

defendida pela
Jesus Andrade
com grau A.

Sra. Célia Guadalupe Tardeli de
e aprovada pela Comissão Julgada
de
29/05/84

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FENÓTIPOS NUCLEARES, COM ÊNFASE NA HETEROCROMATINA E FREQUÊN-
CIAS NUCLEARES EM ALGUMAS ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS.

4.10-5, 7/8

CELIA GUADALUPE TARDELI DE JESUS ANDRADE

Tese apresentada ao
Departamento de Bio-
logia Celular do Ins-
tituto de Biologia pa-
ra a obtenção do Tí-
tulo de Mestre.

CAMPINAS

1984

ORIENTADORA:

↑
PROFA. DRA. MARIA LUIZA S. MELLO

À MINHA FILHA

RAFAELA

AGRADECIMENTOS

Sou grata:

- À Profa. Dra. Maria Luiza S. Mello, do Departamento de Biologia Celular da Unicamp, orientadora deste estudo, pelas críticas, sugestões e por todo apoio prestado na conclusão deste trabalho.
- Às Profas. Dras. Eleonora M.P.L.C. Marchese, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, e Hebe M. de Souza do Departamento de Genética da Unicamp, pelas críticas e sugestões apresentadas na análise prévia deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Luiz Carlos G. Simões, do Departamento de Biologia da USP, pelas informações bibliográficas fornecidas e também pelas críticas e sugestões apresentadas na análise prévia deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro, do Departamento de Estatística da Unicamp, pelo assessoramento na parte estatística da pesquisa, e pelas críticas e sugestões apresentadas na análise prévia deste trabalho.

- À SUCEM de Mogi-Guaçu, na pessoa do Senhor Antenor N. Ferreira Filho pelo fornecimento dos insetos utilizados nesta pesquisa.
- À Senhora Ana Gagliardi, Bibliotecária do Instituto de Biologia da Unicamp, pela correção das referências bibliográficas.
- À Maria Tereza, do Centro de Microscopia Eletrônica da Unicamp e Marília Tardeli de Jesus, pela ajuda prestada no preparo das fotografias.
- À CAPES e à Universidade Estadual de Londrina, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.
- Aos Professores do Curso de Mestrado em Biologia Celular, que muito contribuíram para o meu engrandecimento científico.
- Aos Professores do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, que possibilitaram o meu afastamento e também pelo estímulo e apoio..
- Aos Professores do Departamento de Biologia Celular da Unicamp, por terem me acolhido e estimulado.
- Aos colegas e amigos do Curso de Pós-Graduação por todo o incentivo e carinho que me dedicaram.
- Aos meus pais que, com dedicação e amor, tudo fizeram para que eu alcançasse mais esta etapa.
- Ao Milton, marido e companheiro de todos os momentos, assim como à minha filha Rafaela, pela compreensão, apoio, carinho e sacrifícios durante todas as etapas da elaboração deste estudo.
- Agradeço ainda, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

INDICE

INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL.....	6
MÉTODOS.....	7
1.- Determinação dos fenótipos nucleares.....	7
1.1.- Banda C.....	8
1.2.- Reação de Feulgen.....	8
2.- Contagem do número de núcleos dos túbulos de Malpighi..	8
3.- Determinação de áreas e volumes nucleares.....	9
3.1.- Método I.....	9
3.2.- Método II.....	9
3.3.- Método III.....	9
RESULTADOS.....	11
Fenótipos nucleares.....	11
Frequências nucleares.....	20
Áreas e volumes nucleares.....	29
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÕES.....	47
RESUMO.....	49

ABSTRACT.....51

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....53

INTRODUÇÃO

A análise citofotométrica de núcleos dos túbulos de Malpighi do hemíptero *Triatoma infestans*, submetidos à reação de Feulgen, tem demonstrado que no órgão em questão, a semelhança do que acontece em muitos outros grupos de insetos, instala-se um processo de poliploidização ao longo do desenvolvimento (Mello, 1971, 1975, 1978a, b, 1983; Mello e Lima, 1978). Altos níveis de poliploidia são atingidos em espécimens de 5º estadio ninfal, sendo que núcleos com conteúdo de DNA 32C e 64C (que correspondem a graus de ploidia 32n e 64n (Mello, 1976)) são observados em túbulos de Malpighi de um mesmo indivíduo (Mello, 1971, 1975, 1978a). Tais padrões se mantêm em insetos adultos jovens (Mello e Raymundo, 1977).

Considerando-se que nesses insetos existe a possibilidade de ocorrência de fusão de núcleos somáticos em condições de "stress" fisiológico (Mello e Raymundo, 1980 ; Mello, 1983), uma questão a ser ainda respondida é se a acentuada poliploidia detectada ao longo do desenvolvimento nor -

mal resultaria de endomitoses, de fusão nuclear, ou de ambas. A participação de um desses fenômenos ou de ambos no aparecimento de poliploidia em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, poderia ser determinada estabelecendo-se o número de núcleos nesses órgãos, em fases distintas do desenvolvimento e mesmo em condições de "stress" fisiológico.

Nesta espécie ainda se desconhece a frequência nuclear em túbulos de Malpighi em condições normais de alimentação e mesmo após os já mencionados fenômenos de fusão de núcleos que se instalam com um jejum prolongado (Mello e Raymundo, 1980; Mello, 1983).

Por outro lado, tem sido já observado que certas espécies (ou gêneros) da sub-família Triatominae diferem entre si no tamanho dos insetos e de seus órgãos (Carrera, 1967; Sherlock, 1979). Também neste contexto seria de interesse determinar a frequência nuclear (e algumas vezes o próprio tamanho dos núcleos) em túbulos de Malpighi de diferentes espécies e/ ou gêneros dessa sub-família, numa tentativa de se correlacionar tais dados com o tamanho médio dos insetos (Carrera, 1967), o número de cromossomos (Ueshima , 1966; Schreiber et al, 1967, 1972) e /ou a posição relativa que tais grupos ocupam na árvore filogenética proposta para os mesmos (Usinger, 1944) (Fig. 1).

Ao lado de uma variação na frequência nuclear, quando se comparam túbulos de Malpighi de diferentes espécies de triatomíneos, é de se esperar também que variações nos fenótipos nucleares em termos de ocorrência, número e delimitação de áreas heterocromáticas possam ser também encontradas. Essas áreas correspondem à heterocromatina constitutiva definida em termos de morfologia, fisiologia, composição e propriedades citoquímicas (Mello, 1983). Dados já

existentes para *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* mostram diferenças referentes à porcentagem de área nuclear ocupada por heterocromatina, bem como no seu padrão de distribuição (Mello, 1971, 1975, 1978a, 1983; Mello e Lima, 1978; Mello e Raymundo, 1980). Estas espécies, em termos cariológicos, diferem em número de cromossomos e conteúdo de DNA (Ueshima, 1966; Schreiber et al, 1967, 1972). Em *Triatoma infestans*, as células dos túbulos de Malpighi são binucleadas, e seus núcleos exibem grandes corpos heterocromáticos típicos (Mello, 1971). Do 1º ao 3º estádios do desenvolvimento ninfal, um único cromocentro (confluência de regiões heterocromáticas num só corpo) é encontrado nesses núcleos. A partir do 4º estádio, tem sido descrito que os núcleos da região distal dos túbulos de Malpighi desse inseto apresentam vários cromocentros, enquanto os da região proximal continuam a exibir apenas um corpo heterocromático (Mello, 1971, 1978a). Em *Panstrongylus megistus*, por outro lado, são detectados nos túbulos de Malpighi núcleos com um único e pequeno cromocentro (Mello e Raymundo, 1980) ou então ausência do mesmo (Mello, 1979). Em *Rhodnius prolixus* não é detectável área heterocromática em núcleos somáticos submetidos à reação de Feulgen (Mello e Lima, 1978). É de se esperar, portanto, que em outras espécies desses insetos possam ser mesmo encontradas outras variações em fenótipos nucleares para células que, no entanto, executam funções homólogas.

No presente trabalho tem-se, portanto, como um dos objetivos principais determinar a frequência nuclear em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* ao longo do desenvolvimento e sob condições de jejum prolongado, bem como em túbulos de tristomíneos considerados menos evoluídos que *Triatoma infestans* (segundo árvore filogenética de Usin

ger (1944)) (Fig. 1).

Além disso, para que a frequência nuclear venha a ser inclusive correlacionada com fenótipos nucleares possivelmente diferentes, como etapa preliminar do trabalho será efetuada uma análise visual de imagem nuclear para as várias espécies e condições experimentais mencionadas acima.

Esses dados certamente contribuirão para o esclarecimento de mecanismos de poliploidização, para o conhecimento de efeitos fisiológicos de "stress" ao nível nuclear, para o conhecimento dos padrões de distribuição de heterocromatina em núcleos de um mesmo tipo de órgão ao longo de uma escala evolutiva, para o conhecimento de possíveis funções da heterocromatina, e para o conhecimento da Biologia Celular dos triatomíneos.

MATERIAL

No presente trabalho foram utilizadas ninfas de *Triatoma ingestans* Klug de 3º e 5º estádios, alimentadas rotineiramente com sangue de ave (galo), e ninfas de 5º estágio após jejum de 3 meses seguido de realimentação.

Foram utilizadas também ninfas de 5º estágio dos seguintes outros triatomíneos:

Triatoma pseudomaculata Correa et Spínola,
Triatoma brasiliensis Neiva,
Panstrongylus lignarius Walker,
Dipetalogaster maximus Uhler e
Rhodnius prolixus Stahl.

