes específicos, os genes de choque térmico (HS), previamente silentes ou ativos em níveis baixos. Novos mRNA são transcritos por estes genes e a nível citoplasmático são preferencialmente traduzidos em proteínas, as hsp, enquanto os outros mRNA transcritos anteriormente ao "stress", são estocados em uma forma inativa (BURDON, 1986). Concomitantemente, diminui a síntese de proteínas constitutivas (SOMERS et alii, 1989), havendo a supressão dos genes que transcrevem seus mRNA (ASHBURNER & BONNER, 1979).

As proteínas de choque térmico são também denominadas proteínas de "stress", uma vez que outros agentes estressantes que não o choque de temperatura induzem o aparecimento deste mesmo grupo de proteínas (COLLIER et alii, 1988). Estas, desempenhariam um papel essencial na defesa da célula contra o "stress". Dentro de um mesmo

organismo elas podem estar subdivididas em várias classes diferindo na localização dentro da célula e/ou em suas características de solubilidade. Isto sugere que diferentes hsp's possam ter diferentes funções celulares (TANGUAY, 1983). Provavelmente, elas mantêm as atividades metabólicas básicas, necessárias à sobrevivência celular (THOMAS et alii, 1981).

Existem evidências que a resposta celular ao "stress", não é desencadeada diretamente pelo fator estressante em si, mas sim pela presença de proteínas denaturadas e/ou anormais que surgem em decorrência do "stress" (EDINGTON et alii, 1989). Esta hipótese é sustentada pelo fato de que a maioria dos indutores de hsp's até então conhecidos, são ou denaturantes proteicos ou desencadeadores da produção de proteínas anormais (HIGHTOWER & WHITE, 1981). Além disso, experimentos realizados em oócitos de *Xenopus* demonstraram que a microinjeção nestas células, de proteínas denaturadas tais como soroalbumina e beta-lacto-globulina bovinas, induz a síntese de hsp's (ANANTHAN et alii, 1986). Também o acúmulo de certas proteínas alteradas mutacionalmente em células de *Drosophila*, induz a produção de hsp's (HIROMI, & HOTTA, 1985). Por outro lado, células tratadas com glicerol ou D₂O (agentes que evitam a denaturação das proteínas), quando submetidas a um "stress" como o choque térmico, exibem uma baixa produção de hsp's (EDINGTON et alii, 1989).

Normalmente, uma célula se livra de proteínas aberrantes por meio de um sistema de degradação dependente da ubiquitina, um pequeno polipeptídeo que se liga a proteínas anormais, transformando-as em substrato para rápida degradação pelas proteases (BOND & SCHLESINGER, 1985).

Admite-se que a ubiquitina desempenhe um papel fundamental no controle da resposta ao "stress" a nível gênico; a redução na quantidade de moléculas de ubiquitina livres nas células, devido ao acúmulo de proteínas anormais, possibilitaria a ativação dos genes das hsp's (MUNRO & PELHAM, 1985).

Existe ainda sugestão de que alguns membros da família de proteínas de "stress", como hsp 72 e hsp 73,* sintetizadas constitutivamente ou seja, em situação de normalidade, na ausência de agressão, liguem-se a cadeias nascentes de polipeptídeos, participando no arranjo conformacional da cadeia protéica e, permanecendo associadas a esta, até que o processo final de maturação da proteína seja atingido. No entanto, as proteínas anormais não apresentam um correto dobramento durante a sua formação e o aparecimento destas proteínas resulta num complexo estável entre as hsp's e seu alvo. Isto reduziria significativamente

* denominação baseada no peso molecular da proteína; no caso, as hsp's 72 e 73 apresentam pesos moleculares de 72 e 73 kD respectivamente.

o pool das hsp's disponíveis, estimulando a sua síntese (BECKMANN et alii, 1990).

Como se pode constatar, a resposta da célula ao "stress", não é somente uma interessante área de investigação *per se*, mas também constitui um excelente modelo para a análise dos processos celulares básicos envolvidos no controle da expressão gênica (AMARAL et alii, 1988).

A nível ultra-estrutural, após tratamento com choque térmico, têm sido observadas em fibroblasto de rato, alterações citoplasmáticas tais como: fragmentação do Complexo de Golgi, intumescimento das mitocôndrias, aumento das cristas mitocondriais e agregação dos filamentos intermediários ao redor do núcleo. Foram também verificadas modificações a nível nuclear, principalmente no que diz respeito aos aspectos morfológicos do nucléolo ou seja, um relaxamento no seu estado de condensação, além de mudanças tanto no número como no tamanho dos componentes ribonucleoproteicos e uma reorganização da sua rede fibrilar. Inclusões de actina foram também observadas no nucleoplasma (WELCH & SUHAN, 1985).

A maioria dos trabalhos que analisam a resposta das células ao "stress", são no entanto, eminentemente bioquímicos e de genética molecular; não são frequentes dados relativos a efeitos detectáveis ao nível citológico e citogenético. Menos frequentes ainda, são os trabalhos que

utilizam métodos citoquímicos para observações da ação do choque térmico sobre o núcleo celular.

Alguns trabalhos a nível citogenético, mostram que o choque térmico provoca inversões, fusões e fragmentações na estrutura de cromossomos de *Tradescantia* (SAX, 1937 - apud TARELHO, 1981a) e *Oenothera*, aumentando 4 a 5 vezes a frequência destas alterações quando a planta é submetida à choque hipotérmico (MARQUARDT, 1952 - apud TARELHO, 1981a). A baixa temperatura produz quebras cromossômicas e metáfases poliplóides em cultura de células humanas (HAMPEL & LEVAN, 1964).

Os efeitos do choque hipo- e hipertérmico sobre a espermatogênese de *Apis mellifera* mostram que a ocorrência de aberrações espontâneas (metáfases reduzidas), não é afetada pelo aumento de temperatura mas sim pelo abaixamento da mesma (TARELHO, 1981a) e que tanto temperaturas baixas quanto altas, provocam um atraso na migração dos cromossomos para os polos das células filhas (TARELHO, 1981b).

Em mioblastos de embrião de galinha, *in vitro*, embora a organização cromatínica, estudada por métodos citoquímicos, não se mostre alterada com a hipertermia, há evidências sugestivas de que tal tratamento possa induzir uma relativa aceleração de poliploidização nessas células (RANDI, 1990).

Em células HeLa, também submetidas a choque hipertérmico, a análise de imagens de interferência indica um aumento em massa seca nuclear associado às condições mais drásticas do "stress" (MIRANDA & MELLO, 1990).

No hemíptero *Triatoma infestans*, vetor da doença de Chagas, os fenótipos nucleares normais de alguns órgãos como os túbulos de Malpighi, já amplamente descritos (MELLO, 1971, 1975, 1976, 1978a,b, 1983), sofrem alterações sob diversas condições de "stress" tais como o jejum (MELLO, 1983, 1989; ANDRADE & MELLO, 1987; AMARAL & MELLO, 1990), tratamento com metais pesados (KUBRUSLY, 1984), e radiações ionizantes (ÁLVARES-GARCIA, 1988).

Estas alterações, previamente descritas e bem caracterizadas (KUBRUSLY, 1984; ANDRADE & MELLO, 1987; MELLO, 1989), referem-se à forma e tamanho nuclear, assim como ao estado de compactação da hetero- e da eucromatina. Assim, sob a ação desses agentes estressantes, foram encontrados núcleos gigantes, vacuolizados, picnóticos, núcleos com aparente descompactação parcial da heterocromatina e núcleos homogeneamente corados, sem distinção morfológica entre hetero- e eucromatina. Tais alterações foram admitidas como parte de possíveis respostas celulares às condições estressantes, desde uma possível tentativa de expressão gênica em loci silentes, até degeneração celular e mesmo tolerância celular.

Embora as alterações em fenótipos nucleares de células de *Triatoma infestans* tenham sido reportadas para diversas condições de "stress" outras que não o choque de temperatura, não se sabe ainda se o choque térmico promoveria mudanças fenotípicas nucleares, nem se estas seriam comparáveis às anteriormente reportadas.

Neste trabalho, portanto, pretende-se caracterizar as alterações promovidas por choques hipo- e hipertérmicos a nível de hetero- e eucromatina em células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* e compará-las aos dados reportados para as outras situações de "stress" no mesmo sistema. Por outro lado, pretende-se também verificar a influência de variações da temperatura na sobrevivência e muda dos insetos potencialmente susceptíveis de apresentarem as alterações a nível celular.

Além disso, pretende-se investigar se regiões cromatínicas normalmente inativas quanto à transcrição, tornar-se-iam ativas sob o efeito do choque térmico, através de procedimento citoquímico proposto por VIDAL (1979). Este método consiste em se estudar as características de basofilia de complexos DNA-proteína e RNA proteína corados com solução de azul de toluidina após tratamento com clupeína, uma protamina. A clupeína se liga a grupos fosfatos de ácidos nucleicos unicamente em situação de dupla fita (WARRANT & KIM, 1978; BALHORN, 1982), impedindo que moléculas de azul de toluidina se liguem aos mesmos sítios.

(VIDAL, 1979). Assim, onde houver moléculas de DNA sendo transcritas e moléculas de RNA em sua conformação usual, não haverá ligação da clupeína, ficando os grupos fosfatos dos ácidos nucleicos disponíveis à ligação com as moléculas de azul de toluidina. Será assim detectado um fenômeno de basofilia compatível ao número e proximidade de grupos fosfatos disponíveis (VIDAL, 1979).

Certamente, os dados aqui fornecidos poderão contribuir como subsídio para estudos futuros dos efeitos morfológicos e fisiológicos do choque térmico a nível nuclear, bem como fornecer evidências para um interrelacionamento entre diferentes condições de "stress" e, mesmo, possibilitar uma melhor caracterização de possíveis funções da heterocromatina, ainda não totalmente esclarecidas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material:

Neste trabalho foram utilizadas ninfas do 4º estadio de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) criadas nas condições do Insetário da SUCEN de Mogi-Guaçu (S.P.) e que foram fornecidas, graças à colaboração dos Srs. Antenor N. Ferraz Filho e Vera Lúcia C. C. Rodrigues.

Para o estabelecimento de curvas de sobrevivência e do quadro de mudas dos insetos nas condições experimentais, foram utilizadas ninfas alimentadas semanalmente com sangue de ave.

O estudo dos efeitos dos choques de temperatura a nível citológico foi efetuado em células epiteliais dos túbulos de Malpighi.

2. Métodos:

2.1. Curvas de sobrevivência

Para a determinação dos níveis de sobrevivência da população de insetos submetidos às temperaturas escolhidas, as ninfas criadas nas condições controle do Insetário da SUCEN foram deixadas à temperatura de 0°C ou 40°C por 1 e por 12 horas, retornadas às condições usuais do Insetário e acompanhadas por 30 dias a partir de então.

Para cada situação experimental foram utilizados 50 espécimes. Os controles, tanto quanto os animais após tratamento, foram mantidos durante toda a investigação a 30°C e 80% de umidade relativa - condições usuais do Insetário da SUCEN para esta espécie de triatomíneos*. Foi também acompanhado o processo de muda durante o mesmo período em que se analisou a sobrevivência dos insetos.

2.2. Choques de temperatura

Para o estudo dos efeitos dos choques hipo- e hipertérmico, a nível citológico foram escolhidas as temperaturas de 0°C e 40°C, respectivamente. Os insetos foram deixados nessa temperatura durante 1 hora ou 12 horas.

Analisaram-se indivíduos sacrificados imediatamente após o tempo estabelecido para o "stress", 3 dias depois (uma situação admitida como de "recuperação a curto prazo") e 1 mês depois ("recuperação a longo prazo").

*(RODRIGUES, V.L.C.C. - informação pessoal, 1988).

Atribuíram-se letras para a identificação das diferentes situações experimentais, levando-se em consideração o tempo e a temperatura a que os espécimes foram submetidos:

CONTROLE -----> A

0°C : 1h -----> B

10 min-2h após B ----> LB

3 dias após B -----> TB

1 mês após B -----> MB

0°C : 12hs -----> B'

10 min-2h após B'----> LB'

3 dias após B' -----> TB'

1 mês após B' -----> MB'

40°C : 1h -----> C

10 min-2h após C ----> LC

3 dias após C -----> TC

1 mês após C -----> MC

40°C : 12hs -----> C'

10 min-2h após C'----> LC'

3 dias após C' -----> TC'

1 mês após C' -----> MC'

Em cada situação foram utilizados 3 indivíduos identificados com a letra correspondente à condição experimental, seguida de um número que identifica individualmente cada inseto. Deste modo, os indivíduos controle foram denominados A₁, A₂ e A₃. Aqueles sacrificados logo após o choque de 0°C por 1 hora, LB₁, LB₂ e LB₃ e assim sucessivamente.

2.3. Obtenção dos preparados

Com o auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss, procedeu-se à dissecação dos insetos e à retirada dos túbulos de Malpighi, os quais foram estendidos sobre lâminas histológicas. A fixação foi realizada em etanol-ácido acético 3:1 por 1 minuto. A seguir, os preparados foram lavados em etanol a 70% por 5 minutos, deixados secar ao ar à temperatura ambiente e submetidos aos métodos de coloração.

2.4. Métodos de Coloração:

2.4.1. Reação de Feulgen

Os túbulos de Malpighi obtidos de acordo com as condições experimentais mencionadas nos itens 2.2 e 2.3 foram hidrolisados em HCl 4M durante 1 hora e 5 minutos à temperatura de 25°C e em seguida imersos rapidamente em HCl 0,1M gelado para paralisar o processo hidrolítico. O tempo de hidrólise utilizado foi aquele considerado como ótimo

no sentido de possibilitar o máximo de depuração do material (revisão em MELLO & VIDAL, 1978). Logo após, foram tratados com reativo de Schiff à temperatura ambiente por 40 minutos, seguindo-se 3 banhos em água sulfurosa (metabissulfito de sódio 10%; HCl 1 M e água destilada, 1:1:18), recém-preparada, durante 5 minutos cada. A seguir os preparados foram lavados em água destilada durante 2 minutos, desidratados em série etanólica a partir de etanol 70%, diafanizados em xilol P.A. durante 10 minutos e montados em bálsamo do Canadá.

2.4.2. Basofilia após tratamento com protamina (VIDAL, 1979).

Os túbulos dos insetos controle e submetidos ao choque térmico de 0°C durante 1h e 40°C durante 12h, foram obtidos por distensão ou esmagamento. Os túbulos estirados em lâminas histológicas foram processados conforme o item 2.3 e, aqueles obtidos por esmagamento foram fixados em etanol-ácido acético 3:1 durante 5 minutos e esmagados em solução de ácido acético 45% entre lâmina e lamínula, mergulhados em nitrogênio líquido para remoção das lamínulas, lavados em etanol 70% por 5 minutos e secados ao ar à temperatura ambiente. Os preparados obtidos pelos dois procedimentos foram submetidos às seguintes reações:

a) Coloração com solução de azul de toluidina (Merck) a 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4,0 durante 20 minutos.

b) Tratamento com solução saturada de clupeína (Sigma), durante 2 horas a 37°C seguido de coloração azul de toluidina (item a).

c) Tratamento com RNase III (Sigma) a 0,05% durante 1h e 30 minutos a 37°C, seguido por tratamento com solução saturada de clupeína durante 2 horas a 37°C e pela coloração com azul de toluidina (item a).

2.5. Observações e Contagens:

As observações foram efetuadas em microscópio binocular Zeiss, usando-se objetiva de 40x e ocular de 10x.

Nos preparados submetidos à reação de Feulgen realizou-se contagem de núcleos do total de células epiteliais nos túbulos de Malpighi, diferenciando-se os diversos fenótipos nucleares encontrados.

Os preparados submetidos aos tratamentos descritos no item 2.4.2. foram observados para a detecção de basofilia nuclear a nível cromatínico, buscando-se verificar a disponibilidade de grupos fosfatos livres do DNA da heterocromatina ao azul de toluidina, em termos de características de basofilia (VIDAL, 1987), nas diferentes condições experimentais.

RESULTADOS

1. Níveis de sobrevivência dos insetos

Nas figuras 1 a 3 são apresentadas as curvas de sobrevivência e o índice de muda para as ninfas submetidas à situação controle (Fig.1) e aos choques hipo- (Fig.2) e hipertérmico (Fig.3) durante 1h e 12h. Os percentuais de sobrevivência obtidos nas diferentes situações experimentais após 30 dias, estão reunidos na TABELA 1.

Pôde-se observar um alto nível de sobrevivência para as ninfas em situação controle (Fig. 1; Tabela 1) e ao mesmo tempo, a partir do 15º dia do período considerado, uma alta incidência de mudas, atingindo 80% dos indivíduos, no 30º dia (Fig.1).

Na situação experimental de choque hipotérmico, apenas quando o tempo do choque foi de 12h, houve acentuada modificação no perfil da curva de sobrevivência, com uma queda brusca nos índices de sobrevida no período compreendido entre o 2º e o 11º dias pós-choque (Fig.2). Esta situação conduziu ao menor nível de sobrevivência, no período de 30 dias, dentre as situações testadas (Tabela 1). Por outro lado, a incidência de mudas apresentou-se afetada mesmo quando o tempo de choque foi de 1h, porém foi muito mais drástica após 12h de choque, quando um máximo de 6% do total de indivíduos testados, ou 9% dos sobreviventes, sofreram muda, considerando-se o período de 30 dias (Fig 2).

Já o choque hipertérmico não parece ter afetado em larga escala a sobrevivência das ninfas (Fig. 3; Tabela 1). No entanto, a incidência de mudas se reduziu, quando o choque se processou por 1h (máximo, 18% do total de indivíduos) ou mudou a velocidade do seu avanço, quando o choque se processou por 12h (Fig. 3).

FIGURA 1. Curva de sobrevivência e percentual de muda de ninfas de 4º estadio de *Triatoma infestans* sob condições controle de temperatura.

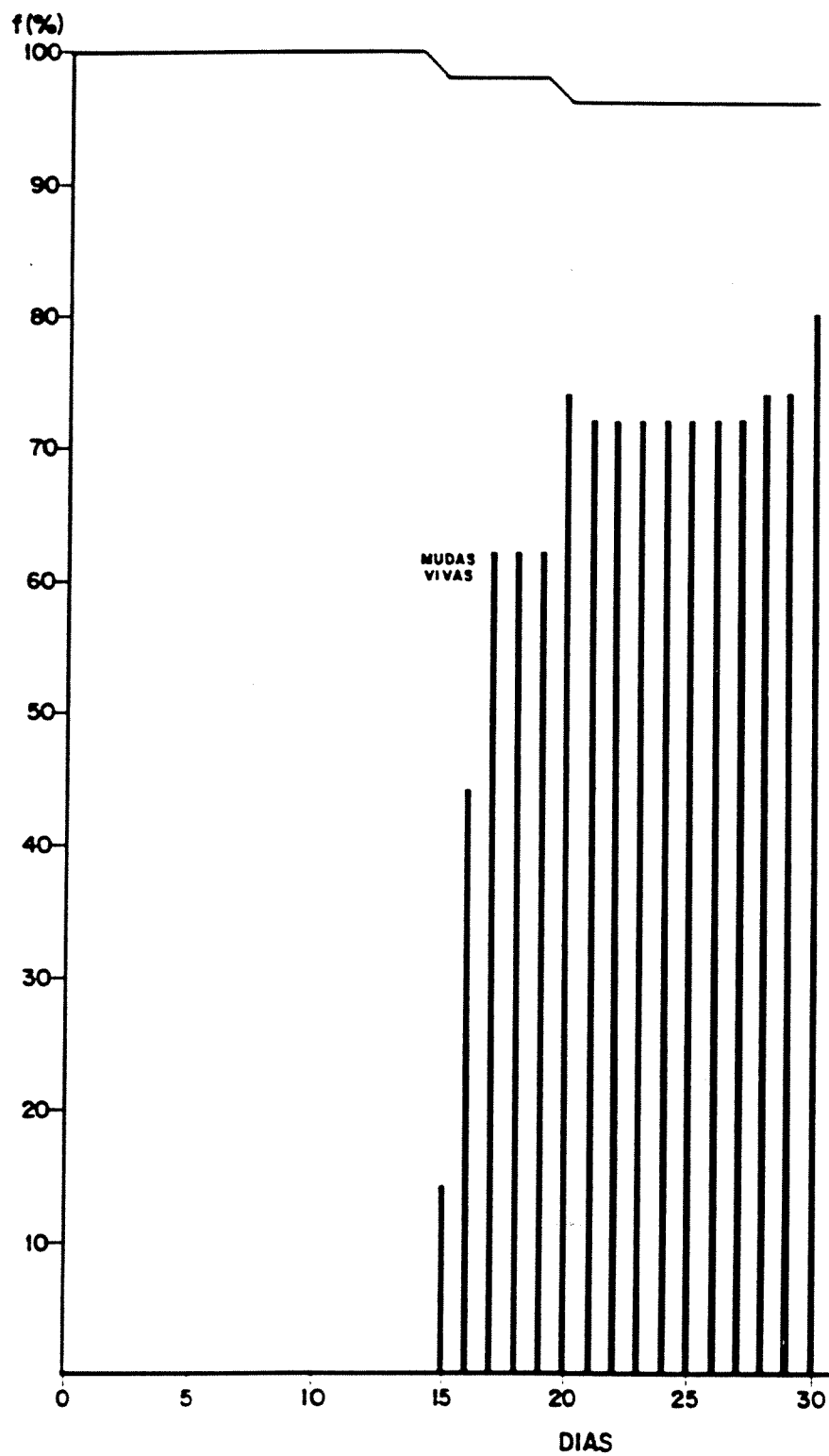


FIGURA 2. Curva de sobrevivência (1h,----- e 12h,——) e percentual de muda (1h, blocos claros e 12h, blocos escuros) de ninfas do 4º estadio de *Triatoma infestans* submetidas ao choque hipotérmico de 0°C.

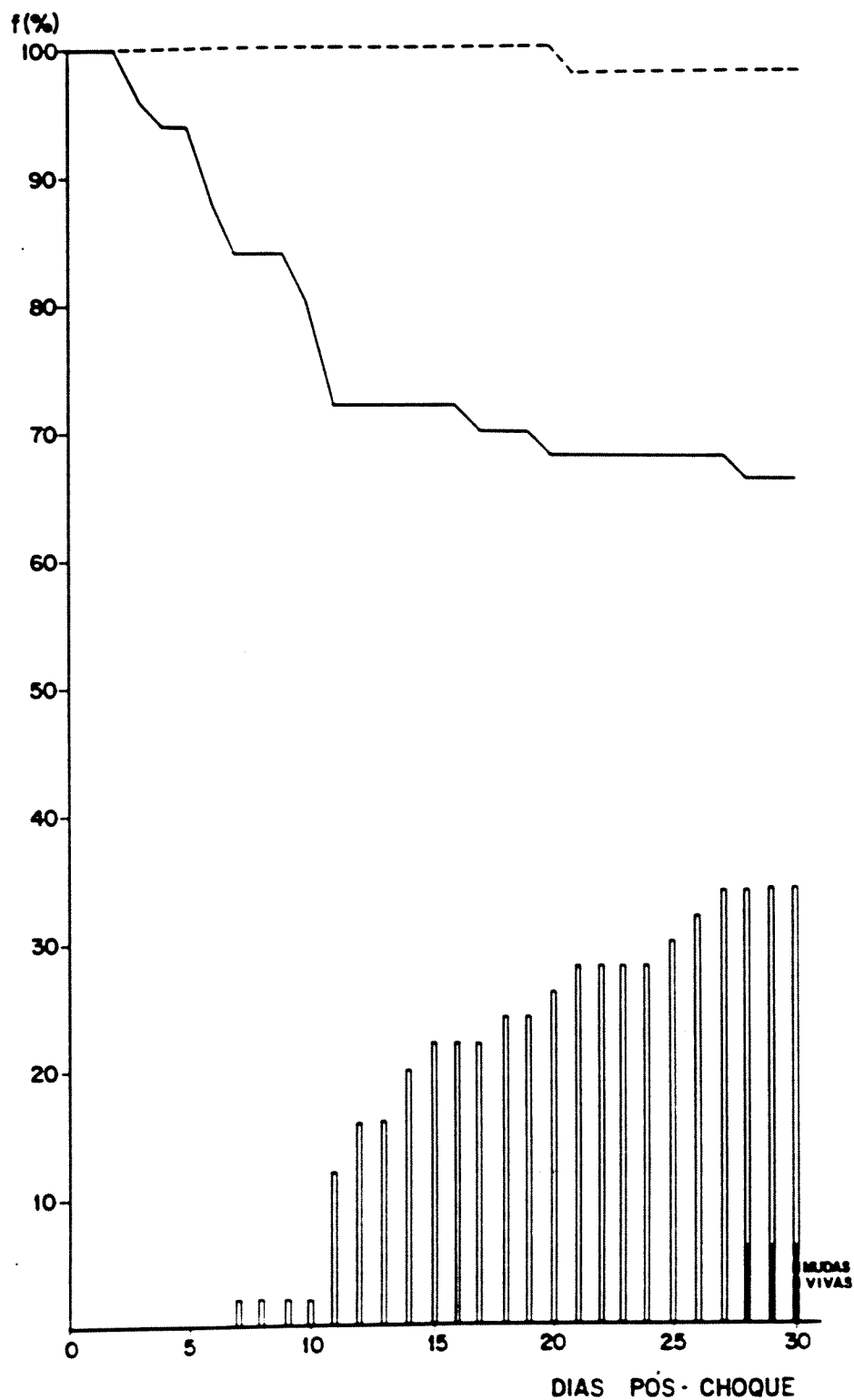


FIGURA 3. Curva de sobrevivência (1h,----- e 12h,——) e percentual de muda (1h, blocos claros e 12h, blocos escuros) de ninfas do 4º estadio de *Triatoma infestans* submetidas ao choque hipertérmico de 40°C.

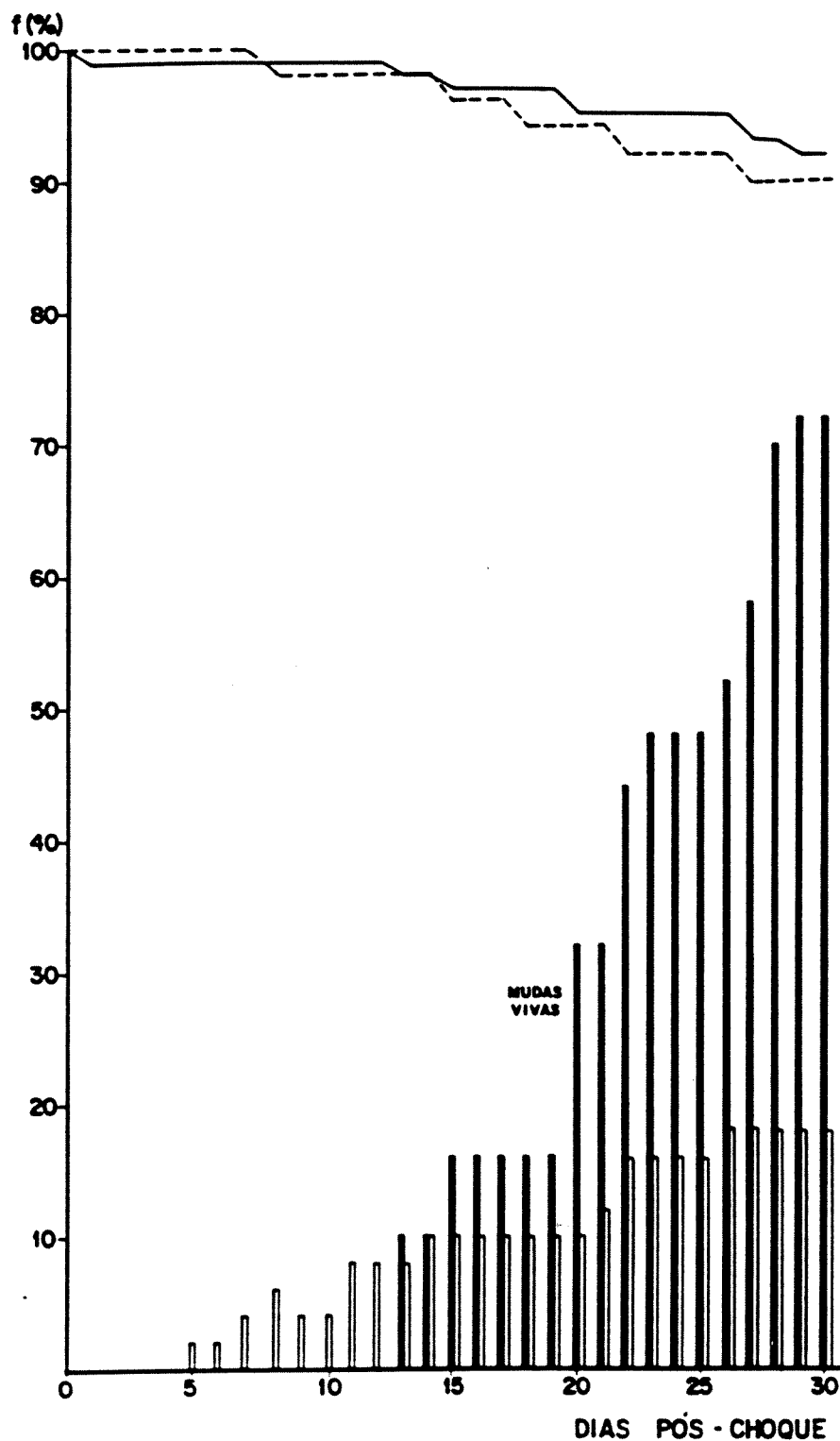


TABELA 1. Percentuais de sobrevivência, 30 dias após choque de temperatura em ninfas do 4º estadio de *Triatoma infestans*. (n = 50).

CONDICÕES	SOBREVIVÊNCIA
EXPERIMENTAIS	%
Controle; 30°C	96
Choque hipotérmico	
0°C, 1h	98
0°C, 12h	66
Choque hipertérmico	
40°C, 1h	90
40°C, 12h	92

2. Fenótipos nucleares : Descrição visual

Os diferentes fenótipos nucleares das células epiteliais dos túbulos de Malpighi de ninfas do 4º estadio de *T. infestans*, encontrados nos preparados obtidos nas diferentes condições utilizadas neste trabalho são mostrados nas Figuras 4 a 13.

Os fenótipos considerados normais apresentam um, dois ou vários corpos heterocromáticos (Fig. 4 a 6) (MELLO, 1971, 1975, 1976).