Foram usados 3 a 4 indivíduos de cada espécie para cada condição experimental, criados em laboratório e fornecidos pela Sucem.

MÉTODOS

De todas as ninfas dos vários estádios e gêneros dos triatomíneos citados, foram dissecados túbulos de Malpighi, com o auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss. Os órgãos constituíram então preparados a serem utilizados nas análises descritas a seguir.

1.- DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS NUCLEARES

Túbulos de Malpighi fixados em etanol-acético na proporção de 3:1, por cerca de 3 minutos, foram esmagados suavemente entre lâmina e lamínula. A lamínula foi removida por congelamento do material em Nitrogênio líquido. Os preparados foram então banhados em álcool etílico a 70% por 2 minutos e então expostos ao ar para secagem.

Os preparados assim obtidos foram submetidos à técnica de Banda C, segundo a metodologia de Sumner (1972) e à reação de Feulgen, para a análise visual posterior das imagens nucleares e detecção de áreas consideradas heterocromatina constitutiva, conforme proposição deste método.

1.1.- BANDA C

Os preparados foram denaturados com uma solução saturada de hidróxido de bário, 5g/100ml a 50°C por 90 segundos. A seguir, foram lavados em água destilada e submetidos a tratamento com 2SSC (0,3M NaCl + 0,03M citrato trissódico pH 7,0) por 4 horas e 30 minutos, a temperatura de 65°C. Foram novamente lavados, secados ao ar e corados com uma solução de Giemsa a pH 6,8 - 7,0, durante 10 minutos. Foram então, secados ao ar, diafanizados em xilol por 15 minutos e montados em bálsamo do Canadá.

1.2.- REAÇÃO DE FEULGEN

Os preparados foram hidrolisados em HCl 4N a temperatura ambiente de 25°C durante 1 hora e 10 minutos. A seguir, foram lavados em água destilada várias vezes, corados com o reativo de Schiff durante 40 minutos e submetidos a 3 banhos de 5 minutos cada em água sulfurosa. Foram lavados em água destilada por 2 minutos, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e montados em bálsamo do Canadá.

2.- CONTAGEM DO NÚMERO DE NÚCLEOS DOS TÚBULOS DE MALPIGHI

Os túbulos de Malpighi intactos, de cada indivíduo, foram distribuídos em lâminas, corados com orceína lacto-acética por 20 minutos, após o que tiveram sua coloração interrompida com ácido acético a 45%. O material foi coberto com lamínula, sendo os bordos da mesma vedados com esmalte. Tomou-se cuidado para não se esmagarem os órgãos.

As lâminas foram analisadas ao microscópio de luz Zeiss, com objetiva de 40x e ocular de 8x (aumento final = 320x).

3.- DETERMINAÇÃO DE ÁREAS E VOLUMES NUCLEARES

Para *Triatoma infestans*, *Dipetalogaster maximus* e *Rhodnius prolixus*, 50 núcleos tiveram seu contorno projetado com câmara clara (aumento de 7500x) sobre papel milimetrado. As áreas nucleares, para as imagens projetadas, foram então determinadas, segundo três metodologias:

3.1.- MÉTODO I - Contagem do número de quadradinhos do papel milimetrado.

3.2.- MÉTODO II - Medidas de comprimento dos 2 eixos nucleares A e B e cálculo subsequente pela fórmula:

$$S = \pi \left(\frac{A+B}{4} \right)^2, \text{ para a qual}$$

A = maior eixo da imagem nuclear projetada;

B = menor eixo (Mello e Vidal, 1980).

3.3.- MÉTODO III - Planimetria

Esta metodologia foi posteriormente excluída, pois revelou-se, frente a análises estatísticas, não adequada ao presente estudo, uma vez que o percentual de erro introduzido pelo fato das imagens nucleares de uma das espécies serem pequenas é elevado, o que se esperava de acordo com dados de Schiemer (apud Beneke, 1966).

Para determinação dos volumes nucleares, foi utilizada a fórmula:

$$V = \left(\frac{\pi}{6} \right) A.B.C, \text{ onde } C = B \text{ (Mello e Vidal, 1980).}$$

Esta metodologia foi previamente testada para o material deste trabalho e revelada como de grande confiabilidade.

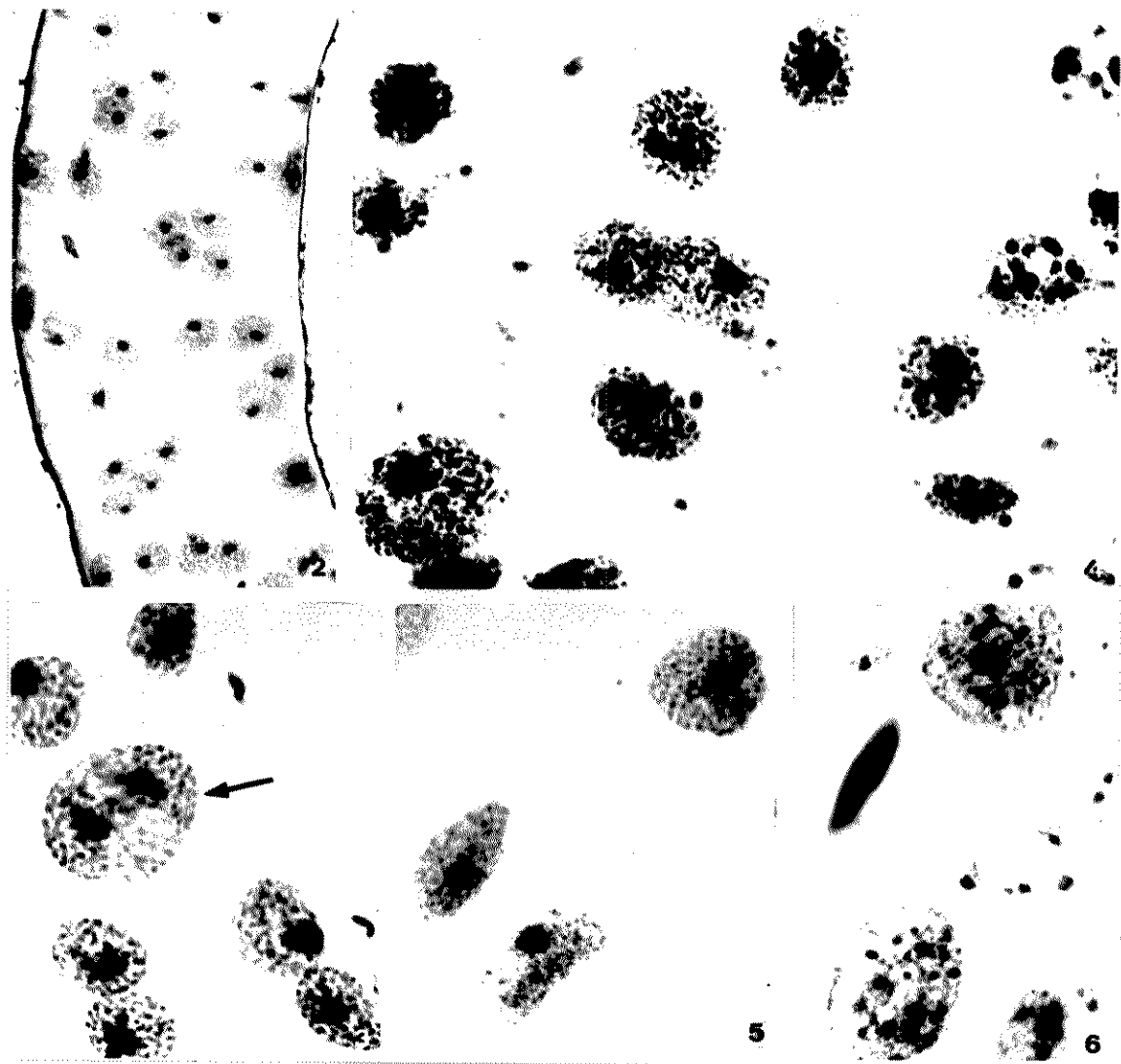
Os dados de áreas e volumes nucleares foram processados pelo sistema estatístico Minitab II implantado no computador PDP 10 da Unicamp.

RESULTADOS

FENÓTIPOS NUCLEARES

Os fenótipos nucleares exibidos pelas células dos túbulos de Malpighi de ninfas de 3º e 5º estádios de *Triatoma infestans* são apresentados nas Figuras 2 a 6 . Nos órgãos de insetos de 5º estadio, submetidos aos métodos de Banda C e reação de Feulgen, são encontrados núcleos exibindo um, dois e vários cromocentros (Figs. 4 a 6), enquanto em insetos de 3º estadio são observados núcleos com apenas um e, mais raramente, com dois cromocentros (Figs. 2 e 3).