Os núcleos com um cromocentro (confluência de regiões heterocromáticas num só corpo) (MELLO, 1978c) são arredondados ou elipsoidais, apresentando a eucromatina geralmente granular e o corpo heterocromático aproximadamente esférico e localizado próximo ao centro da imagem nuclear (Fig. 4). O que possui dois cromocentros (Fig.5), assemelha-se em tamanho e forma ao descrito anteriormente; os dois corpos heterocromáticos encontram-se geralmente bem nítidos e próximos um do outro, enquanto a eucromatina apresenta um aspecto granular como no núcleo com um cromocentro. Os núcleos com vários cromocentros (Fig.6) apresentam forma elipsoidal ou ovalada e podem exhibir três, quatro ou mais corpúsculos heterocromáticos. Geralmente apresentam um tamanho semelhante ao dos outros dois anteriormente descritos. A sua eucromatina é finamente granular.

FIGURAS 4 a 13. Fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de 4º estadio de *Triatoma infestans* após reação de Feulgen.

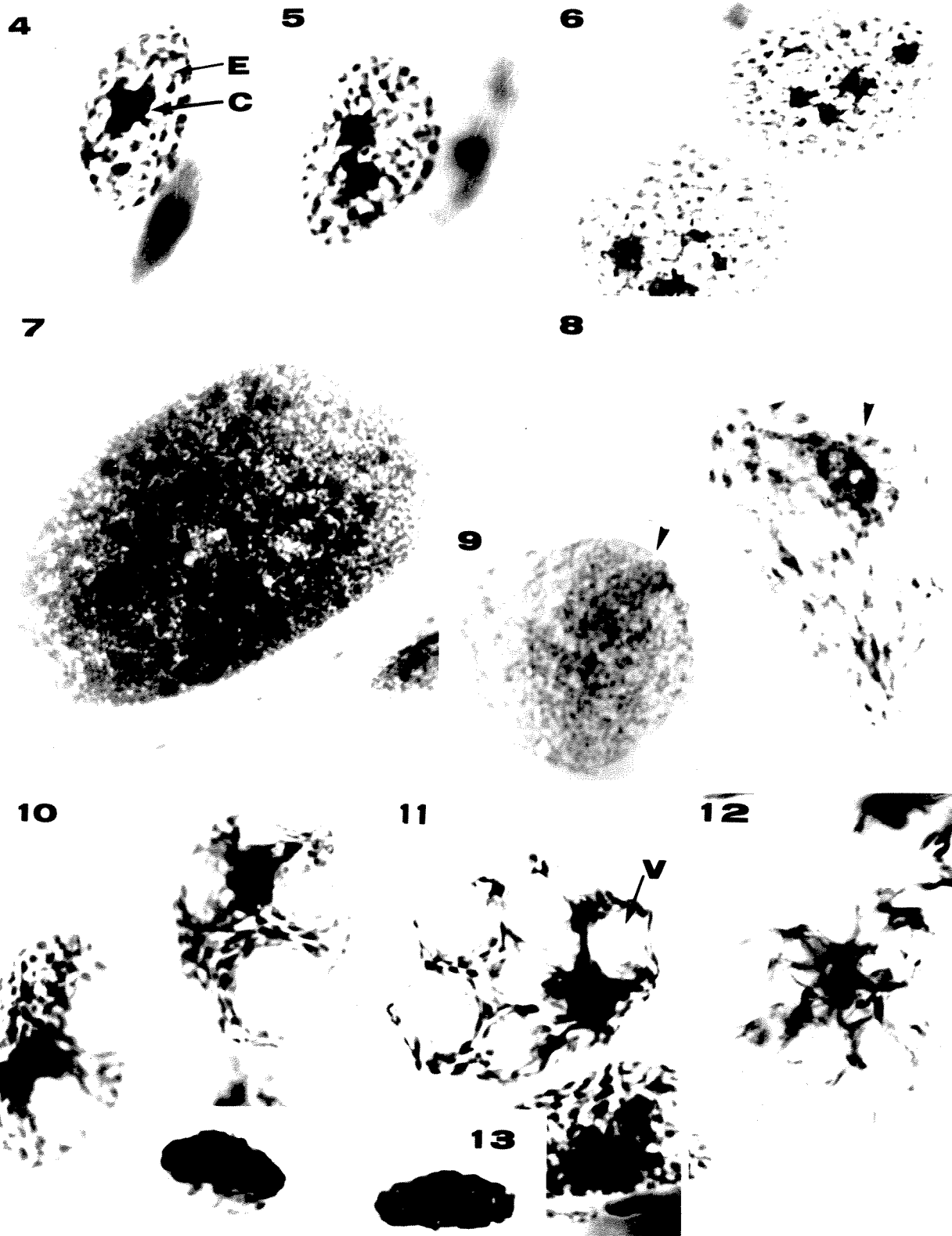
Figuras 4 a 6 - Núcleos com 1, 2 e vários cromocentros respectivamente. Cromocentro (C), eucromatina (E). x 1.500

Figura 7 - Núcleo gigante com vários cromocentros. x 1.300

Figuras 8 e 9 - Núcleos descompactados. Notar a descompactação parcial da heterocromatina (seta) (Fig.8) e, total da cromatina (seta) dificultando a distinção entre as regiões hetero- e eucromaticas (Fig. 9). x 1.500

Figuras 10 a 12 - Núcleos em níveis gradativos de vacuolização: Inicial (Fig. 10), avançada (Fig. 11) e final (Fig. 12). V = vacúolo. x 1.500

Figura 13 - Núcleos picnóticos. Notar a extrema compactação da cromatina. x 1.500



Além destes fenótipos, foram encontrados outros com características diferentes. Estes núcleos com fenótipos considerados alterados (Figs. 7 a 13) recebem neste trabalho as mesmas denominações já utilizadas em trabalhos anteriores (KUBRUSLY, 1984; ÁLVARES & MELLO, 1987; ANDRADE & MELLO, 1987; AMARAL & MELLO, 1989; MELLO, 1989).

Os núcleos com o fenótipo **gigante** possuem tamanho notoriamente aumentado com relação aos normais, podendo apresentar um ou mais corpos heterocromáticos (Fig. 7).

Os núcleos **descompactados** apresentam tamanho semelhante ao dos núcleos normais, mas caracterizam-se por apresentar o cromocentro único parcialmente descompactado (Fig. 8), difuso e eucromatina igualmente descompactada (Fig. 9). Este último aspecto do núcleo descompactado foi denominado por KUBRUSLY (1984) de homogêneo, por não possibilitar distinção muito evidente entre hetero- e eucromatina.

Os núcleos **vacuolizados** (Figs. 10 a 12) mostram sinais evidentes de desorganização do material cromatínico, resultando numa deformação do contorno nuclear. A presença de vacúolos é a característica marcante deste fenótipo e determina níveis gradativos de desorganização nuclear: núcleos em fase inicial de degeneração, com duas ou três estruturas vacuolizadas e início de deformação do contorno nuclear (Fig. 10), núcleos em um estágio mais avançado de degeneração, cujas áreas vacuolizadas aumentam em relação à fase inicial podendo apresentar uma forma estrelada ou

não bem definida e com o cromocentro, quando evidente, dilatado, fragmentado ou com uma forma estrelada (Fig. 11), além de núcleos numa fase final de degeneração, onde o material nuclear mostra-se claramente desintegrado (Fig. 12).

Os núcleos **picnóticos** (Fig. 13), também em processo de degeneração, apresentam o material cromatínico densamente compactado e um tamanho consideravelmente reduzido quando comparados aos normais, corando-se intensamente quando submetidos à reação de Feulgen.

3. Micronucleação

Somente na situação de 40°C por 1h, foram encontradas eventualmente, algumas ninfas que apresentavam 10 a 15 dias após o choque, anomalias no seu desenvolvimento, tais como mudas que não se completavam ou falta de pigmentação após a muda.

Nestas, pôde ser detectado o fenômeno de micronucleação (Fig. 14), nunca antes descrito para células dos túbulos de Malpighi de tratomíneos em outras condições de "stress".

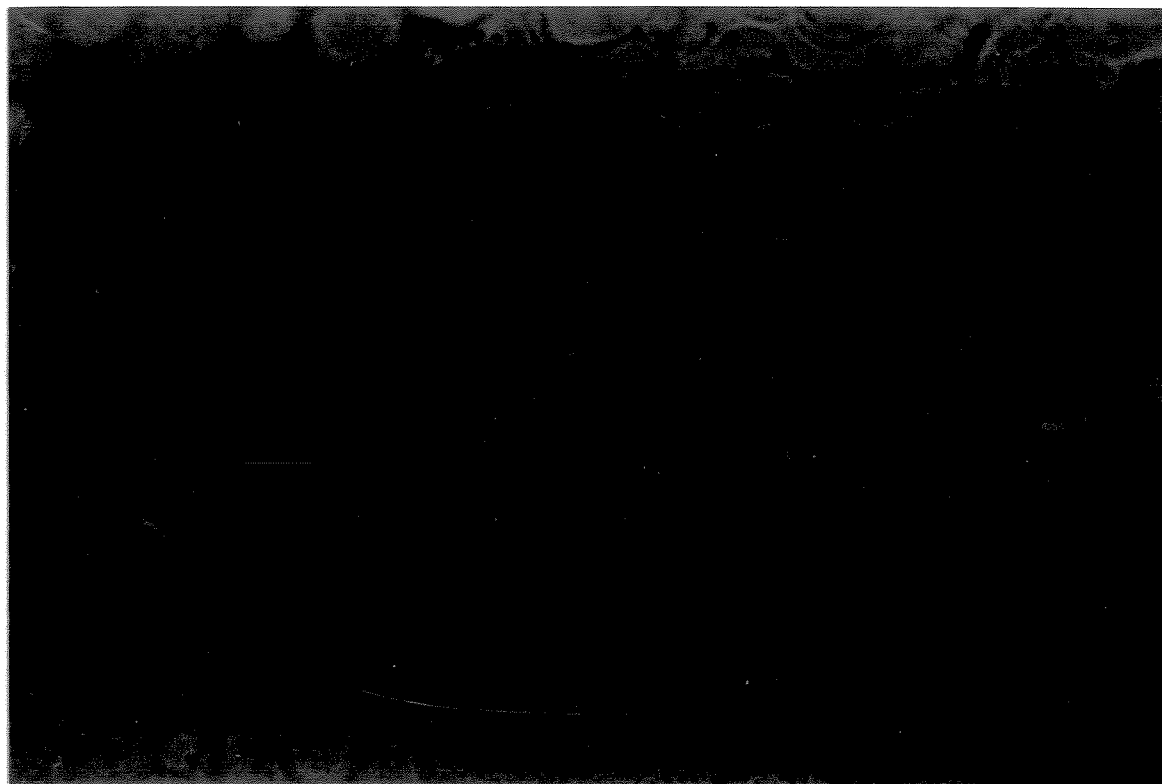


FIGURA 14. Alterações nucleares detectadas em células epiteliais de túbulo de Malpighi de ninfa do 4º estadio de *Triatoma infestans*, submetida a choque de 40°C por 1h e que apresentava anomalias no seu desenvolvimento.

Picnose (P) Micronucleação (seta). x 1.100



FIGURA 14. Alterações nucleares detectadas em células epiteliais de túbulo de Malpighi de ninfa do 4º estadio de *Triatoma infestans*, submetida a choque de 40°C por 1h e que apresentava anomalias no seu desenvolvimento.

Picnose (P) Micronucleação (seta). x 1.100

4. Frequência dos diferentes fenótipos nucleares.

O número total de núcleos das células epiteliais de túbulos de Malpighi e a frequência de distribuição dos diversos fenótipos nucleares por espécime, detectados nas diferentes condições experimentais deste trabalho, são mostrados nas tabelas 2 e 3. Dada a variabilidade individual de resultados, optou-se por este tipo de apresentação dos dados.

Foram observados nas situações experimentais (0°C e 40°C por 1h e 12h), fenótipos nucleares alterados (Tabelas 2 e 3). Ao lado destes, fenótipos normais também se fizeram presentes. De fato, na grande maioria dos casos, o fenótipo mais frequente foi aquele com um único cromocentro (1C) (Tabelas 2 e 3), exceto para os indivíduos na situação MB', em que foram mais frequentes os núcleos com vários cromocentros (VC) (Tabela 2).

Dentre os fenótipos nucleares alterados, o tipo caracterizado por vacuolização foi apresentado por todos indivíduos em todas as situações experimentais. Nos controles deste experimento, este fenótipo também foi observado, embora em percentual mais baixo. O grupo submetido ao choque hipotérmico de 0°C durante 12h e analisado um mês depois (MB'), apresentou o percentual mais alto de núcleos vacuolizados em relação às demais situações experimentais (Tabela 2).

Por outro lado, o fenótipo **gigante** apareceu com uma maior frequência nos indivíduos analisados um mês depois após terem sido submetidos ao choque hipertérmico de 40°C durante 12h (MC'), seguido pelos indivíduos analisados um mês após o choque hipotérmico de 0°C por 1h (MB), 3 dias após 40°C por 12h (TC'), 3 dias após 40°C por 1h (TC), e em apenas um dos indivíduos submetidos ao choque de 40°C por 12h e analisados 10 minutos a 2h após o choque (LC'). Eventual aparecimento deste fenótipo, embora não muito representativo (menos de 1%) ocorre nas outras situações experimentais e no próprio controle. (Tabelas 2 e 3).

O fenótipo nuclear **descompactado** é encontrado em todas as situações experimentais, embora com uma maior frequência nos indivíduos submetidos ao choque hipertérmico, principalmente naqueles analisados 10 minutos a 2h após terem sido submetidos a 40°C durante 12h (LC') e 1 h (LC). (Tabela 3).

Somente nos indivíduos analisados um mês após o choque hipotérmico de 0°C por 1h (MB) (Tabela 2) e, em muito baixa percentagem naqueles analisados 10 min a 2h após o choque de 40°C por 12h e um mês após serem expostos a 40°C por 1h (MC) (Tabela 3), foi constatada a presença de núcleos **picnóticos**.

São evidentes as diferenças encontradas nos indivíduos de um mesmo grupo, analisados com relação aos diversos fenótipos e suas frequências ou, quando comparados os grupos entre si nos diferentes experimentos considerados.

TABELA 2. Frequência absoluta (N) e percentual (%) dos fenótipos nucleares encontrados em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas do 4º estadio de *T. infestans* após o choque hipotérmico de 0°C efetuado por 1h (B) e 12h (B').

SIT.	INDIVÍDUOS	FENÓTIPOS												TOTAL		
		NUCLEARES						NUCLEARES						DE		
EXP.	ANALISADOS	1C		2C		VC		V		G		D		P		NUCLEOS
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
A	A1	10.415	85,98	275	2,27	1.390	11,47	15	0,12	14	0,11	4	0,03	-	-	12.113
	A2	9.380	81,11	270	2,33	1.865	16,12	14	0,12	-	-	35	0,30	-	-	11.564
	A3	10.500	88,11	236	1,98	1.150	9,65	10	0,08	-	-	20	0,16	-	-	11.916
LB	LB1	9.281	93,26	33	0,33	45	0,45	315	3,16	-	-	277	2,78	-	-	9.951
	LB2	9.980	94,57	163	1,54	269	2,54	124	1,17	-	-	17	0,16	-	-	10.553
	LB3	5.789	78,34	76	1,02	1.161	15,71	273	3,69	-	-	90	1,21	-	-	7.389
TB	TB1	9.329	96,03	69	0,71	24	0,24	272	2,80	-	-	20	0,20	-	-	9.714
	TB2	9.161	94,23	105	1,08	131	1,34	210	2,16	3	0,03	111	1,14	-	-	9.721
	TB3	8.040	96,68	81	0,97	93	1,11	96	1,15	-	-	6	0,07	-	-	8.316
MB	MB1	3.371	85,75	75	1,90	219	5,57	25	0,63	185	4,70	-	-	56	1,42	3.931
	MB2	7.490	96,62	95	1,22	18	0,23	76	0,98	52	0,67	21	0,27	-	-	7.752
	MB3	7.695	96,70	18	0,22	17	0,21	176	2,21	28	0,35	10	0,12	13	0,16	7.957
LB'	LB'1	8.369	85,37	925	9,43	172	1,75	45	0,45	-	-	292	2,97	-	-	9.803
	LB'2	9.283	94,57	54	0,55	180	1,85	13	0,13	-	-	180	1,85	-	-	9.716
	LB'3	6.787	67,61	532	5,29	2.194	21,85	306	3,04	-	-	219	2,18	-	-	10.040
TB'	TB'1	8.502	96,04	97	1,09	93	1,05	117	1,32	-	-	43	0,48	-	-	8.852
	TB'2	8.404	95,64	104	1,18	90	1,02	153	1,74	-	-	36	0,40	-	-	8.787
	TB'3	9.069	95,48	106	1,11	190	2,00	123	1,29	-	-	13	0,13	-	-	9.498
MB'	MB'1	1.113	19,68	32	0,56	4.134	73,11	369	6,52	-	-	6	0,10	-	-	5.654
	MB'2	1.747	31,86	36	0,65	3.325	60,64	371	6,76	-	-	4	0,07	-	-	5.483
	MB'3	2.847	39,51	202	2,80	3.841	53,31	292	4,05	-	-	22	0,30	-	-	7.204

A = Controle; 1C = Um cromocentro; 2C = Dois cromocentros; D = Descompactado; G = Gigante; LB = 10 min-2h após 0°C:1h; LB' = 10 min-2h após 0°C:12h; MB = Um mês após 0°C:1h; MB' = Um mês após 0°C:12h; P = Picnótico; Sit. Exp. = Situação Experimental; TB = Três dias após 0°C:1h; TB' = Três dias após 0°C:12h; V = Vacuolizado; VC = Vários cromocentros.

TABELA 3. Frequência absoluta (N) e percentual (%) dos fenótipos nucleares encontrados em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas do 4º estadio de *T. infestans* após o choque hipertérmico de 40°C efetuado por 1h (C) e 12h (C').

SIT.	INDIVÍDUOS	FENÓTIPOS														NUCLEARES		P		TOTAL DE NÚCLEOS
EXP.	ANALISADOS	1C		2C		VC		V		G		D		P						
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%					
A	A ₁	10.415	85,98	275	2,27	1.390	11,47	15	0,12	14	0,11	4	0,03	-	-	12.113				
	A ₂	9.380	81,11	270	2,33	1.865	16,12	14	0,12	-	-	35	0,30	-	-	11.564				
	A ₃	10.500	88,11	236	1,98	1.150	9,65	10	0,08	-	-	20	0,16	-	-	11.916				
LC	LC ₁	4.016	75,83	25	0,47	195	3,68	178	3,36	8	0,15	874	16,50	-	-	5.296				
	LC ₂	5.800	74,47	249	3,19	1.476	18,95	205	2,63	-	-	58	0,74	-	-	7.788				
	LC ₃	7.721	93,78	142	1,72	193	2,34	145	1,76	2	0,02	30	0,36	-	-	8.233				
TC	TC ₁	5.579	92,56	11	0,18	181	3,00	108	1,79	47	0,77	101	1,67	-	-	6.026				
	TC ₂	2.069	49,20	34	0,80	1.814	43,13	259	6,15	3	0,07	26	0,61	-	-	4.205				
	TC ₃	5.776	93,10	110	1,77	154	2,48	116	1,86	10	0,16	38	0,61	-	-	6.204				
MC	MC ₁	4.596	84,36	28	0,51	740	13,58	68	1,24	-	-	4	0,07	6	0,11	5.448				
	MC ₂	5.103	84,93	25	0,41	810	13,48	60	0,99	-	-	6	0,09	4	0,06	6.008				
	MC ₃	4.302	84,61	36	0,70	646	12,70	72	1,41	26	0,51	2	0,03	-	-	5.084				
LC'	LC' ₁	1.556	52,14	12	0,40	198	6,63	124	4,15	96	3,21	992	33,24	6	0,20	2.984				
	LC' ₂	4.524	77,33	15	0,25	149	2,54	155	2,64	-	-	1.003	17,14	4	0,06	5.850				
	LC' ₃	8.695	95,10	113	1,23	232	2,53	62	0,67	-	-	41	0,44	-	-	9.143				
TC'	TC' ₁	3.185	59,95	85	1,60	1.817	34,20	84	1,58	25	0,4	116	2,18	-	-	5.312				
	TC' ₂	6.797	90,61	167	2,22	126	1,67	109	1,45	51	0,67	251	3,34	-	-	7.501				
	TC' ₃	5.606	83,24	26	0,38	818	12,14	124	1,84	32	0,47	128	1,90	-	-	6.734				
MC'	MC' ₁	3.921	84,03	19	0,40	102	2,18	130	2,78	389	8,33	5	0,10	-	-	4.666				
	MC' ₂	4.454	75,98	48	0,81	612	10,40	199	3,39	327	5,57	22	0,37	-	-	5.862				
	MC' ₃	5.056	84,29	43	0,71	650	10,83	89	1,48	160	2,66	-	-	-	-	5.998				

A = Controle; 1C = Um cromocentro; 2C = Dois cromocentros; D = Descompactado; G = Gigante; LC = 10 min-2h após 40°C:1h; LC' = 10 min-2h após 40°C:12h; MC = Um mês após 40°C:1h; MC' = Um mês após 40°C:12h; P = Picnótico; Sit. Exp. = Situação Experimental; TC = Três dias após 40°C:1h; TC' = Três dias após 40°C:12h; V = Vacuolizado; VC = Vários cromocentros.

5 - Basofilia nuclear após tratamento com clupeína

As Figuras 15 a 22 documentam os aspectos nucleares da coloração pelo azul de toluidina a pH 4,0 (AT) em preparados previamente tratados com clupeína.

Nos insetos controle, como esperado (MELLO, 1980), os núcleos exibem metacromasia tanto na eucromatina como na heterocromatina, após coloração com AT, ou seja, essas estruturas se coram em violeta (Fig. 15).

O uso da clupeína antes da coloração pelo AT também como esperado (MELLO, 1985), faz com que os cromocentros (heterocromatina) deixem de exibir a metacromasia, corando-se em verde (Fig. 16). A eucromatina, por outro lado, continua metacromática, uma resposta citoquímica que é abolida quando o tratamento com clupeína é precedido por digestão com RNase (Fig. 17). Neste último caso permanecem coradas metacromaticamente, no citoplasma, granulações possivelmente de natureza glicosaminoglicânica ácida (VIDAL, 1987b; MELLO & VIDAL, 1980).

Por outro lado, os núcleos dos insetos submetidos ao choque térmico de 40°C por 12h e que apresentavam descompactação da heterocromatina como o padrão salientado nas Figs. 8 e 9, quando tratados pela clupeína exibiram coloração metacromática homogeneamente distribuída (Figs. 18 e 19). Em alguns núcleos mais fortemente esmagados e apenas corados com AT, detectou-se também resposta metacromática,

5 - Basofilia nuclear após tratamento com clupeína

As Figuras 15 a 22 documentam os aspectos nucleares da coloração pelo azul de toluidina a pH 4,0 (AT) em preparados previamente tratados com clupeína.

Nos insetos controle, como esperado (MELLO, 1980), os núcleos exibem metacromasia tanto na eucromatina como na heterocromatina, após coloração com AT, ou seja, essas estruturas se coram em violeta (Fig. 15).

O uso da clupeína antes da coloração pelo AT também como esperado (MELLO, 1985), faz com que os cromocentros (heterocromatina) deixem de exibir a metacromasia, corando-se em verde (Fig. 16). A eucromatina, por outro lado, continua metacromática, uma resposta citoquímica que é abolida quando o tratamento com clupeína é precedido por digestão com RNase (Fig. 17). Neste último caso permanecem coradas metacromaticamente, no citoplasma, granulações possivelmente de natureza glicosaminoglicânica ácida (VIDAL, 1987b; MELLO & VIDAL, 1980).

Por outro lado, os núcleos dos insetos submetidos ao choque térmico de 40°C por 12h e que apresentavam descompactação da heterocromatina como o padrão salientado nas Figs. 8 e 9, quando tratados pela clupeína exibiram coloração metacromática homogeneamente distribuída (Figs. 18 e 19). Em alguns núcleos mais fortemente esmagados e apenas corados com AT, detectou-se também resposta metacromática,

homogênea nos vários pontos cromatínicos dissociados ou mesmo mais intensa em alguns pontos admitidos como parte de cromocentros (Fig. 20).

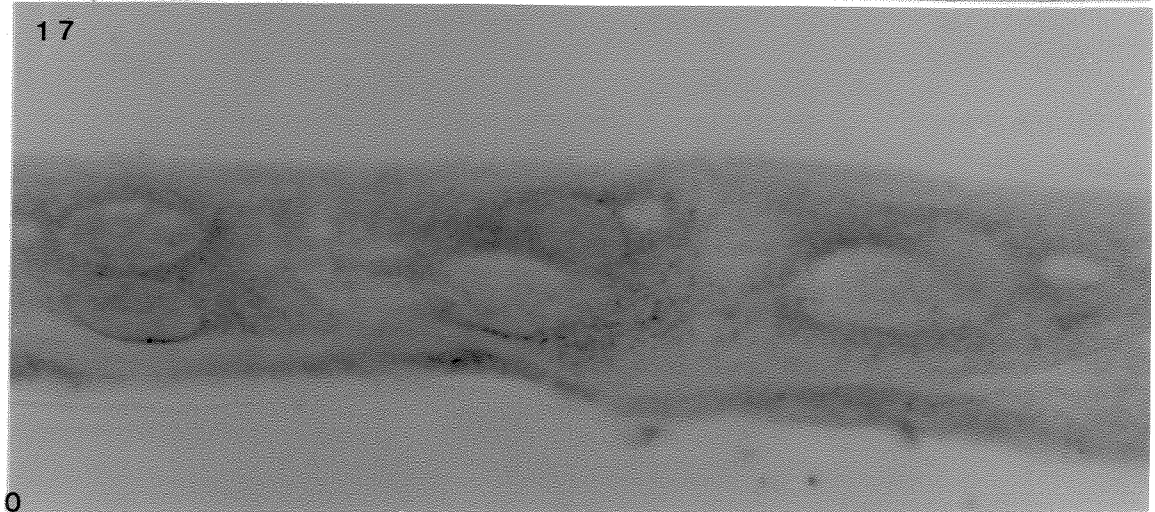
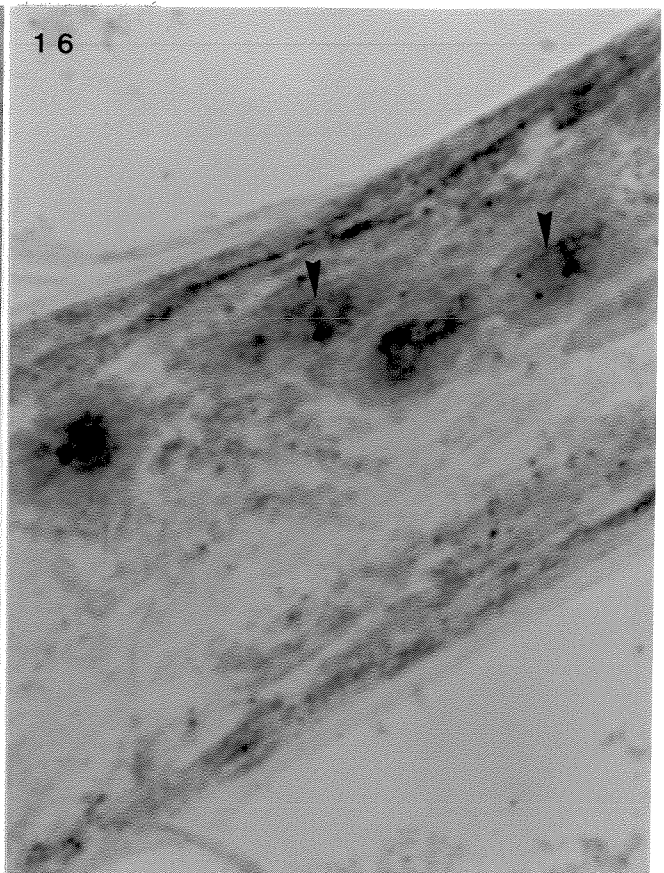
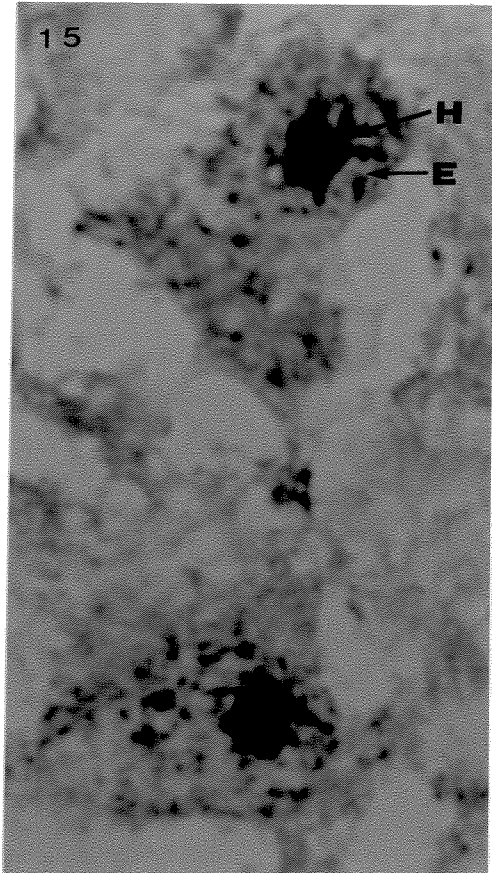
Os núcleos dos insetos submetidos a 0°C por 1h, com descompactação do cromocentro, quando tratados pela clupeína apresentaram-se igualmente metacromáticos (Fig. 21), embora a intensidade da coloração violeta fosse muito menor que nos núcleos dos insetos submetidos a 40°C por 12h (Figs. 18 e 19).

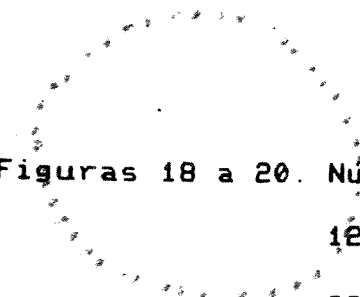
Os núcleos com fenótipos outros que o descompactado apresentaram neste trabalho geralmente, resposta ao método citoquímico, semelhante ao controle. (Fig. 22).