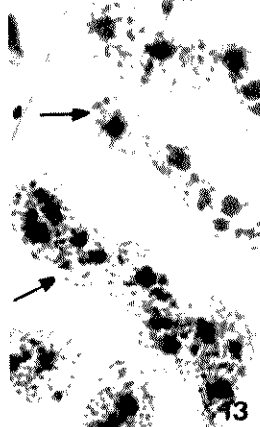
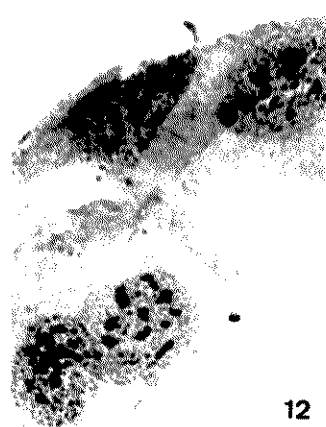
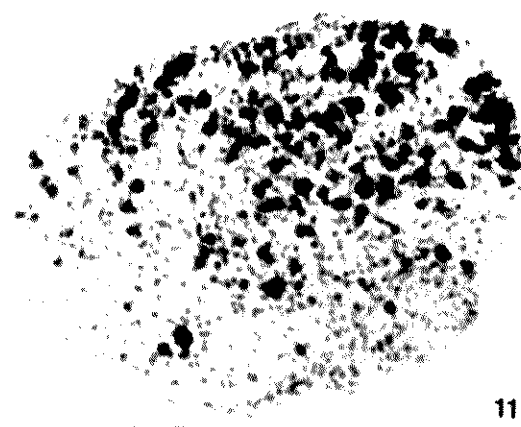
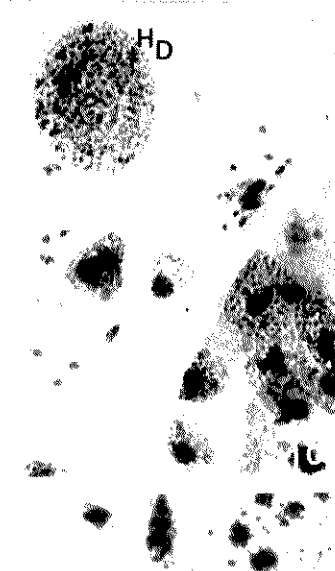
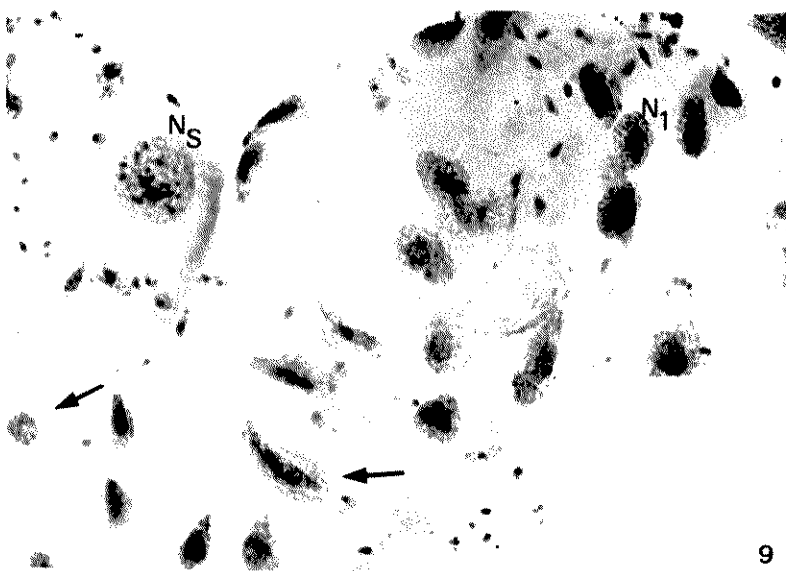
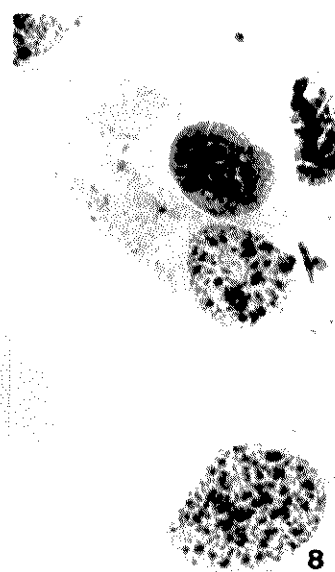
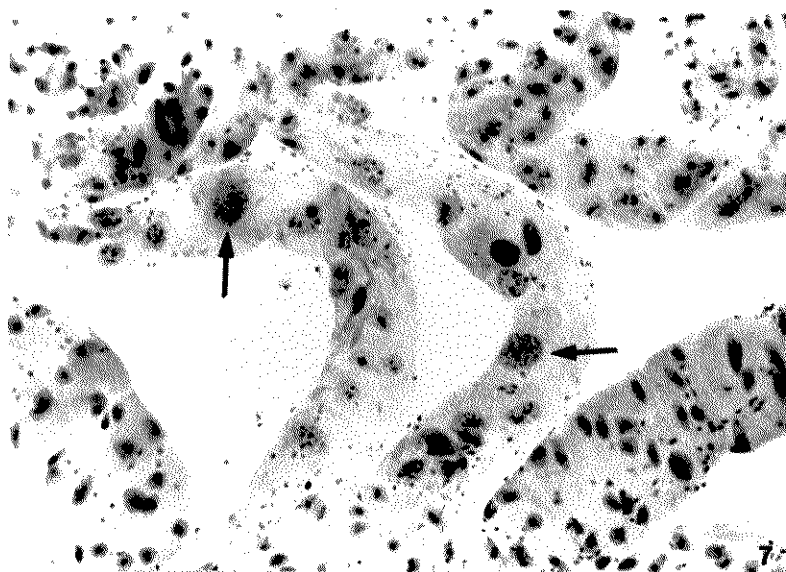
Ninfas de 5º estadio desse inseto, após um período de jejum prolongado, apresentam, além dos fenótipos já citados, (Figs. 7 e 12), núcleos com cromocentro parcialmente descompactado (Figs. 10 e 11) e alguns núcleos muito grandes (Figs. 7 e 11), certamente resultantes da fusão de núcleos de tamanhos normais (Fig. 13) (Mello, 1983). Ninfas realimentadas após esse período de jejum mostram núcleos com um, dois ou vários cromocentros, além de núcleos sem cro -



FIGs. - 2 a 3 - Fenótipos nucleares de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* (ninfas de 3º estadio). Fig. 2 - Coloração com orceína lacto-acética. Fig. 3 - Núcleos submetidos à reação de Feulgen. Um núcleo com dois cromocentros é indicado (seta).

FIGs. - 4 a 6 - Túbulos de Malpighi de ninfas bem alimentadas de 5º estadio de *Triatoma infestans*. Fig. 4 - Método de Banda C. Figs. 5 e 6 - Reação de Feulgen. Núcleos com um (fig.5) e vários cromocentros (Fig. 6).

Fig. 2 x 300; Fig. 3 x 550; Figs. 4 e 6 x 600; Fig. 5 x 500.