Figura 15. Núcleos obtidos por esmagamento de túbulos de Malpighi de insetos do grupo controle, corados com AT. Notar a intensa metacromasia da eucromatina (E) e heterocromatina (H). x 1.100

Figura 16. Núcleos obtidos por distensão de túbulos de Malpighi de insetos do grupo controle, tratados com clupeína e corados pelo AT. Observar que os cromocentros (setas) não mais apresentam metacromasia, corando-se em verde. x 950

Figura 17. Núcleos obtidos por distensão de túbulos de Malpighi de insetos do grupo controle, submetidos à digestão com RNase seguido por tratamento com clupeína e coloração com AT. x 650





Figuras 18 a 20. Núcleos de insetos submetidos a 40°C por 12h, obtidos por distensão (Fig. 18) e esmagamento (Figs. 19 e 20) dos túbulos de Malpighi. As figuras 18 e 19 mostram núcleos tratados com clupeína e corados pelo AT. As setas indicam núcleos com cromocentros descompactados apresentando resposta metacromática. x 900. A figura 20 mostra núcleos somente corados pelo AT. Observar pontos cromatínicos dissociados (setas). x 1.100

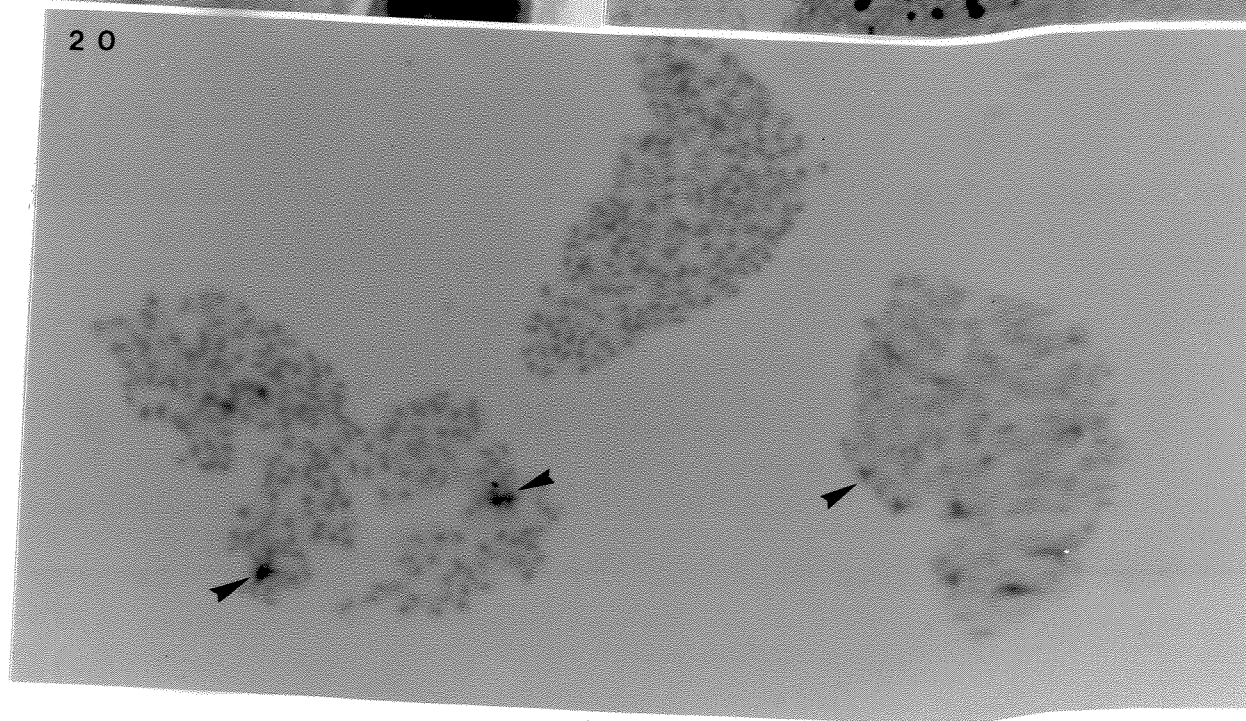
18

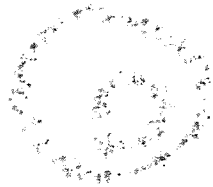


19

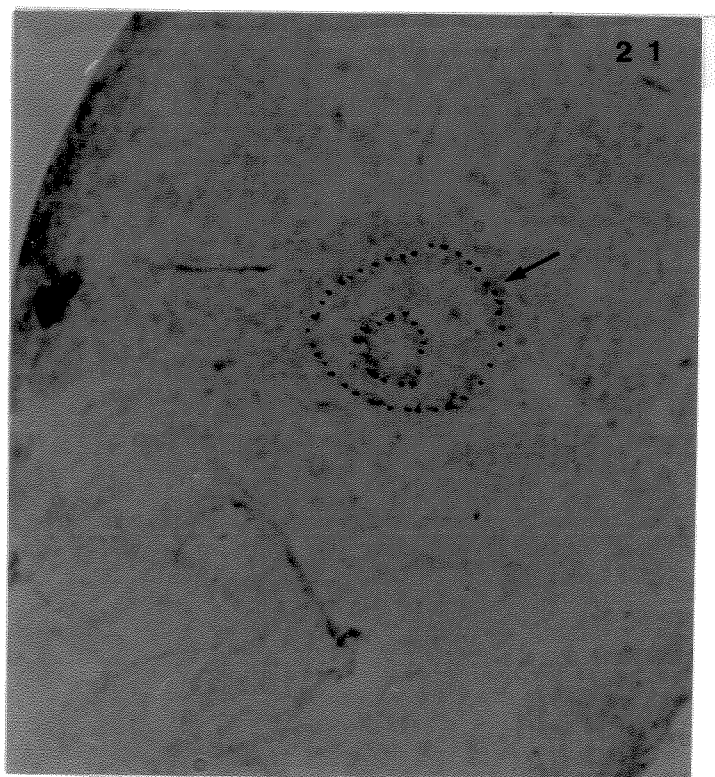


20





Figuras 21 e 22. Núcleos obtidos por distensão de túbulo de Malpighi de insetos submetidos a 0°C por uma hora, tratados com clupeína e corados pelo AT. Na Fig. 21 acha-se indicado núcleo com o fenótipo descompactado. x 900. A figura 22 evidencia núcleos não descompactados com resposta similar ao controle. x 1.100.



DISCUSSÃO

1. Choque de temperatura: efeitos sobre fenótipos nucleares e sobrevivência dos insetos.

Os resultados apresentados demonstraram que tanto após o choque hipertérmico como após o choque hipotérmico são promovidas alterações nas células dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, que se salientam em parte de sua população nuclear. Embora a maioria dos núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi houvessem mantido nessas circunstâncias o aspecto fenotípico nuclear considerado normal para os controles (MELLO, 1969, 1971), algumas significativas alterações a nível de fenótipo nuclear apareceram com o choque.

Com base nos dados levantados é para se supor também que ninfas de 4º estadio de *Triatoma infestans*, submetidas a choque de temperatura e que apresentem fenótipos nucleares alterados quanto à classificação ou frequência, poderão ter simultaneamente sua sobrevivência e seu desenvolvimento afetados por essa condição. Assim, o desenvolvimento ninfal apresentou-se alterado em todas as condições experimentais estudadas, reduzindo-se a frequência de mudas no período de 30 dias, pós-choque, e no caso do choque a 40°C, a velocidade de avanço desse processo de

desenvolvimento, para o mesmo período. No entanto, dentre as situações testadas, apenas o choque hipotérmico durante 12h induziu uma sensível queda de sobrevivência.

O aparecimento de mudas mais precocemente nos espécimes submetidos às situações de choque embora em baixa frequência, pode ter sido ocasionado por ligeiras diferenças individuais no que se refere ao estado nutricional e de desenvolvimento das ninfas no momento do choque*. A frequência significativamente reduzida de mudas nos espécimes submetidos aos choques de temperatura, no entanto, não poderia ser explicada unicamente por diferenças individuais a esse nível. Além disso, trabalho em andamento** revela o mesmo tipo de achado para ninfas de 3º estadio, quando submetidas aos choques hipotérmico por 12h e para ninfas de 5º estadio, submetidas aos mesmos choques de temperatura, seja por 1h ou 12h.

Assim, é possível que, dentre os seus muitos efeitos, os choques tanto hipo- quanto hipertérmico afetem o desempenho hormonal que coordena a sequência de eventos no crescimento e ciclos de muda desse inseto (GILLOTT, 1982). O achado de espécimes que, submetidos ao choque de temperatura, apresentaram, mais frequentemente do que nos controles, incapacidade de completar a muda ou de completar

* (RODRIGUES, V.L.C.C. - informação pessoal, 1990).

** (RODRIGUES, V.L.C.C., MELLO, M.L.S. & DANTAS, M.M.)

a melanização da exocutícula*, bem pode representar a ocorrência de fenocópias**, cuja expressão houvesse sido induzida pela ação dos choques de temperatura (YOST & LINDQUIST, 1988).

Relatos semelhantes foram feitos para embriões de *Drosophila* submetidos a choque hipertérmico e interpretados como associados a um ponto de quebra cromossômica que resultaria na produção de um polipeptídeo incompleto (LAUGHON, & SCOTT, 1984), o que geraria a ocorrência de fenocópias. Um polipeptídeo anômalo poderia ser também produzido a partir de mRNA transcrito sem a eliminação de introns, porque o choque impediria o seu corte antes que a transcrição desse RNA pudesse ser repressa (YOST & LINDQUIST, 1988). De fato, não é nossa a idéia de que o choque térmico induz fenocópias, por interferir com o processo de atividade primária do gene, que é a transcrição (MITCHELL, 1966).

Obviamente, há muitas variações possíveis a serem consideradas na formação de fenocópias e, além destas citadas, não se pode descartar a hipótese de mudança conformacional em uma proteína (MILKMAN, 1963, 1966) ou mesmo uma modificação a nível de sua tradução (MITCHELL & LIPPS, 1978).

* (RODRIGUES, V.L.C.C. - informação pessoal, 1989).

** Variação fenotípica que se assemelha a uma mutação mas é causada por influências do ambiente e portanto não transmitida à prole.

Em termos dos fenótipos nucleares alterados, observados nesta investigação, exibiram eles características já descritas para ninfas da mesma espécie, submetidas, porém, a outras condições de "stress", como o jejum, a ação de metais pesados e a radiação gama (MELLO, & VIDAL, 1979; MELLO, 1983, 1989; KUBRUSLY, 1984; ANDRADE & MELLO, 1987; ÁLVARES-GARCIA, 1988). Isto estaria de acordo com a idéia de que diferentes fatores estressantes podem induzir o mesmo tipo de resposta apresentado por células submetidas a choque de temperatura (HIGHTOWER et alii, 1985; SCHLESINGER, 1985).

Considerando-se as respostas aos vários fatores estressantes já testados em *Triatoma infestans*, o fenômeno de micronucleação foi observado nos túbulos de Malpighi unicamente na situação de choque de temperatura. Uma vez que os micronúcleos observados eram em sua maioria do tipo picnótico, há indicação de que estejam relacionados a alterações degenerativas irreversíveis nas células analisadas (COUNTRYMAN & HEDDLE, 1976).

Foi comprovado um decréscimo no número total de núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi, principalmente um mês após o choque de temperatura. Tal observação indica que, excluindo-se o próprio fenômeno de micronucleação, menos frequente, muitas das alterações em fenótipos nucleares, por serem de caráter degenerativo (vacuolizações e picnose) hajam contribuído para a eliminação de núcleos ou células.

De fato, observou-se ainda que com o passar do tempo após o choque, núcleos vacuolizados apareceram com frequência bem menor do que logo após o choque, com exceção da situação experimental de 40°C por 12h, onde foi encontrado um aumento no percentual de núcleos vacuolizados um mês após o choque. Neste caso talvez, a ação deletéria do "stress" tenha se estendido por tempo mais longo, induzindo vacuolizações nucleares adicionais.

Embora não tendo atingido uma representação expressiva nas situações experimentais aqui empregadas, a ocorrência de núcleos picnóticos nos indivíduos analisados um mês depois de submetidos aos choques hipo- e hipertérmico por uma hora, fala também a favor de certa ação degenerativa a longo prazo induzida por estas condições de "stress". Tal fenótipo observado em outras situações estressantes (ANDRADE & MELLO, 1987; KUBRUSLY, 1984; ÁLVARES-GARCIA, 1988), é ocasionado possivelmente por quebras internucleossômicas e subsequente acúmulo destes fragmentos. Com isso, as células perderiam a habilidade de executar suas funções específicas, ocorrendo necrose nuclear e conseqüentemente morte celular (HANSON, 1979; BORISOVA et alii, 1987).

Por outro lado, a fusão de núcleos dando origem a unidades gigantes também contribuiu para o fenômeno de decréscimo no número de núcleos nos túbulos de Malpighi, com o passar do tempo após choque, à semelhança do que já foi relatado em espécimes submetidos ao jejum (MELLO & VIDAL,

1979; MELLO 1983; ANDRADE & MELLO, 1987, AMARAL & MELLO, 1989; MELLO, 1989), tratamento com íons cobre e mercúrio (KUBRUSLY, 1984), exposição à radiação gama (ÁLVARES-GARCIA, 1988), bem como em células de glândulas salivares da mesma espécie, infectadas por partículas virais (MELLO & DIAS, 1981), assim como em outros triatomíneos sujeitos ao jejum (WIGGLESWORTH, 1967; MELLO & RAYMUNDO, 1978, 1980).

A presença de núcleos gigantes apareceu ressaltada em algumas situações experimentais, principalmente naquela em que os insetos foram submetidos a 40°C por 12h e cuja sobrevivência do grupo, parece não ter sido afetada durante o período de 30 dias pós-choque. Este fato estaria de acordo com a afirmação de que tais núcleos possam representar um mecanismo de sobrevivência celular ou do órgão em condições de "stress" (WIGGLESWORTH, 1967; MELLO, & VIDAL, 1979; MELLO, 1987), o que poderia colaborar para a sobrevivência do inseto. Como apoio a essa idéia, aparece o fato de que no grupo de insetos submetidos a 0°C por 12h e que apresenta o percentual mais alto de mortes em relação aos outros grupos das demais situações experimentais, e ocorrência de maior frequência de vacuolizações nucleares, não foi detectada a presença do fenótipo nuclear gigante.

Ao lado da presença de núcleos gigantes atuando possivelmente na proteção contra os danos do choque térmico ao órgão, parece plausível a idéia de que as hsp's atuem também na sobrevivência dos insetos submetidos ao aumento de

temperatura.

Embora não se tenha realizado neste trabalho, isolamento de proteínas para comprovar tal hipótese, evidências em outros materiais sugerem que assim como a hsp 70 (CRAIG and JACOBSEN, 1984; PELHAM, 1984), as hsps de baixo peso molecular protejam os organismos contra um brusco aumento de temperatura (LOOMIS and WHEELER, 1980; BERGER and WODWARD, 1983). A hsp 23, por exemplo, é sintetizada constitutivamente em *Drosophila* a partir do 3º estadio larval (CHENEY and SHEARN, 1983), quando o nível do hormônio ecdisona (necessário para a muda) começa a aumentar (HANDLER, 1982), alcançando um nível máximo no último estadio pupal e diminuindo gradualmente no adulto (ARRIGO, 1987). É interessante lembrar que as hsps são produzidas quando as células contêm uma quantidade significativa de proteínas denaturadas (HIROMA and HOTTA, 1985; ANANTHAN, et alii, 1986). Assim, no desenvolvimento de *Drosophila* provavelmente sejam necessários mecanismos sofisticados para o controle de degradação de proteínas denaturadas. O acúmulo de hsps de baixo peso molecular durante este período do desenvolvimento, seria uma consequência de tal fenômeno. (ARRIGO, 1987).

Extrapolando estes achados para *Triatoma infestans* pode-se especular que ninfas em determinadas fases do desenvolvimento sintetizem constitutivamente quantidade significativa de hsps e estejam assim, por antecipação

protegidas de uma ação deletéria por choque hipertérmico. De fato, trabalho em andamento com ninfas a partir do 3º estadio e adultos machos e fêmeas de *Triatoma infestans*, está demonstrando que as ninfas de 4º e 5º estadio, ao contrário do que acontece com ninfas mais jovens e com adultos, não apresentam queda de sobrevivência após choque hipertérmico a 40°C, mesmo por 12h*. Já o choque hipotérmico por 12h induz nesses insetos, queda de sobrevivência em todas suas fases de desenvolvimento*.

Sabe-se, no entanto que em certos insetos submetidos ao "stress" por temperaturas baixas ocorre o aparecimento de substâncias de baixo peso molecular denominadas crioprotetores. Entre estas, encontra-se o glicerol (CHEN et alii, 1987), produto do metabolismo do glicogênio em consequência da atividade da **glicogênio fosforilase** (ZIEGLER et alii, 1979). Esta enzima, ativada pelo jejum (GOLDSWORTH, 1970; GADE, 1981) e também pelo frio (BAHJOU, et alii, 1988) atua como enzima chave na regulação da síntese de crioprotetores (CHEN & DENLINGER, 1990).

Assim, possivelmente as ninfas de 4º estadio de *Triatoma infestans* submetidas a 0°C por 1h e que apresentaram um índice de sobrevivência semelhante ao controle, tiveram nessa situação além da produção de proteínas específicas comparáveis àquelas associadas com o

* (RODRIGUES, V.L.C.C.; MELLO, M.L.S. & DANTAS, M.M. - 1990)

choque hipertérmico, a síntese de substâncias crioprotetoras.

A hipótese mais aceita para as consequências deletérias do choque hipotérmico, é a indução de transição de fase nos lipídios da membrana e a subsequente perda da permeabilidade desta estrutura celular (QUINN, 1985). Agentes crioprotetores tais como o glicerol, poderia então alterar a natureza dessas transições de fase, estabilizando a interação entre os lipídios da bicamada (QUINN, 1985). Seria também impedida a formação de cristais de gelo os quais sabidamente introduzem esforços mecânicos danosos à célula e à matriz extracelular (MELLO & VIDAL, 1973a).

Não se pode deixar de mencionar que, da mesma forma como observado em ninfas de *Triatoma infestans* submetidas à ação de metais pesados (KUBRUSLY, 1984), foram detectadas variações individuais de resposta ao choque de temperatura em termos de variabilidade em tipos e frequência de fenótipos nucleares alterados. Isto sugere a existência de insetos mais resistentes a uma ação degenerativa que possa ser induzida por agentes estressantes, inclusive o choque por temperatura.

Embora em frequência inferior, foram detectados nos controles alguns dos fenótipos nucleares evidenciados nas condições experimentais.

O aparecimento do fenótipo gigante no controle, pode ter sido causado por algum outro tipo de "stress" a que

o animal tenha sido eventualmente submetido no próprio insetário, como por exemplo, infecção por partículas virais e não ingestão de alimentos por certo período (DOLDER & MELLO, 1978, MELLO et alii, 1980; MELLO et alii, 1990).

Já o achado do fenótipo vacuolizado, talvez se deva a algum fator mais recentemente atuante no insetário, uma vez que observações efetuadas em períodos anteriores ao deste trabalho, não diagnosticaram sua presença neste grupo.

Deve-se mencionar, no entanto, que nos últimos anos as condições de temperatura para criação de *Triatoma infestans* no Insetário da SUCEN em Mogi Guaçu foram alteradas em função de melhoria na atividade de oviposição e eclosão de ovos* e o que se está considerando como temperatura controle pode não ser precisamente o ideal para os propósitos deste trabalho.

Embora os fenótipos nucleares normais, ou seja, aqueles em que é exibido um ou mais de um cromocentros, sejam predominantes também nos espécimes submetidos à situação de choque, alguma variação entre a frequência destes pôde ser comprovada.

Sabe-se que em condições normais de desenvolvimento, até o 3º estadio ninfal, os núcleos dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* exibem quase que exclusivamente um único cromocentro (MELLO, 1969, 1971). A

* (RODRIGUES, V.L.C.C. - informação pessoal, 1979).

partir de então passam a ser observados núcleos com mais de um cromocentro em parte dessas células, originando-se de núcleos com um cromocentro. Nada se conhece, no entanto, quanto à causa motivadora da divisão de um único cromocentro em vários outros (MELLO, 1976). Talvez haja alguma relação com a ativação de alguns genes presentes na heterocromatina como aventado por MELLO, (1976, 1978a), uma vez que, como esta mesma autora propõe, possivelmente algumas regiões da heterocromatina sejam codificadoras, por serem porções de DNA não satélite repetitivo e se tornem ativas por ocasião da fragmentação do cromocentro único em vários, alterando-se assim o seu estado estrutural e possibilitando talvez a expressão de algum gene.

Talvez, então, a observação de que com o avanço do tempo pós-choque no grupo de insetos submetido a 0°C por 12h tenha havido um percentual maior de núcleos com vários cromocentros em relação aos demais fenótipos nucleares, possa refletir uma tentativa de expressão gênica como defesa à situação estressante.

2. Algumas considerações sobre o fenótipo nuclear "descompactado".

A descompactação da heterocromatina encontrada em alta percentagem nos insetos submetidos ao choque de temperatura, principalmente naqueles submetidos ao choque hipertérmico, foi também já verificada no próprio *Triatoma infestans* submetidos a outros tipos de "stress" como o jejum (ANDRADE & MELLO, 1987; MELLO, 1989; AMARAL & MELLO, 1990), tratamento com metais pesados (KUBRUSLY, 1984) e radiação gama (ÁLVARES-GARCIA, 1988).

O fato desse fenótipo nuclear ter sido mais frequente após o choque hipertérmico do que após o choque hipotérmico é sugestivo de que o primeiro tenha maior atuação no afrouxamento da cromatina e em especial, da heterocromatina.

De qualquer modo, pode-se considerar que a esta resposta do material cromatínico ao "stress", provavelmente se relacione uma ativação de genes silentes aí presentes (MELLO, 1983, 1989; EISSENBERG et alii, 1985; ANDRADE & MELLO, 1987; MELLO et alii, 1990).

Assim, embora cromocentros como o de *T. infestans* contenham heterocromatina constitutiva descrita como predominantemente não codificadora (MELLO, 1971; 1976; 1978; 1983; MELLO & RECCO-PIMENTEL, 1987), provavelmente contenham sítios capazes de serem transcritos (MELLO, 1983; 1989;

ANDRADE & MELLO, 1987; AMARAL & MELLO, 1989; MELLO, *et alii*, 1990).

Se aí estariam envolvidos genes HSP (AMARAL, 1988) ativados por choque térmico ou outros agentes estressantes (ATKINSON & WALDEN, 1985; MELLO, 1989) é assunto para investigação futura, pois embora se tenham notícias desses genes em áreas heterocromáticas parece que sua expressão não seja induzível por "stress" (LIS *et alii*, 1981; SOUTHGATE *et alii* 1985).

A associação da descompactação da heterocromatina com atividade transcricional como resposta ao "stress", já foi encontrada em outros sistemas como em cromossomos politênicos de larvas de *Rhynchosciara americana* submetidas a choque de temperatura (SIMÕES *et alii*, 1975) ou infectadas por microsporídeos (DIAS *et alii*, 1969), em células tumorais de mama (SANDRITTER, *et alii*, 1974), e na heterocromatina centromérica de alguns cromossomos dos anfíbios *Hyla albopunctata* e *Aplastodiscus perviridis* sob a ação de alta radiotividade natural (FEITOSA, 1989).

Neste trabalho, a hipótese de que regiões de heterocromatina de *Triatoma infestans* sejam capazes de atividade transcricional como resposta ao choque térmico, foi sugerida não apenas pela observação visual da drástica diminuição de coloração do cromocentro em núcleos corados por Feulgen mas também por sua resposta metacromática após tratamento com clupeína.

Os resultados sugestivos da presença de RNA nas porções descompactadas da heterocromatina após choque hipotermico ou hipertermico, dado a que nestas regiões o DNA sofre uma perda ou redução na capacidade de ligação à protamina, merecem que se façam aqui algumas considerações sobre as moléculas envolvidas nas reações processadas assim como se teça um breve comentário quanto à especificidade do método.

As protaminas são proteínas de baixo peso molecular, extremamente básicas, muito ricas em arginina que substituem as histonas na linhagem germinativa masculina (BLOCH, 1969). A riqueza em arginina pode atingir níveis tão altos a ponto do polipeptídeo poder ser considerado quase uma poliarginina, como acontece em peixes do grupo do salmão. Um tipo de protamina de 4.000 daltons, presente no arenque*, é denominada clupeína.

Em situação de dupla hélice, o DNA devido a sua conformação espacial, permite que moléculas de protamina estabeleçam ligações eletrostáticas com os seus grupos fosfatos o que não ocorre com o RNA de fita simples ou com o próprio DNA em transcrição. (WARRANT, 1978; BALHORN, 1982; VIDAL, 1979) (Fig. 23).

As moléculas do corante azul de toluidina se ligam eletrostaticamente aos grupos fosfatos do DNA ou RNA, desde que disponíveis (LISON, 1955, 1960; MIURA & OHBA, 1967; MELLO & VIDAL 1973b; MELLO et alii, 1978; VIDAL, 1987a).

* Peixe clupeídeo de alto valor comercial (*Clupea harengus*)

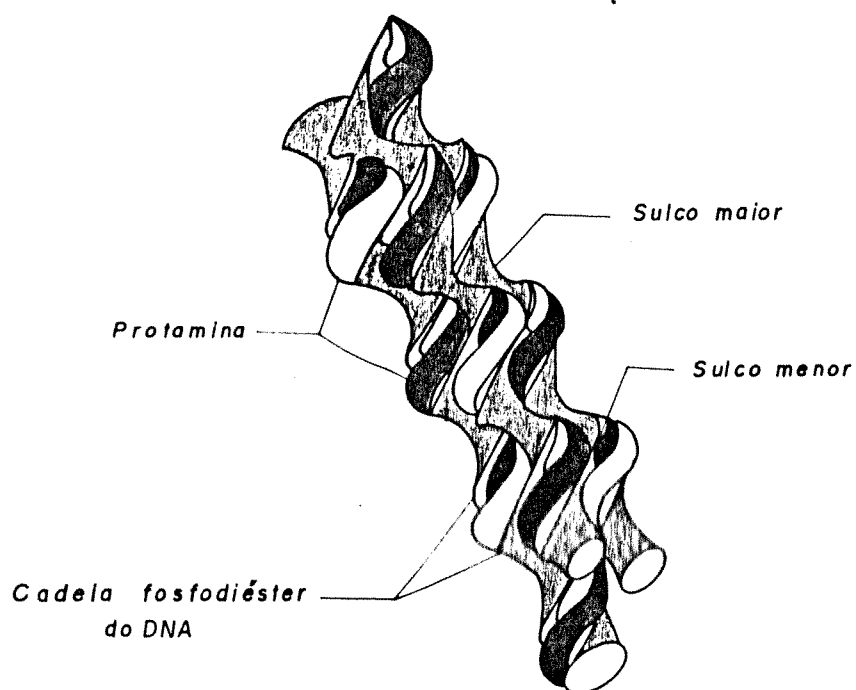


FIGURA 24. Desenho esquemático representando a interação das moléculas de protamina com cadeias de DNA na cromatina. Após completa neutralização das cadeias fosfodiéster, a repulsão eletrostática normal entre os segmentos do DNA é eliminada e as moléculas são mantidas juntas (BALHORN, 1982).

O fenômeno de basofilia observado quando da coloração por soluções de azul de toluidina é devido à ligação eletrostática das moléculas deste corante a moléculas aniônicas de um substrato. A basofilia é definida como metacromática para o caso do azul de toluidina, quando há deslocamento do pico principal da curva de absorção espectral, correspondente ao cromóforo, para um comprimento de onda mais curto (de 630nm para 546nm) e simultaneamente uma diminuição dos valores de absorbância em 630nm (revisões em MELLO, 1976; VIDAL, 1987a).

Este fenômeno, acha-se intimamente ligado ao empilhamento de moléculas do corante e proximidade entre elas (BERGERON & SINGER, 1958; MIURA & OHBA, 1967; TOEPFER, 1970; MELLO, 1976; VIDAL, 1987a) (Fig. 24). Quanto mais próximas entre si as moléculas do corante, formando dímeros, trímeros, polímeros, maior será a interação entre os eletrons ressonantes destas moléculas e conseqüentemente maior será o deslocamento de seu máximo de absorção para comprimentos de ondas mais curtos (BERGERON & SINGER, 1958; MELLO, 1976; VIDAL, 1987a).

Moléculas como a clupeína, que competem com o azul de toluidina pelos grupos fosfatos do DNA, quando adicionadas experimentalmente em preparações de cromossomos politênicos, ligam-se à regiões cromossômicas não envolvidas na produção de RNA, bloqueando nestas porções os grupos fosfatos disponíveis à ligação com moléculas de azul de

FIGURA 24. Esquema apresentado por MELLO, (1990), mostrando como ocorre a nível molecular a evidência ou não do fenômeno de metacromasia.

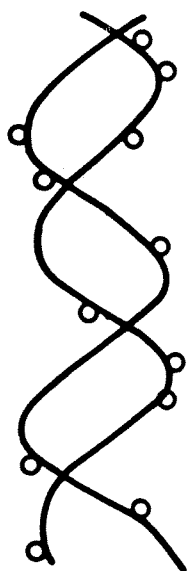
Acima, a molécula do DNA encontra-se com muitos de seus grupos fosfatos não ligados à proteínas e portanto disponíveis à ligação com as moléculas de azul de toluidina. A maior proximidade entre as moléculas do corante e o seu empilhamento mais perfeito provocarão um deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda mais curtos e o resultado será um material corado em violeta.

Abaixo, a molécula do DNA encontra-se com a maioria de seus grupos fosfatos ligados à grupos amina de proteínas e portanto as moléculas do corante que se ligam ao DNA, se encontram muito distantes umas das outras, havendo então deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda mais longos, resultando num material corado em verde.