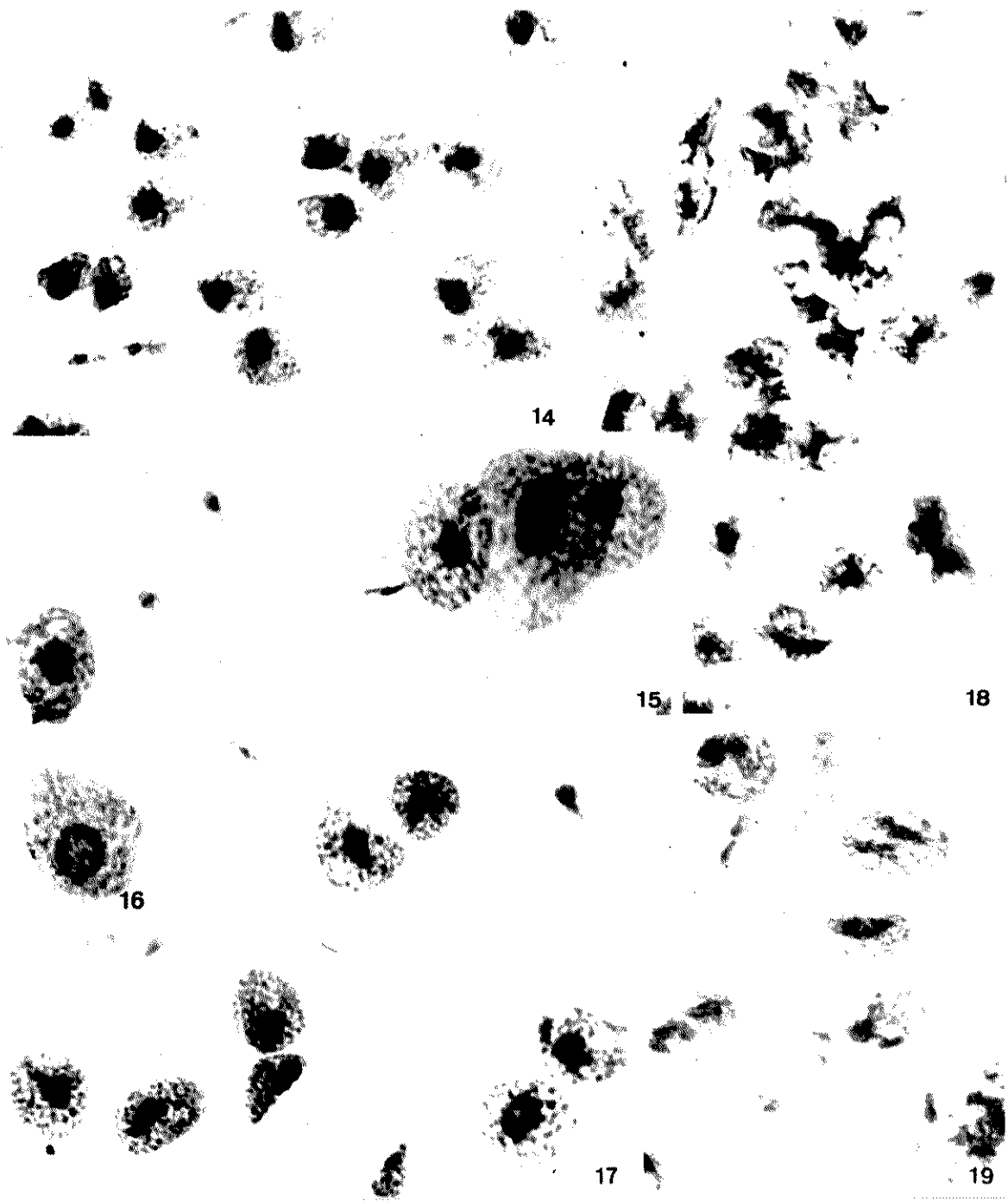


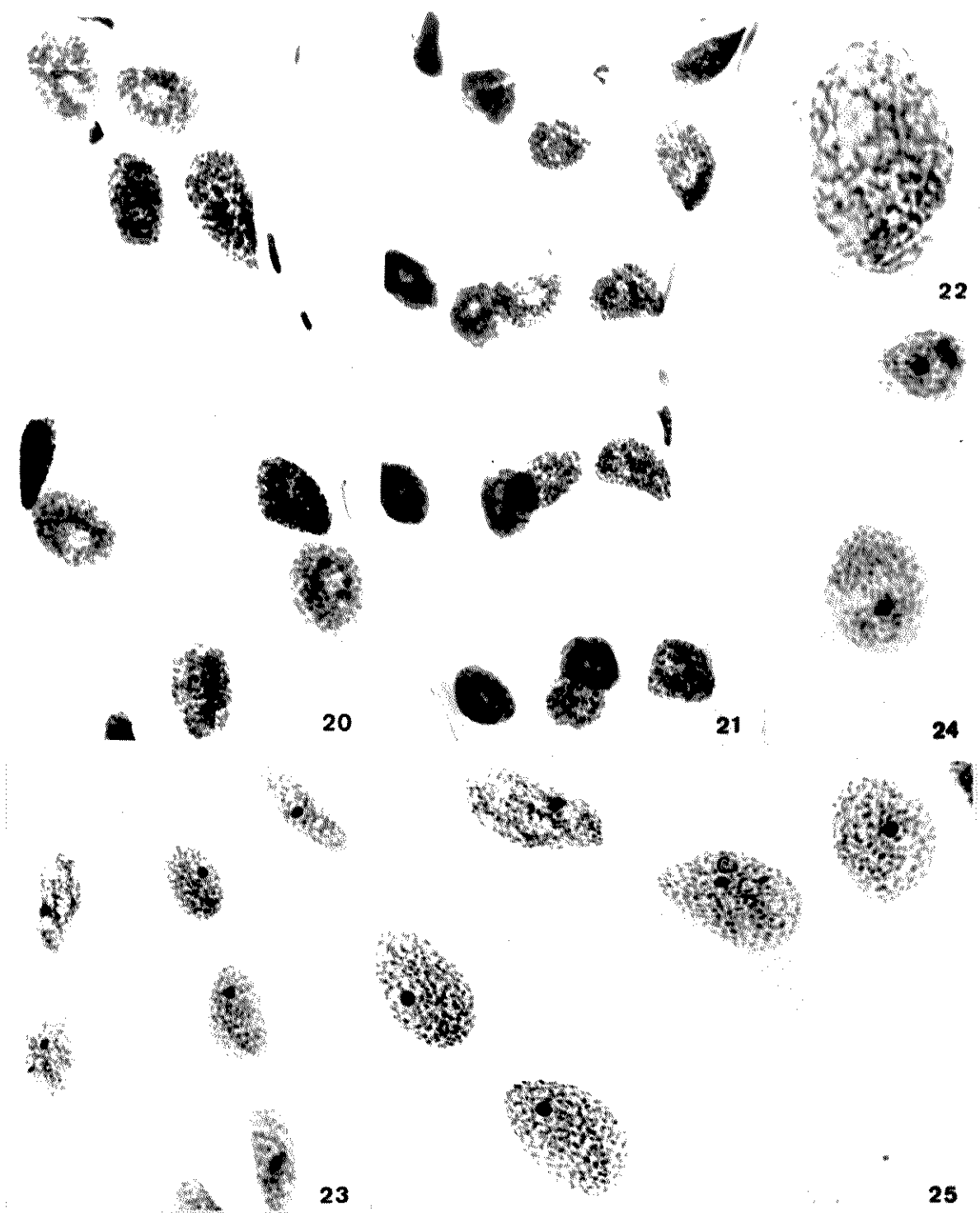
nocentro e núcleos muito grandes (em alguns insetos). Em alguns distingue-se, além da eucromatina normalmente granular, também eucromatina com aspecto filamentososo, convergindo para a região do cromocentro. Em ninfas realimentadas foram encontrados, também, núcleos com cromocentros aparentemente entumecidos (Fig. 14), núcleos cujos cromocentros encontram-se em descompactação (Figs. 15 a 17), além de núcleos com aspecto de degeneração (Figs. 18 e 19). Os núcleos em degeneração apresentam-se como estruturas estreladas, vacuolizadas, às vezes sem forma definida e com cromatina irregularmente distribuída ou ainda, como estruturas compactas e picnóticas.

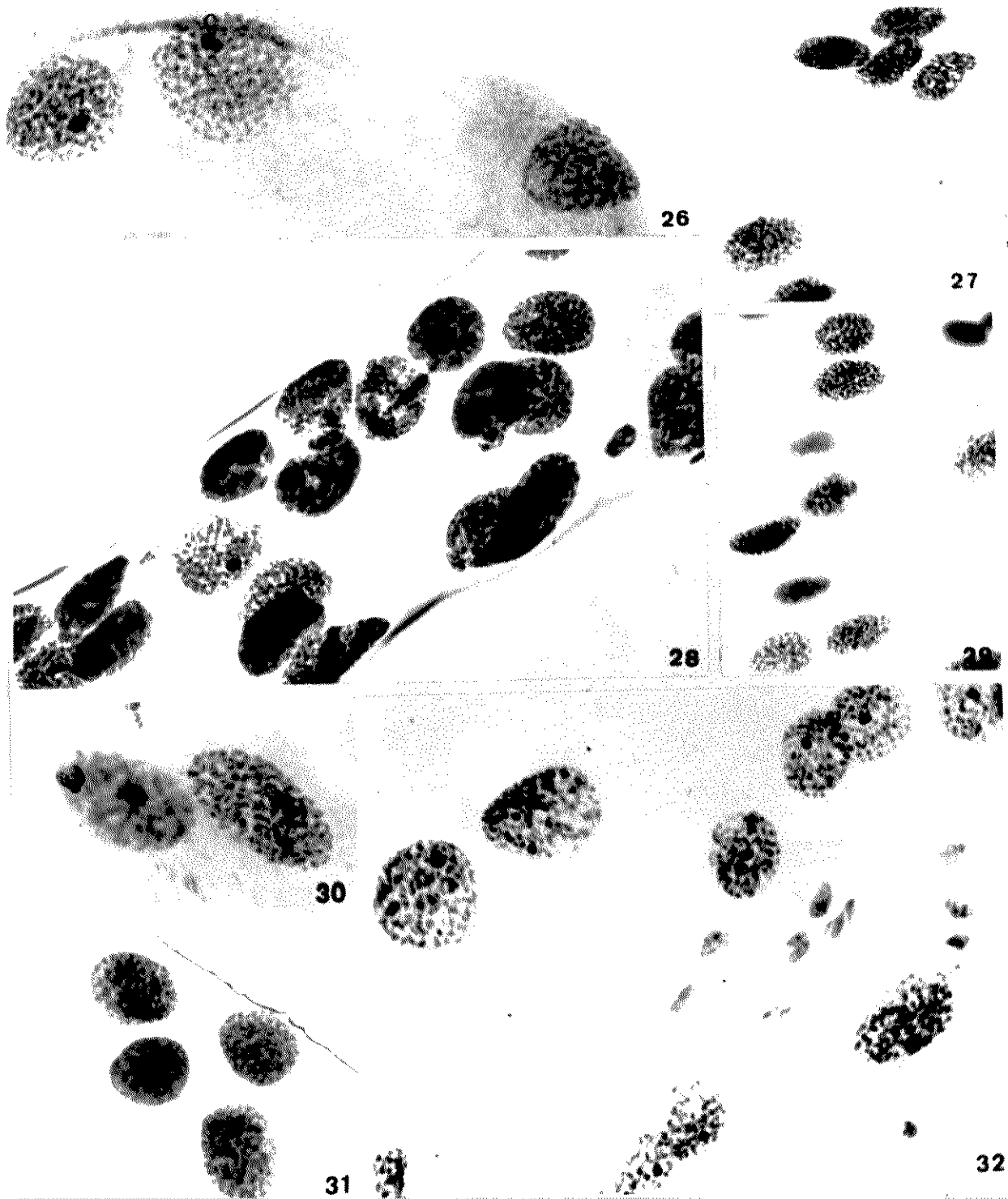
Quanto às células dos túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de *Rhodnius prolixus*, foram observados núcleos sem cromocentro e cromatina com aspecto filamentososo (Figs. 20 a 22). Em núcleos submetidos ao método de Banda C, uma área central clara foi observada (Figs. 20 e 21), correspondendo, provavelmente, à região nucleolar. Também em núcleos submetidos à reação de Feulgen, uma zona desse tipo parece ser sugerida (Fig. 22).

Já em ninfas de 5º estadio de *Dipetalogaster maximus* os núcleos exibem um pequeno cromocentro (Figs. 23 a 25), detectado por Banda C, reação de Feulgen e coloração por orceína lacto-acética.