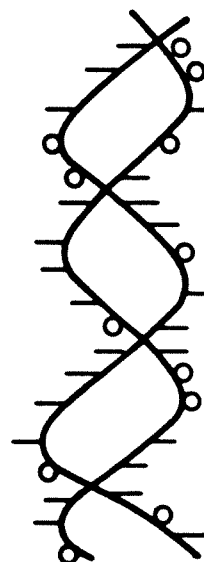
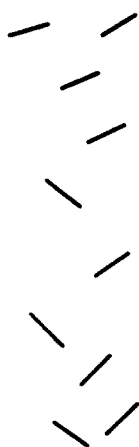
COMPLEXO DNA-PROTEÍNA

AT

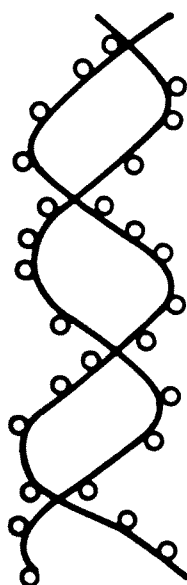
BASOFILIA



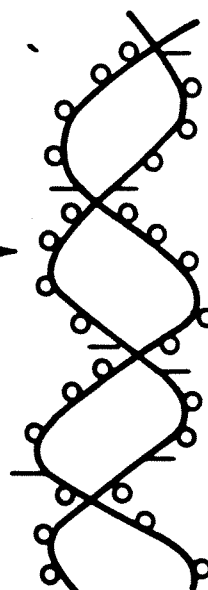
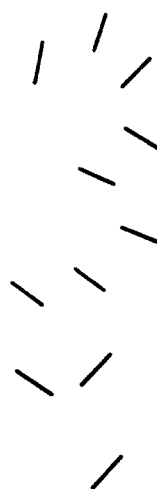
+



METACROMASIA



+

O = GRUPOS NH_3^+

toluidina. Consequentemente a usual metacromasia que aparece nestas regiões após tratamento com este corante, é abolida (VIDAL, 1979).

Além disso, moléculas de protamina ligam-se preferencialmente à heterocromatina mais do que à eucromatina, em células somáticas de *Triatoma infestans* (MELLO, 1985).

Partindo-se, então, do princípio que a nível do cromocentro descompactado de células de *Triatoma infestans*, estivesse havendo transcrição como resposta ao choque térmico, esperava-se que nessa região nuclear, tratada com clupeína, e a seguir com solução de azul de toluidina pH 4,0, surgisse metacromasia. Os resultados foram positivos, sugerindo que o DNA nesta região não se encontra em dupla fita e com isso provavelmente esteja havendo neste local uma atividade transcricional como resposta ao choque de temperatura. A metacromasia detectada nesse caso é mesmo devida à ocorrência de RNA, visto ser abolida com RNase.

Sem dúvida, a hipótese de transcrição a nível do DNA dos cromocentros teria uma comprovação mais direta se fossem empregados recursos radioautográficos ou anticorpos anti-mRNA.

Contudo, o emprego da clupeína neste trabalho, foi escolhido por ser um método citoquímico altamente confiável, embora indireto, relativamente barato, de fácil execução e disponível no laboratório.

CONCLUSÕES

1. O choque térmico interfere no desenvolvimento ninfal diminuindo a frequência de mudas no período de 30 dias pós-choque e, particularmente a 40°C, diminuindo também a velocidade de avanço desse processo de desenvolvimento.
2. Os choques hiper- e hipotérmico promovem alterações fenotípicas nucleares nas células epiteliais dos túbulos de Malpighi de ninfas do 4º estadio de *Triatoma infestans*, embora a maioria dos núcleos destas células tenham mantido o aspecto fenotípico nuclear considerado normal. Estas alterações, que também já foram observadas em outras situações de "stress" para o mesmo sistema, consistem de núcleos gigantes, vacuolizados, descompactados e picnóticos.
3. Os fenótipos vacuolizados e picnóticos, por serem de caráter degenerativo, contribuem para redução no total de núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi, detectada principalmente um mês após o choque de temperatura. A fusão de núcleos dando origem a unidades gigantes, também é um fator preponderante para a ocorrência deste fenômeno.

4. Os núcleos descompactados alcançam uma maior representatividade nos insetos submetidos ao choque hipertérmico sugerindo que este choque, em comparação ao hipotérmico, exerce uma maior atuação no afrouxamento da cromatina e em especial da heterocromatina.
5. Dentre as situações experimentais utilizadas neste trabalho, o choque hipotérmico a 0°C por 12h, apresenta uma ação mais deletéria no índice de sobrevivência dos insetos e induz a ocorrência de maior frequência de vacuolizações nucleares.
6. As variações individuais de resposta ao choque de temperatura em termos de variabilidade em tipos e frequência de fenótipos nucleares alterados, encontradas entre os indivíduos de um mesmo grupo submetido a uma determinada condição experimental, evidenciam a existência de insetos mais resistentes a uma ação degenerativa que possa ser induzida pelo choque térmico.

7. As regiões heterocromáticas dos núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi, normalmente inativas quanto à transcrição, quando descompactadas por ação do choque térmico, apresentam disponibilidade de grupos fosfatos livres do DNA, à ligação com azul de toluidina, porém não ligam com moléculas de clupeína, sugerindo que neste local, esteja havendo uma atividade transcricional como resposta ao choque de temperatura.

RESUMO

Ninfas de 4º estadio do hemíptero *Triatoma infestans* Klug foram submetidas a choques de temperatura de 0°C e 40°C por 1h e 12h e, sacrificadas 10 min-2h após o choque para análise citológica de seus túbulos de Malpighi, objetivando-se investigar se esse tipo de "stress" promoveria aí, alterações fenotípicas nucleares. Buscou-se de igual modo, analisar as ninfas que retornaram às condições controle (30°C), durante 3 dias e 1 mês após o choque.

Além disso, determinaram-se as frequências relativas dos fenótipos nucleares das células epiteliais dos túbulos de Malpighi de cada indivíduo. Concomitantemente, verificou-se a influência do agente estressante na sobrevivência e muda do inseto em estudo, no período de 30 dias.

Evidenciaram-se, assim, não apenas os mesmos fenótipos observados no material controle (núcleos com 1, 2 e vários cromocentros), mas também núcleos vacuolizados, gigantes, picnóticos e com cromocentro parcialmente ou totalmente descompactado.

Constatou-se também uma grande variabilidade na resposta ao "stress" em tipos e frequências de fenótipos nucleares nos indivíduos de um mesmo grupo, ou quando comparados entre si, nos diferentes experimentos

considerados.

Em termos da sobrevivência e índice de muda dos insetos analisados durante o período de 30 dias pós-choque, observaram-se alterações no desenvolvimento ninfal em todas as condições experimentais estudadas, reduzindo-se a frequência de mudas em relação ao controle e no caso do choque a 40°C, a velocidade de avanço desse processo. No entanto, apenas o choque hipotérmico durante 12h induziu uma sensível queda na curva de sobrevivência destes insetos.

Em relação à descompactação cromatínica sugerida em alguns casos com a ação do "stress", detectou-se que áreas heterocromáticas, quando descompactadas, apresentam disponibilidade de grupos fosfatos livres do DNA à ligação com azul de toluidina porém não à ligação com clupeína. Isto sugere ser consequência de uma possível atividade transcricional induzida pelo choque de temperatura.

SUMMARY

Fourth instar nymphs of the hemiptera *Triatoma infestans* Klug were submitted to thermal shocks at 0°C and 40°C for 1 and 12 hours, being sacrificed from 10 minutes to 2 hours after the shock treatment for cytological analyses of their Malpighian tubules. The objective was to investigate if this type of stress would promote alterations in the nuclear phenotype. Nymphs which had been returned to the control conditions (30°C) for 3 days and 1 month after the shock treatment, were analyzed in the same way.

In addition, the relative frequencies of the nuclear phenotypes of epithelial cells of the Malpighian tubules in each individual were determined, and at the same time the influence of the stress agent on the survival and moulting of the insect under study during a 30-day period.

It was found that not only the same phenotypes observed in the control material (nuclei with 1, 2, and several chromocentres) appeared, but also vacuolized, giant, picnotic nuclei, and with the chromocenters partially or completely unravelled.

Between individuals of the same group, considerable variation in the reaction to stress was noted with respect to types and frequencies of the nuclear phenotypes. When compared between themselves, considerable variation appeared in the different experiments considered.

With respect to the survival and moulting index of the insects analyzed during the 30-day post shock period, alterations in nymphal development were observed in all the experimental conditions studied, reducing the frequency of moulting as compared to the control, and in the case of shock at 40°C, the speed of progression of this process. However, only 12 hours of hypothermal shock induced a measurable drop in the survival curve of these insects.

With respect to chromatin unravelling, suggested in some cases due to the application of stress, it was shown that heterochromatic areas, when uncompacted, presented free phosphate groups of the DNA, available for binding to toluidine blue, but not to clupeine. This could be a consequence of possible transcriptional activity induced by the thermal shock.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVARES-GARCIA, R.S. Efeitos da radiação gama sobre os fenótipos nucleares de alguns tipos celulares de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). Campinas, 1988. 104p. TESE (mestrado). UNICAMP, Instituto de Biologia.
- ÁLVARES, R.S. & MELLO, M.L.S., Alterações nos fenótipos nucleares de células somáticas com diferentes graus de ploidia em espécimes de *Triatoma infestans* submetidos à radiação. Ciênc. Cult., S. Paulo, 39 (Supl. 7): 778-779, 1987.
- AMARAL, M.D.; GALEGO, L. & RODRIGUES-POUSADA, C. Stress response of *Tetrahymena pyriformis* to arsenite and heat shock: differences and similarities. Eur. J. Biochem., 171: 463-70, 1988.
- AMARAL, M.J.L.V. Concentração Eletrolítica Crítica da Cromatina em Animais submetidos ao jejum. Campinas, 1988. 75 p. TESE (Mestrado) UNICAMP, Instituto de Biologia,.
- AMARAL, M.J.L.V. & MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of de hetero- and euchromatin in cells of starved animals. Cytobios, 59: 159-65, 1990.

- ANANTHAN, J.; GOLDBERG, A. L. & VOELLMY, R. Abnormal proteins serve as eukariotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 232: 522-4, 1986.
- ANDRADE, C.G.T.J. & MELLO, M.L.S. Phenotypes and number of Malpighian tubule nuclei in *Triatoma infestans* along development and starvation. *Rev. bras. Genet.*, 10 (3): 449-57, 1987.
- ARRIGO, A.P. Cellular localization of hsp 23 during *Drosophila* development and following subsequent heat shock. *Dev. Biol.*, 122: 39-48, 1987.
- ASHBURNER, M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. *Chromosoma*, 31: 356-76, 1970.
- ASHBURNER, M. & BONNER, J.J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*, 17: 241-54, 1979.
- ATKINSON, B. G. Synthesis of heat-shock proteins by cells undergoing myogenesis. *J. Cell Biol.*, 89: 666-73, 1981.

- ATKINSON, B. G.; CUNNINGHAM, T.; DEAN, R. L. & SOMERVILLE, M. Comparison of the effects of heat shock and metal-ion stress on gene expression in cells undergoing myogenesis. *Can. J Biochem. Cell Biol.*, 61: 404-13, 1983.
- ATKINSON, B. G. & WALDEN, D.B. Changes in eukariotic gene expression in response to enviromental stress. Orlando, Academic, 1985.
- BAHJOU, A.; GOURDOUX, L. MOREEAU, R. & DUTRIEU, J. In vitro regulation of glycogen phosphorylase of the larval fat body of *Tenebrio molitor*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89, 233-237, 1988.
- BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.*, 93: 298-305, 1982.
- BASZCZYNSKI, C. L.; WALDEN, D.B. & ATKINSON, B.G. Regulation of gene expression in corn (*Zea mays*) by heat shock. *Can. J. Biochem.*, 60: 569-79, 1982.
- BECKMANN, R. P.; MIZZEN, L. A. & WELCH, W. J. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, 248: 850-4, 1990.

- BERGER, E. M. & WOODWARD, M. P. Small heat shock proteins in *Drosophila* may confer thermal tolerance. *Exp. Cell Res.*, 147: 437-42, 1983.
- BERGERON, J. A. & SINGER, M. Metachromasy: an experimental and theoretical reevaluation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4(4): 433-54, 1958.
- BLOCH, D.P. A catalog of sperm histones. *Genetics*, 61: 93-111, 1969.
- BONATO, M.C.M. & JULIANI, M.H. Choque hipertérmico. *Ciênc. Hoje*. 6: (35): 55-60, 1987.
- BOND, U. & SCHLESINGER, M.J. Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 949-56, 1985.
- BORISOVA, E.A.; CHUKHLOVIN, A.B.; SEILIEV, A.A.; ZHERBIN, E.A.; ZHIVOTOVSKY, B.D. & HANSON, K. P. Degree of chromatin fragmentation and frequency of nuclear pyknosis in Percoll-fractionated thymocytes of irradiated rats. *Int. J. Radiat. Biol.*, 51 (3): 421-8, 1987.
- BURDON, R.H. Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem. J.*, 240: 313-24, 1986.

- CHEN, C-P. & DENLINGER, D.L. Ativation of phosphorylase to cold and heat stress in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. J. Insect Physiol., 36(8): 549-53, 1990.
- CHEN, C-P.; DENLINGER, D.L. & LEE, R.E. Cold-shock injury and rapid cold hardening in the fleshfly *Sarcophaga crassipalpis*. Physiol. Zool., 60 (3): 297-304, 1987.
- CHENEY, C. M. & SHEARN, A. Developmental regulation of *Drosophila* imaginal discs proteins: Synthesis of a heat-shock protein under nonheat-shock conditions. Dev. Biol., 95: 325-30, 1983.
- COLLIER, N. C. & SCHLESINGER, M.I. The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. J. Cell Biol., 103: 1495-507, 1986.
- COLLIER, N.C.; HEUSER, J.; LEVY, M.A. & SCHLESINGER, M.J.. Ultrastructural and biochemical analysis of the stress granule in chicken embryo fibroblasts. J. Cell Biol., 106: 1121-39, 1988.

COUNTRYMAN, P.I. & HEDDLKE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Res.*, 41: 321-32, 1976.

COURGEON, ANNE-MARIE; ROLLET, E.; BECKER, J. MAISONHAUTE, C. & BEST-BELPOMME, M. Hydrogen peroxide (H_2O_2) induces actin and some heat shock protein in *Drosophila* cells. *Eur. J. Biochem.*, 171: 163-70, 1988.

CRAIG, N. Effect of reduced temperatures on protein synthesis in mouse L cell. *Cell*, 4: 329-35, 1975.

CRAIG, E. A. & JACOBSEN, K. Mutation of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. *Cell*, 38: 841-9, 1984.

DIAS, M.; PAVAN, C. & BASILE, R. Effects of a virus and microsporidian infections in chromosomes of various tissues of *Rhynchosciara angelae*. *Rev. bras. Biol.*, 29: 191-206, 1969.

DOLDER, H. & MELLO, M.L.S. Virus-like particles in the Malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. *Cell Mol. Biol.*, 23: 299-310, 1978.

EDINGTON, B.V.; WHELAN, S.A. & HIGHTOWER, L.E. Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional suport for the abnormal protein hypothesis of induction. *J. Cell Physiol.*, 139: 219-28, 1989.

EISSENBERG, J.C., CARTWRIGHT, I.L., THOMAS, G.H. & ELGIN, S.C.R. Selected topics in chromatin struture. *Ann. Rev. Genet.*, 19: 485-536, 1985.

FEITOSA, V.L.C. Alterações na estrutura cromossômica de *Aplastodiscus perviridis* e *Hyla albopunctata* (Amphibia, Anura) provenientes do Morro do Ferro (MG), região com alta radioatividade natural. Campinas, 1989. TESE (Mestrado), 118p. UNICAMP, Instituto de Biologia.

FRANCIS, D. & LIN, L. Heat shock response in a celular slime mold, *Polysphondylium pallidum*. *Dev Biol.*, 79: 238-42, 1980.

FINK, K. & ZEUTHEN, E. Heat shock proteins in *Tetrahymena* studied under growth conditions. *Exp. Cell Res.*, 128: 23-30, 1980.