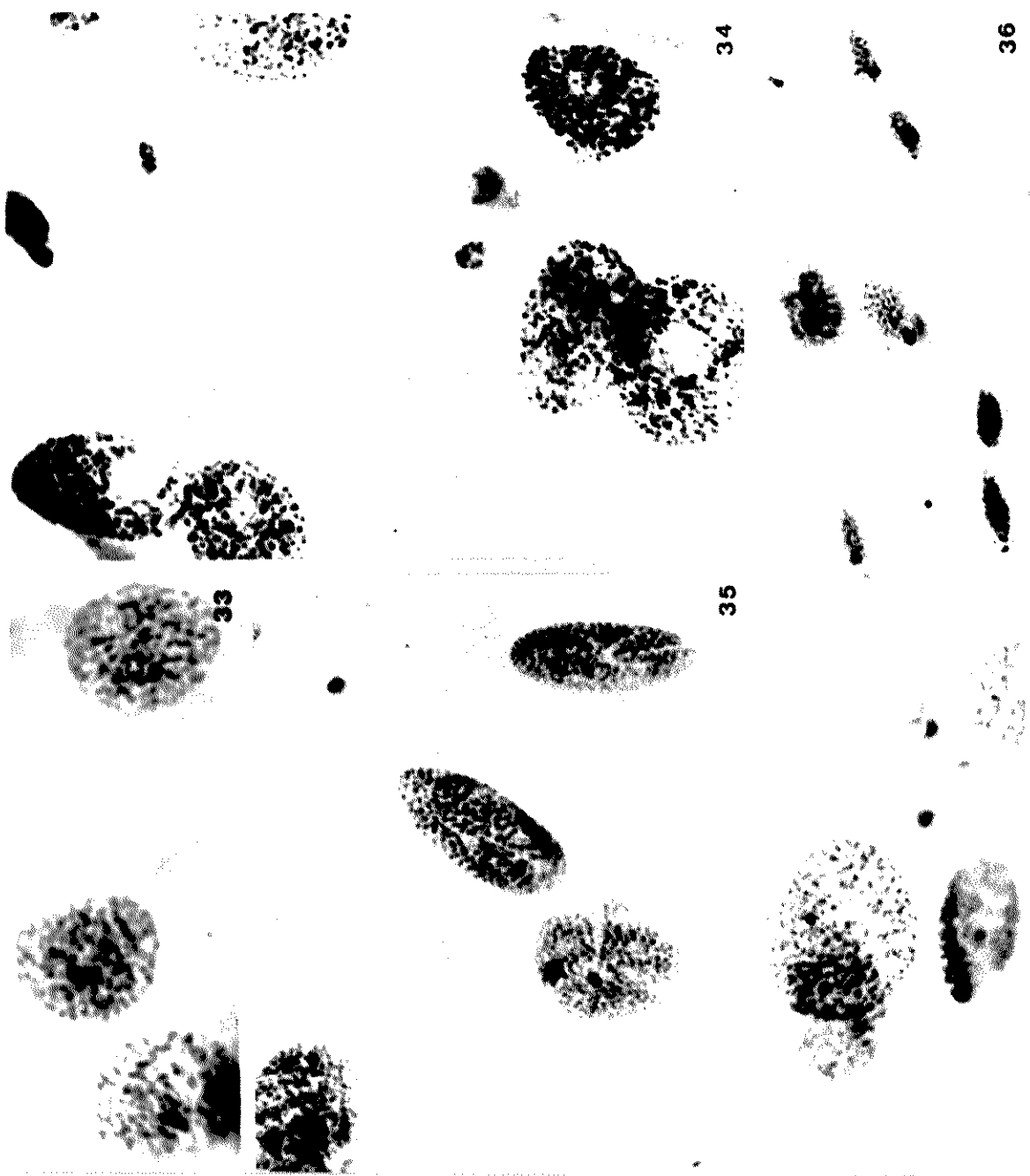
Em *Panstrongylus lignarius* e *Triatoma pseudomaculata* foram encontrados espécimens cujos túbulos de Malpighi exibiam núcleos com um pequeno cromocentro (Figs. 26, 28, 30 e 32), bem como espécimens com núcleos onde o cromocentro se mostrou ausente (Figs. 27, 29 e 31). Estes últimos foram comprovados pelas três metodologias de coloração







utilizadas. Também em *Triatoma brasiliensis* foi encontrada situação semelhante : indivíduos cujos núcleos exibiam um cromocentro pequeno (Figs. 33, 35 e 36) bem como espécimens em que ocorria ausência de corpo heterocromático (Fig. 34). Nos núcleos dos órgãos desta espécie após o método de Banda C, também observaram-se áreas centrais claras (Fig. 34) , provavelmente sítios nucleolares.



FREQÜÊNCIAS NUCLEARES

De todos os hemípteros citados estimou-se, por contagem visual, o número de núcleos dos túbulos de Malpighi, sendo os resultados obtidos apresentados nas Tabelas I, II, IIA, e III.

Nos túbulos de Malpighi de ninfas de 3º estadio de *Triatoma infestans*, foi observada uma predominância acentuada de núcleos com um único cromocentro; núcleos com dois corpos heterocromáticos foram bem pouco freqüentes (Tabs. I e II). Também em ninfas de 5º estadio desse inseto, os núcleos mais freqüentemente encontrados possuem um cromocentro. Quanto aos núcleos com dois cromocentros, sua freqüência aumentou com relação à verificada em núcleos do 3º estadio. Núcleos com vários cromocentros foram também encontrados com freqüência significativa nessa fase do desenvolvimento (Tabs. I e II).

Os dados relativos as ninfas de *Triatoma infestans* de 3º e 5º estadios, regularmente alimentadas, foram comparados, entre si, através do teste da posição de Wil-

TABELA I - Frequência absoluta de núcleos por fenótipo nuclear de acordo com a fase de desenvolvimento e estado nutricional em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*.

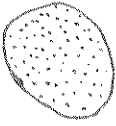
Fase de desenvolvimento e estado nutricional	Número total de núcleos		Frequência por fenótipo nuclear		
III Alimentado					
	9 515	9 437			
	11 319	11 304		78	-
	14 443	14 320		15	-
	11 759,0 ± 2 493,2*			23	-
V Alimentado					
	11 309	9 680		575	1 054
	13 451	12 962		260	229
	10 869	8 844		564	1 461
	12 124	11 597		296	231
	11 938,2 ± 1 134,6*				
V Jejum					
	6 334	6 045		3	32
	7 027	6 567		57	295
	6 457	6 036		116	220
	6 606,0 ± 369,7*				254
					108
					175

* = ($\bar{X} \pm S$)

TABELA II - Frequência percentual de núcleos e por fenótipo nuclear de acordo com a fase de desenvolvimento e estado nutricional em túbulos de Malpighi de *Thaíatoma infestans*.

Fase de desenvolvimento e estado nutricional	Frequência percentual	por fenótipo nuclear		
				
III Alimentado	99,18 99,86 99,14	0,81 0,13 0,15	- - -	- - -
V Alimentado	85,59 96,36 81,30 95,60	5,08 1,93 5,10 2,40	9,32 1,70 13,40 1,90	- - - -
V Jejum	95,43 93,45 93,47	0,04 0,81 1,79	0,50 4,10 3,40	4,01 1,53 2,71

TABELA IIA - Frequência absoluta de núcleos por fenótipo nuclear em túbulos de Malpighi de ninfas de *Triatoma infestans* realimentadas após jejum prolongado.

Número total de núcleos	Frequência por				fenótipo	nuclear	núcleos em degeneração	
							várias for - mas anômalas	
11 825	7 978	198			32		3 407	210
12 857	7 294	145			90		5 123	205
13 876	7 008	172			80		6 482	134
14 024	6 433	343			7 218	30		
7 199*	4 232	31			2 921	15		
7 965*	5 780	173			1 282	30		

* recusaram alimento

TABELA III - Frequência nuclear em túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de algumas diferentes espécies de triatomíneos.

Espécies de triatomíneos	n	número total de núcleos	$\bar{x} \pm s$	CV (%)
<i>Rhodnius prolixus</i>	3	7 181 6 726 7 393	7 100 $\pm$ 340,79	4,79
<i>Triatella gastet</i> <i>triatellus</i>	3	40 900 40 425 40 225	40 516,66 $\pm$ 346,71	0,85
<i>Triatoma</i> <i>leptogaster</i>	3	15 651 16 670 16 229	16 183,33 $\pm$ 511,03	3,15
<i>Triatoma</i> <i>assassinator</i>	3	9 242 8 961 8 883	9 028,66 $\pm$ 188,82	2,09
<i>Triatoma</i> <i>castaneipes</i>	3	11 491 12 759 11 043	11 764,33 $\pm$ 890,05	7,56

coxon (Brown & Hollander, 1977). Neste teste, trabalha-se com os valores das frequências colocados em ordem crescente ,

ninfas de 3º estadio - 9515 11319 14443

ninfas de 5º estadio - 10869 11309 12124 13451

e a cada valor atribui -se-lhe uma classificação:

1	4	7	
2	3	5	6

$$W = 2 + 3 + 5 + 6 = 16$$

W corresponde à soma das posições obtidas da amostra de ninfas de 5º estadio.

Temos,

$$m = 3$$

$$n = 4$$

onde m é o número de núcleos contados das ninfas de 3º estadio e n é o número de núcleos das ninfas de 5º estadio.

A hipótese nula (H_0) é a de que o número de núcleos das ninfas de 5º estadio seja igual ao das ninfas de 3º estadio. A hipótese alternativa é a de que o número de núcleos das ninfas de 5º estadio seja menor que o das ninfas de 3º estadio.

Como o tamanho estimado do teste é 0,57 , portanto maior de 0,05, há fortes indícios de que a hipótese do número de núcleos das ninfas de 3º estadio é igual ao das ninfas de 5º estadio. Já em insetos de 5º estadio submetidos a um período de jejum prolongado, quando comparados com os normalmente alimentados, encontrou-se um decréscimo no número de núcleos ao redor de 40%.

Com o objetivo de detectar estatisticamente o efeito do jejum sobre o número de núcleos dos túbulos de Malpighi de *Thiatoma infestans*, foi utilizado o teste da posição de Wilcoxon (Brown & Hollander, 1977). Os valores das frequências nucleares são colocados em ordem crescente,

insetos em jejum - 6334 6457 7027
 insetos alimentados - 10869 11309 12124 13451

a cada valor é atribuída uma classificação:

1 2 3
 4 5 6 7

$$W = 3 + 2 + 1 = 6$$

W corresponde à soma das posições obtidas da amostra de insetos em jejum.

Temos,

$$m = 4$$

$$n = 3$$

onde m é o número de núcleos contados dos insetos rotineiramente alimentados e n é o número de núcleos dos insetos submetidos a jejum.

A hipótese nula (H_0) é a de que o número de núcleos dos controles (rotineiramente alimentados) seja igual ao dos tratados (jejum). A hipótese alternativa (H_a) é a de que o número de núcleos dos tratados seja menor que o dos controles.

Como o tamanho estimado do teste é 0,029 , portanto menor que 0,05, aceitamos a hipótese, ao nível de significância de 0,05, de que o número de núcleos dos tratados é menor que o dos controles.

Dos seis insetos a que se forneceu alimento após um período de jejum, dois o recusaram. Nestes, o número total de núcleos se aproximou ao normalmente detectado nos insetos submetidos a jejum, enquanto o número de núcleos dos espécimens que se realimentaram se aproximou ao dos insetos não submetidos ao jejum (Tabs. IIA e I). Nestes dois insetos e em um dos que se realimentaram, a frequência de núcleos com vários cromocentros foi alta, houve aparecimento de núcleos com fenótipo homogêneo e não foram encontrados núcleos em degeneração. Já na maioria dos insetos que se realimentou, uma frequência alta de núcleos com várias formas anômalas se mostrou presente, ao lado de uma predominância de núcleos normais com um único cromocentro (Tab. IIA).

Dentre os triatomíneos relacionados na Tabela III, verifica-se que a frequência nuclear em túbulos de Malpighi é maior em *Dípetalogaster maximus*, enquanto em *Rhodnius prolixus* é a menor.

Quanto às frequências nucleares obtidas para as espécies *T. infestans*, *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis*, foram elas comparadas por análise de variância (Tab.IV).

TABELA IV - Análise de variância calculada para as frequências nucleares de *Triatoma infestans*, *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis*.

FV	GL	MS	F
Espécies	2	8 465 316,9	10,739 > $F_{0,01} = 9,55$
Resíduo	7	788 267,17	
Total	9		

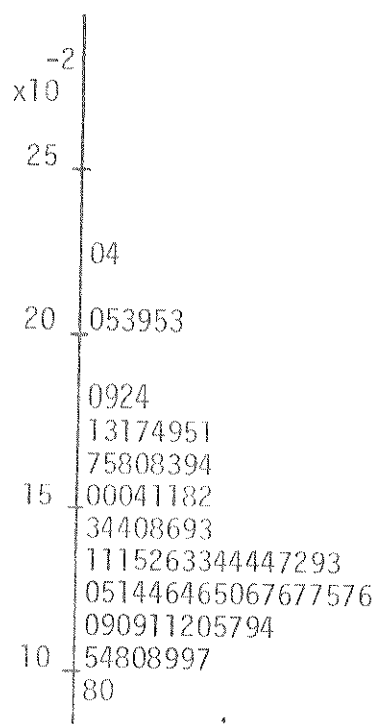
Deste teste constatou-se que a hipótese das médias entre as três espécies de hemípteros serem iguais é rejeitada ao nível de 0,01.

Comparando-se as frequências nucleares das três espécies de hemípteros pelo teste de Scheffé (Scheffé, 1958), constata-se que os valores referentes a *Triatoma pseudomaculata* é que se encontram distantes da média, sendo as frequências nucleares de *Triatoma infestans* e *Triatoma brasiliensis*, muito próximas à média.

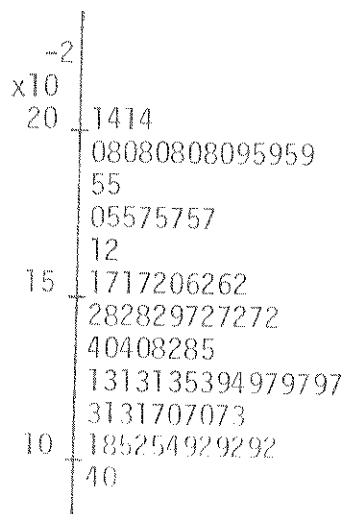
ÁREAS E VOLUMES NUCLEARES

Os valores obtidos da determinação de áreas e volumes nucleares para as três espécies de hemípteros estão discriminados nas Figuras 37, 38, 39 e 40, sob a forma de ramo e folhas (Dachs, 1978).

As Figuras 41 e 42 exibem as relações entre as áreas e volumes nucleares calculados para as três espécies de hemípteros. Cada diagrama representa os valores referentes às áreas ou volumes nucleares, obtidos segundo um determinado. Em cada diagrama, o primeiro traço horizontal é o 1º quartil, que determina que 25% dos valores das áreas nucleares estão localizados abaixo desse ponto. O 2º traço horizontal é a mediana, indica que 50% dos núcleos têm suas áreas concentradas abaixo desse ponto. O 3º traço é o 3º quartil, localizando-se abaixo dele, 75% das áreas nucleares. Os pontos representados por um círculo vazio são chamados pontos soltos e se localizam na região delimitada por uma diferença interquartilica e até uma diferença e meia, acima do 2º quartil ou abaixo do 1º. Os pontos representados por um círculo cheio



I



II

FIG. 37 - Ramo e folhas das áreas nucleares calculadas para *Rhodnius prolixus*, segundo os Métodos I e II. Na primeira linha, em baixo, lê-se 9,40; na segunda, 10,18; 10,52; 10,54; 10,92; 10,92; 10,92, e assim por diante.

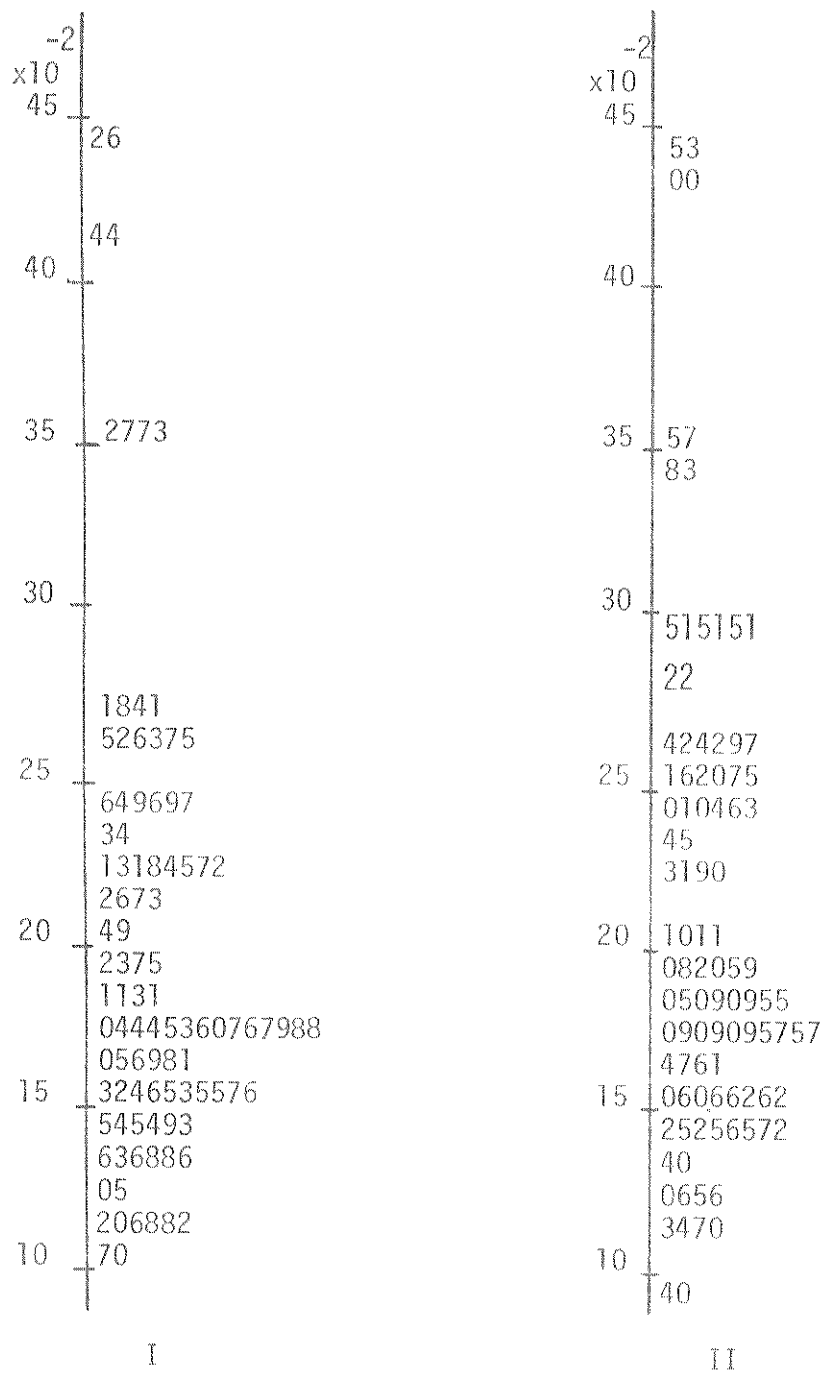


FIG. 38 - Ramo e folhas das áreas nucleares calculadas para *Triatoma infestans*, segundo os Métodos I e II.