- GADE, G. Activation of fat body glycogen phosphorylase in *Locusta migratoria* by corpus cardiacum extract and synthetic adipokinetic hormone. J. Insect Physiol., 27: 155-61, 1981.
- GILLOTT, C. Entomology. New York, Plenum, 1982.
- GOLDSWORTHY, G.J. The action of hyperglycaemic factors from corpus cardiacum of *Locusta migratoria* on glucogen phosphorylase. Gen. comp. Endocrinol., 14: 78-85, 1970.
- GUTTMAN, S.D. & GOROVSKI, M.A. Cilia regeneration in starved *Tetrahymena*: an inducible system studying gene expression and organelle biogenesis. Cell, 17: 307-17, 1979.
- HAMPEL, K.E. & LEVAN, A. Breakage in human chromosomes induced by low temperature. Hereditas, 51: 315-43, 1964.
- HANDLER, A.M. Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol., 93: 73-82, 1982.
- HANSON, K.P. Molecular mechanisms of the interphase death of lymphoid cells. Radiobiologia, 19: 814-20, 1979.

- HIGHTOWER, L.E. & WHITE, F. P. Cellular response to stress: Comparison of a family of 71-73 kilodalton proteins rapidly synthesized in rat tissue slices and canavanine-treated cells in culture. *J. Cell Physiol.*, **108**: 261-75, 1981.
- HIGHTOWER, L.E., GUIDON, JR, P.T., WHELAN, S.A. & WHITE, C.N. Stress responses in avian and mammalian cells. In: ATKINSON, B.G. & WALDEN, D.B. *Changes in Eukariotic Gene Expression in Response to Environmental Stress*. Orlando, Academic, 1985, p. 197-210.
- HIROMI, Y. & HOTTA, Y. Actin gene mutations in *Drosophila*: Heat shock activation in the indirect flight muscle. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, **4**: 1681-7, 1985.
- KELLEY, P.M. & SCHLESINGER, M.J. The effect of heat-shock and amino acid analogues on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell.*, **15**: 1277-86, 1978.
- KIMPEL, J. A. & KEY, J. L. Heat shock in plants. *Trends Biochem. Sci.*, **11**: 353-7, 1985.

KUBRUSLY, F.S. Ação de cobre e mercúrio sobre estrutura nuclear e atividade de alguns sistemas enzimáticos em *Triatoma infestans* Klug. Campinas, 1984. TESE (mestrado). 71p. UNICAMP, Instituto de Biologia.

LAUGHON, A. & SCOTT, M.P. Sequence of a *Drosophila* segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins. *Nature*, 310: 25-31, 1984.

LEMEAUX, P.G.; HERENDEEN, S.L.; BLOCH, P. L. & NEIDHARDT, F. C. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell*, 13: 427-34, 1978.

LEWIS, M.; HELMSING, P. J. & ASHBURNER, M. Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72 (9): 3604-8, 1975.

LINDQUIST, S. Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: implications for regulation. *Dev. Biol.*, 77: 463-79, 1980.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 1151-91, 1986.

- LINDQUIST, S. & CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22: 631-77, 1988.
- LINDQUIST, S. & DIDOMENICO, B. Coordinate and noncoordinate gene expression during heat shock: A model for regulation. In: ATKINSON, B.G. & WALDEN, D.B. *Change in eukaryotic expression in response to environment stress*. Orlando, Academic. 1985, p. 71-90.
- LIS, J.T.; PRESTIDGE, L. & HOGNESS, D. S. A novel arrangement of tandemly repeated genes at a major heat shock site in *D. melanogaster*. *Cell*, 14: 901-19, 1978.
- LIS, J.T.; NECKAMEYER, W.; MIRAULT, M.-E.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; LALL, P.; MARTIN, G. & SCHEDL, P. DNA sequences flanking the starts of the hsp 70 and alfa-beta heat shock genes are homologous. *Develop. Biol.*, 83: 291-300, 1981.
- LISON, L. Variation de la basophilie pendant la maturation du spermatozoïde chez le rat et sa signification histochimique. *Acta histochem.*, 2: 47-67, 1955.
- LISON, L. Acides nucléiques, nucleoprotéines, nucléotides. In: LISON, L. *Histochemie et Citochemie Animales*. Paris, Gauthier Villars, 1960, V. 1, cap. 12, p. 355-397.

LOOMIS, N.F. & WHEELER, S. Heat shock response of *Dictyostelium*. Dev. Biol., 79: 399-408, 1980.

MAYFIELD, J.E.; SERUNIAN, L.A.; SILVER, L.M. & ELGIN, S.C.R. A protein released by DNase I digestion of *Drosophila* nuclei is preferentially associated with puff. Cell, 14: 539-44, 1978.

MARQUARDT, H. Die Ausloesung von Chromosomenmutation in der Meiose durch tiefe Temperatur. Z. Indukt. Abstamm. Vererbunghsh., 84: 169-81, 1952.

McALISTER, L.; STRAUSBERG, A.; KULAGA, A. & FINKELSTEIN, D.B. Altered patterns of protein syththesis induced by heat-shock of yeast. Curr. Genet., 1: 63-74, 1979.

McKENZIE, S.L.; HENIKOFF, S. & MESELSON, M. Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 72 (3): 1117-21, 1975.

McKENZIE, S.L. & MESELSON, M. Translation "in vitro" of *Drosophila* heat-shock messages. J. mol Biol., 117: 279-83, 1977.

MELLO, M.L.S. Contribuição ao estudo da poliploidia somática em alguns órgãos de insetos. TESE (doutorado), Ribeirão Preto, 1969, 74p. Universidade de S. Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

MELLO, M.L.S. Somatic poliploidy in insects. *Ciênc. Cult.*, 22 (4): 348- 350, 1970.

MELLO, M.L.S. Nuclear behavior in the malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv. Hemiptera). *Cytologia*, 36: 42-9, 1971.

MELLO, M.L.S. Feulgen-DNA values and ploidy degress in the malpighian tubes of some triatomids. *Rev. bras. Pesq. Biol.*, 8 (2): 101-7, 1975.

MELLO, M.L.S. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero- e eucromatinas. Campinas, 1976, DISSERTAÇÃO (Livre Docência), 206p. UNICAMP, Instituto de Biologia.

MELLO, M.L.S. Dados citoquímicos sobre as histonas de heterocromatinas e eucromatinas de *Triatoma infestans* Klug. *Rev. bras. Pesq. med. biol.*, 10 (5): 303 - 9, 1977.

- MELLO, M.L.S. Computer analysis of stained chromatin on Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). *Mikroskopie*, 34: 285-99, 1978a.
- MELLO, M.L.S. Mechanisms of polyploidization in the malpighian tubes of blood-sucking Reduviid. hemipterans. *Rev. bras. Gen.*, 1 (2): 97-102, 1978b.
- MELLO, M.L.S. Heterocromatina. *Ciênc. Cult.*, 30 (3): 290-303, 1978c.
- MELLO, M.L.S. Toluidine Blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. *Histochemistry*, 69: 181-7, 1980.
- MELLO, M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *Histochem. J.*, 15: 739-51, 1983.
- MELLO, M.L.S. Different affinity for clupein in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. *Rev. brasil. Genet.*, 8 (4): 756-8, 1985.
- MELLO, M.L.S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. bras. Gen.*, 12 (3): 485-98, 1989.

- MELLO, M.L.S. Anisotropy of toluidine blue-stained chromatin in transfected cells. In: Congresso da Associação Panamericana das Sociedades de Bioquímica, 6, São Paulo, 1990. Abstracts and program. p. 189.
- MELLO, M.L.S.; DOLDER, H. & DIAS, C.A. Nuclear ultrastructure of malpighian tubule cell in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) under conditions of full nourishment and starvation. *Rev. Brasil. Genet.* 13 (1): 5-17, 1990.
- MELLO, M.L.S. & RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in starving blood-sucking hemipterans. *Revta. microsc. elect.*, 5: 298-9, 1978.
- MELLO, M.L.S. & RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in malpighian tubes of a blood-sucking hemipteran. *Cytologia*, 45: 203-9, 1980.
- MELLO, M.L.S.; RAYMUNDO, H.H. & PRETTI, M.C.M. Action of hycanthone methanesulfonate on chromatin basophilia and anisotropy in onion meristems. *Cytologia*, 43: 397-404, 1978.
- MELLO, M.L.S. & RODRIGUES, V.L.C.C. & DOLDER, H. J. Submicr. *Cytol.*, 12: 85-93, 1980.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Anisotropic properties of Toluidine Blue-stained collagen. *Ann. Histochem.*, 18: 103-22, 1973a.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Linear dichroism and anomalous dispersion of birefringence on bee sperm heads. *Acta histochem.*, 45: 109-14, 1973b.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. *Ciênc. Cult.*, 30 (6): 665-76, 1978.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Fusão nuclear e padrões cromatínicos em tubos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug. In: *Encontros de Geneticistas Paulistas*, 2. São José do Rio Preto, 1979. Resumos. p. 26-27.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo. Edgard Blucher, 1980.

MILKMAN, R. On the mechanism of some temperature effects on *Drosophila*. *J. Gen. Physiol.*, 46: 1151-69, 1963.

MILKMAN, R. Analyses of some temperature effects on *Drosophila* pupae. *Biol. Bull.*, 131: 331-45, 1966.

MIRANDA, R.P. & MELLO, M.L.S. Interference images of heat-shocked HeLa cells. *Cell Biol. int. Rep.*, 14 (Suppl.): 180, 1990.

MIRAULT, M.E.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M.; MORAN, L.; ARRIGO, A. P. & TISSIERES, A. The effect of heat shock on gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 42: 819-27, 1978.

MITCHELL, H. K. Phenol oxidases and *Drosophila* development. *J. Insect. Physiol.*, 12: 755-65, 1966.

MITCHELL, H. K. & LIPPS, L.S. Heat shock and Phenocopy induction in *Drosophila*. *Cell*, 15: 907-18, 1978.

MIURA, A. & OHBA, Structure of nucleohisstone. III. Interaction with toluidine blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 145: 436-445, 1967.

MUNRO, S. & PELHAM, H. "What turns on heat shock genes?" *Nature*, 317: 477-9, 1985.

NAGATA, K.; SAGA, S. & YAMADA, K.M. A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblast is a novel heat shock protein. *J. Cell Biol.*, 103: 223-9, 1986.

- NEIDHARDT, F.C.; VanBOGELEL, R. A. & WAUGHN, V. The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, 18: 295-329, 1984.
- PELHAM, H.R.B. HSP 70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*, 3: 3095-100, 1984.
- QUINN, P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, 22: 128-46, 1985.
- RANDI, M. A. F. Efeito do choque térmico sobre mioblastos de galinha "in vitro". Campinas, 1990. TESE (mestrado) 56p. UNICAMP, Instituto de Biologia.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18: 571-73, 1962.
- SANDRITTER, W.; KIEFER, C.; SALM, R.; MOORE, C.W.; GRIM, H. & KIEFER, R. DNA in heterochromatin: cytophotometric pattern recognition image analyses among cell nuclei in duct epithelium in carcinoma of the human breast. *Beitr. Path.* 151: 87-96, 1974.

SAX, K. Effect of variations in temperature on nuclear on nuclear and cell division in *Tradescantia*. *Am. J. Bot.*, 24: 218-25, 1937.

SCHLESINGER, M.J. Heat shock proteins: the search for functions. *J. Cell Biol.*, 103: 321-5, 1986.

SCHLESINGER, M.J. Stress response in avian cells. In: ATKINSON, B.G. & WALDEN, D.B. *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Enviromental Stress*. Orlando, Academic, 1985. p. 183-95.

SIMÕES, L.C.C.; AMABIS, J.M. & CESTARI, A.M. Puffs in the heterochromatin in chromosomes of *Rhynchosciara*. *Ciênc. Cult.*, S. Paulo, 27: 159-61, 1975.

SOMERS, D. J.; CUMMINS, W.R. & FILION, W.G. Characterization of the heat-shock response in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Biochem. Cell Biol.*, 67: 113-20, 1989.

SONDERMEIJER, P.J.A. & LUBSEN, N.H. Heat-shock peptides in *Drosophila hydei* and their sythesis "in vitro". *Eur. J. Biochem.* 88: 331-9, 1978.

- SOUTHGATE, R. MIRAULT, M.-E.; AYME, A. & TISSIERES, A.
Organization, sequences and induction of heat shock
genes. In: ATKINSON, B.G. & WALDEN, D.B. Changes in
Eukaryotic Gene Expression in Response to Enviromental
Stress. Orlando, Academic, 1985. p. 3-30.
- TANGUAY, R. M. Genetic regulation during heat shock and
function of heat-shock proteins: a review. Can. J.
Biochem. Cell Biol., 61: 387-94, 1983.
- TARELHO, Z.V.S. Effects of low and high temperatures on the
spermatogenesis of *Apis mellifera* Linné, 1754. I. Effects
of temperature on metaphase, survival and development.
Rev. brasil. Genet., 4 (2): 193-212, 1981a.
- TARELHO, Z.V.S. Effects of low and high temperatures on the
spermatogenesis of *Apis mellifera* Linné, 1754. II.
Effects of temperature on anaphase, telophase and
spermiogenenesis. Rev. brasil. Genet., 4 (2): 383-97,
1981b.
- THOMAS, G. P.; WELCH, W. J.; MATHEWS, & FERAMISCO, J. R.
Molecular and cellular effects of heat-shock and related
treatment of mamalian tissue-culture cells. Cold Springer
Harbor Symp. Quant. Biol., 46 (2): 985-96, 1981.

- TISSIERES, A.; MITCHELL, H.K. & TRACY, U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 84: 389-98, 1974.
- TOEPFER, K. Die Thiazinfarbstoffe. *Progr. Histochem. Cytochem.*, 1: 277-354, 1970.
- van BERGEN EN HENEGOUWEN, P.M.P. & LINNEMENS, W.A.N. Heat shock gene expression and cytoskeletal alterations in the mouse neuroblastoma cells. *Exp. Cell Res.*, 171: 367-75, 1987.
- VIDAL, B.C. The effect of clupein on anisotropy and basophilia of polytene chromosomes. *Histochemistry*, 60: 309-16, 1979.
- VIDAL, B.C. Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. *Biologia Celular*. S. Paulo, Atheneu, 1987a, p. 5-40.
- VIDAL, B.C. Matriz Extracelular. In: VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. *Biologia Celular*. S. Paulo, Atheneu, 1987b, p. 273-303.

- WARRANT, R.W. & KIM, S.H., Alpha-helix-double helix interaction shown in the structure of a protamine transfer RNA complex and a nucleoprotamine model. *Nature*, 271: 130-5, 1978.
- WELCH, W. J. & SUHAN, J.P. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton and nucleoli and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J. Cell Biol.*, 101: 1198-211, 1985.
- WIGGLESWORTH, V.B. Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of *Rhodnius* (Hemiptera). *J. Cell Sci.*, 2: 603-16, 1967.
- YACOOB, R.K. & FILION, W.G. Temperature-stress response in maize: a comparison of several cultivars. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28: 1125-31, 1986.
- YOST, H. J. & LINDQUIST, S. Translation of unspliced transcripts after heat shock. *Science*, 242: 1544-8, 1988.

ZIEGLER, R., ASHIDA, M.; FALLON, A.M.; WIMER, L.T. WYATT, S.S. & WYATT, G.R. Regulation of glycogen phosphorylase in fat body of *Cecropia* silkmoth pupae. J. comp. Physiol., 131, 321-32, 1979.