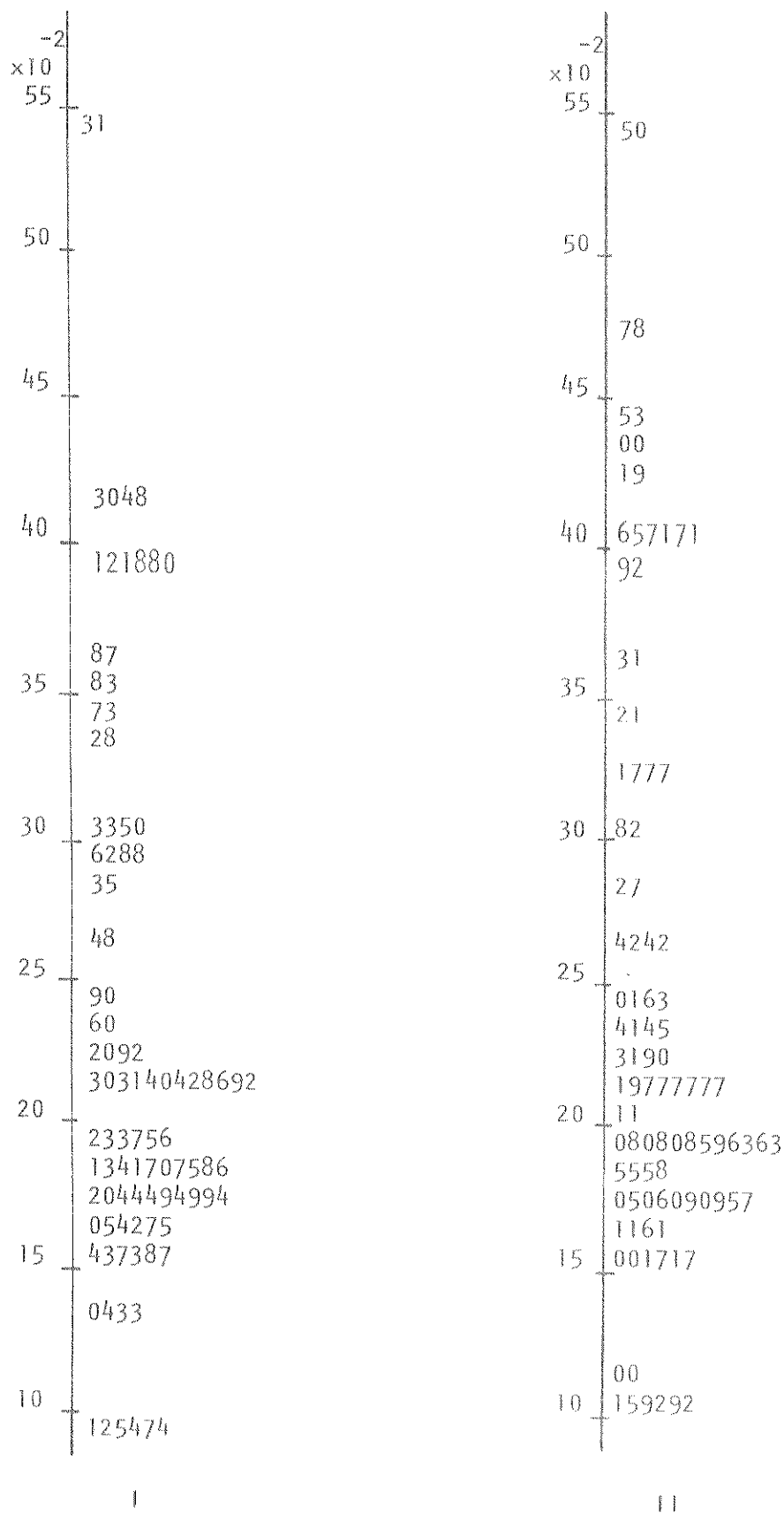


FIG. 39 - Ramo e folhas das áreas nucleares calculadas, segundo os Métodos I e II, para *Dipetalogaster maximus*.

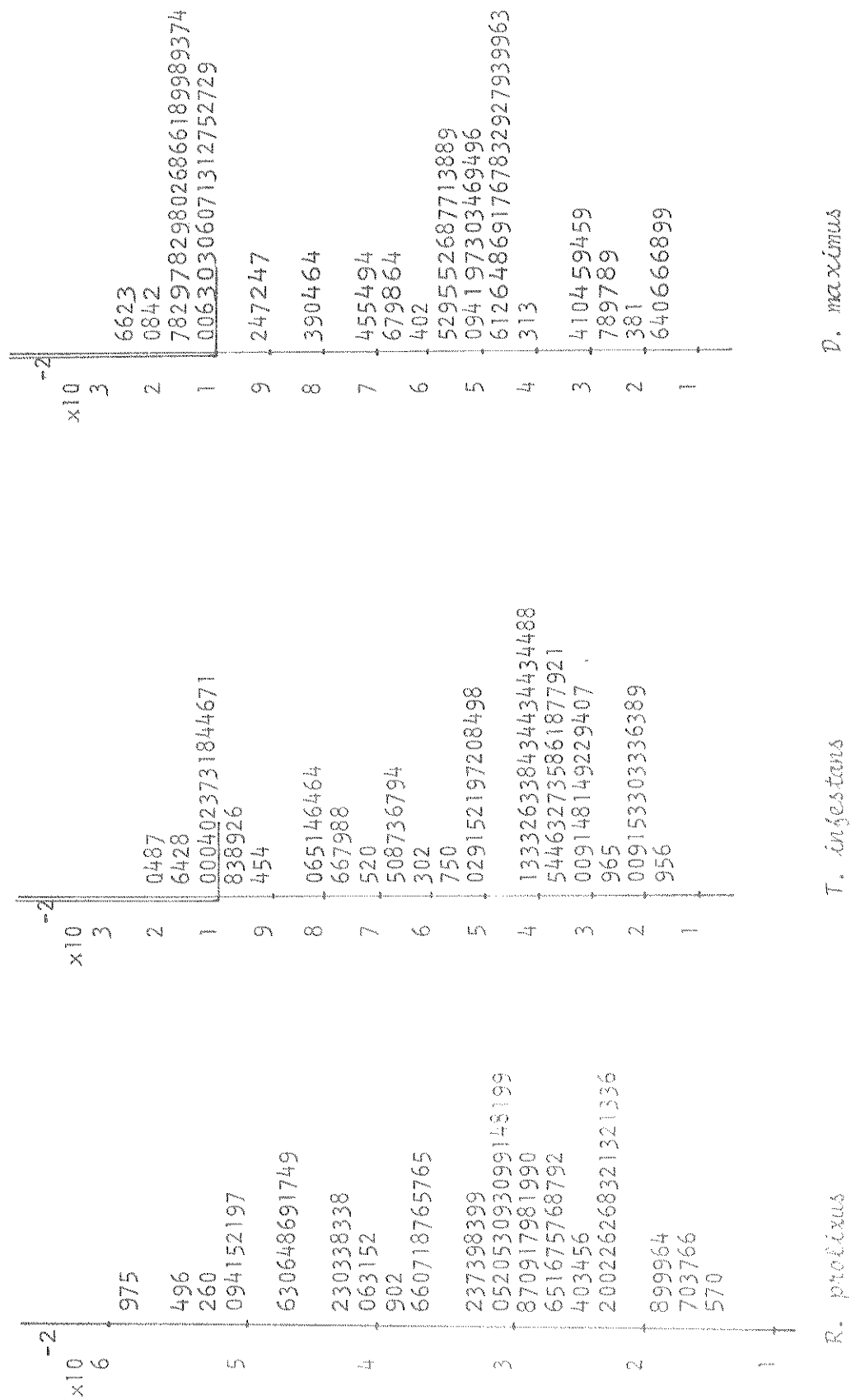
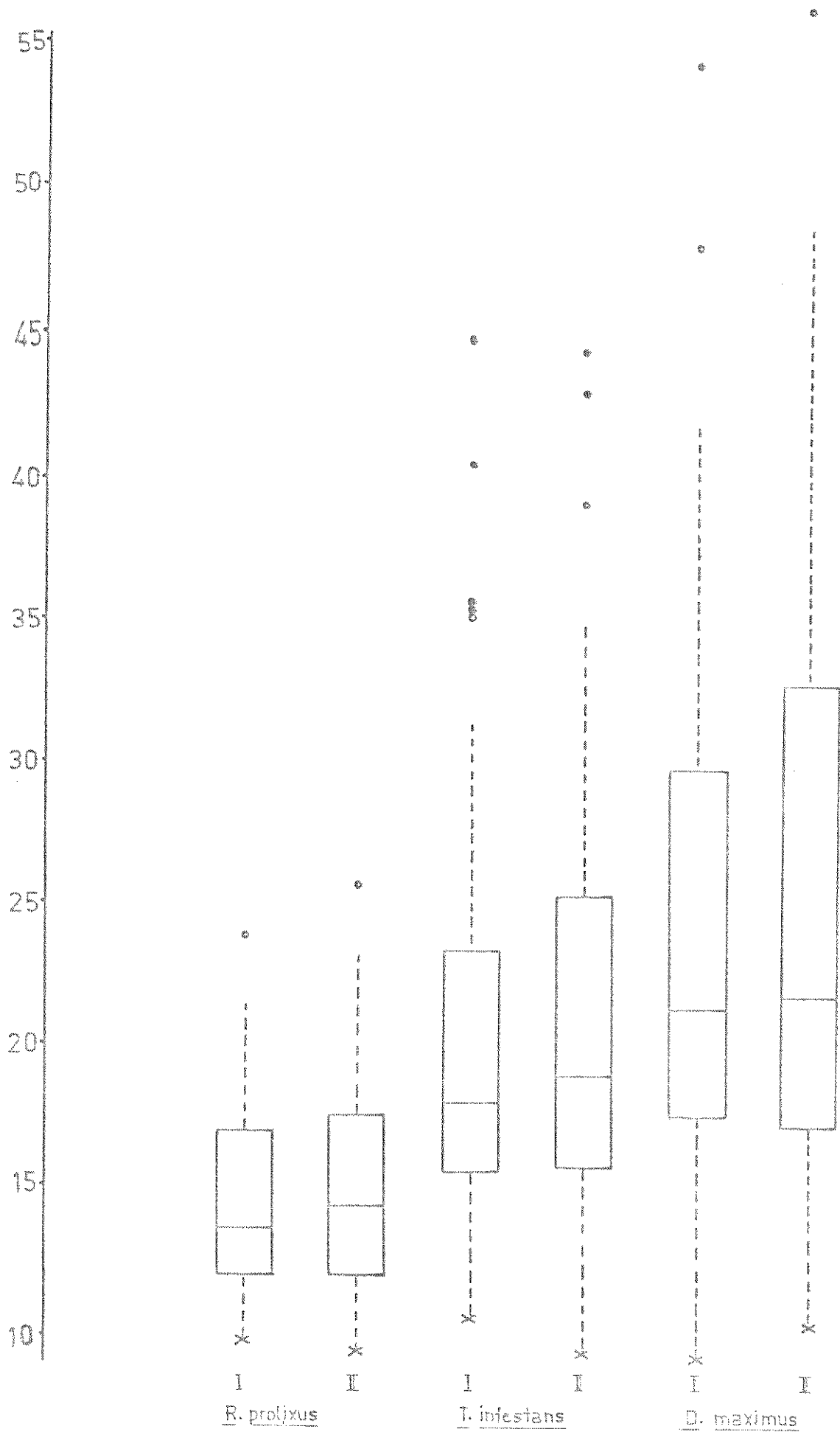


FIG. 40 - Ramo e folhas dos volumes nucleares calculados para *R. prolixus*, *T. infestans* e *D. maxims*.

#	50	50	50	50	50	50	34
*	9.80	9.40	10.70	9.40	9.12	10.15	
J1	12.14	12.13	15.46	15.62	17.44	17.09	
MD	13.44	14.28	17.84	18.81	21.30	21.77	
J2	16.83	17.57	23.34	25.20	29.62	32.77	
*	22.04	20.14	44.26	44.53	54.31	54.50	
DJ	4.69	5.44	7.88	9.58	12.18	15.68	



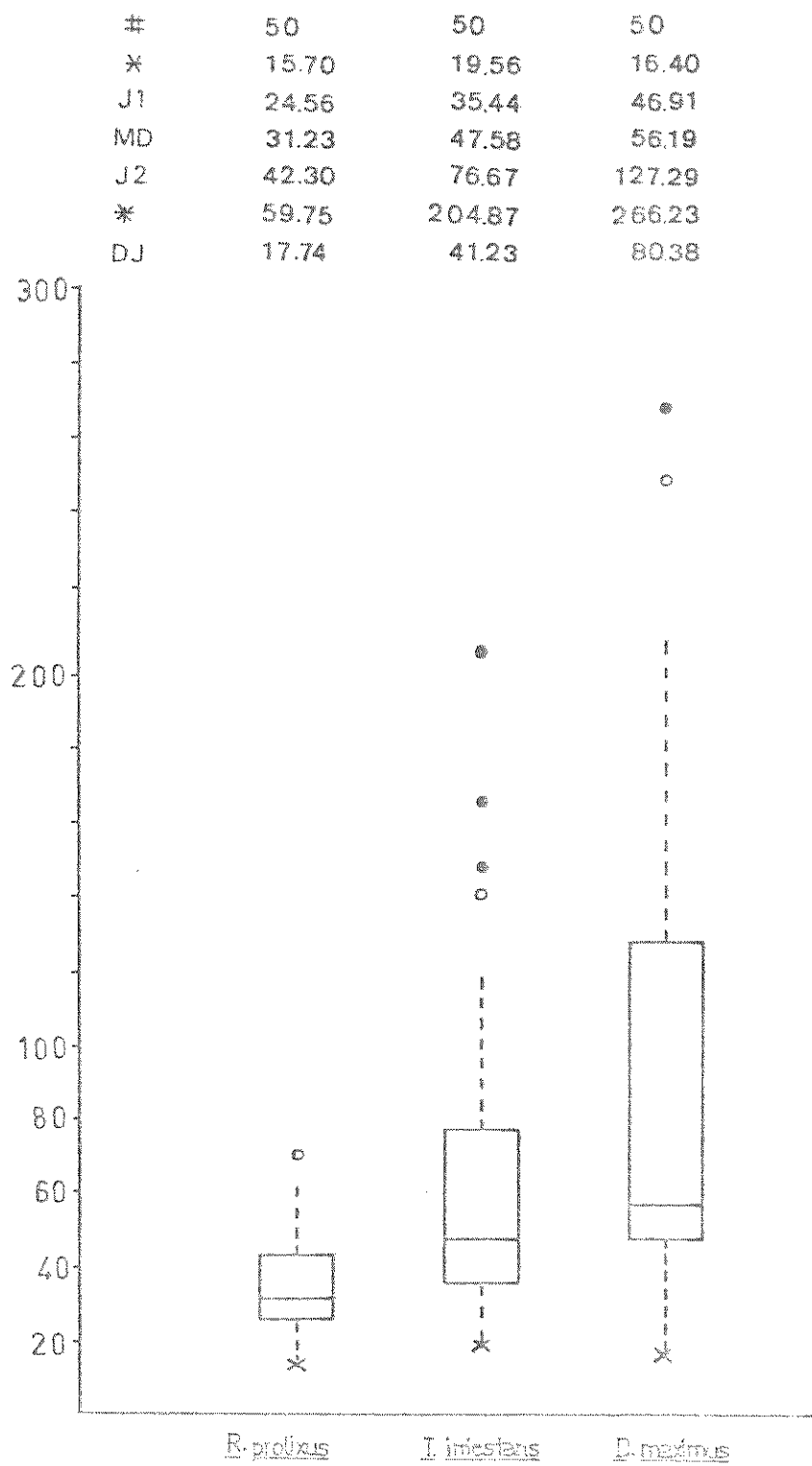


FIG. 42 - Desenho esquemático, representando as relações entre os valores dos volumes nucleares calculados para *R. prolixus*, *T. infestans* e *D. maximus*. Em cima, os respectivos esquemas de cinco números.

são ditos pontos desgarrados, localizando-se na região acima ou abaixo de uma diferença interquartilica e meia. Os pontos soltos ocorrem com baixa probabilidade, enquanto os desgarrados ocorrem com baixíssima probabilidade (Dachs, 1978).

Os dados estatísticos obtidos da determinação das áreas e volumes nucleares para *Rhodnius prolixus* , *Dipetalogaster maximus* e *Triatoma infestans* estão discriminados na Tabela V.

Os valores de área obtidos pelos métodos de contagem de quadradinhos (Método I) e medidas dos eixos (Método II) para as três espécies de hemípteros foram comparados por análise de variância (Tabelas VI e VII).

TABELA VI - Análise de variância calculada para as áreas nucleares de *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Dipetalogaster maximus* , obtidas segundo o método I.

FV	GL	SS	MS	F
Espécies	2	2 190,6	1 095, 3	20,89 > F _{0,01} = 4,61
Resíduo	147	7 706,9	52,4	
Total	149	9 897,5		

A hipótese das médias para as três espécies de hemípteros serem iguais, é rejeitada ao nível de 0,01.

Neste teste constatou-se que *R. prolixus* apresenta a menor área nuclear, seguida por *T. infestans* e *D.*

TABELA V - Dados estatísticos obtidos da determinação de áreas e volumes nucleares para *Triatoma infestans*, *Dipetalogaster maximus* e *Rhodnius prolixus*.

ÁREA	NUCLEAR (μm^2)	conf. de qua- drado	<i>Triatoma infestans</i>				<i>Dipetalogaster maximus</i>				<i>Rhodnius prolixus</i>			
			$\bar{X}$	S	CV(%)	$\bar{X}$	S	CV(%)	$\bar{X}$	S	CV(%)	$\bar{X}$	S	CV(%)
			20,20	7,32	36,23	23,66	9,71	41,03	14,52	3,19	21,96			
		eixos	21,03	7,66	36,42	24,97	10,73	42,97	14,60	3,09	21,16			
VOLUME NUCLEAR			61,11	38,70	63,32	80,92	58,09	71,78	34,00	10,81	31,79			
(μm^3)														

maximus, havendo uma pequena porção (cerca de 8%) dos núcleos destes dois últimos hemípteros, cujas áreas são coincidentes.

TABELA VII - Análise de variância calculada para as áreas nucleares de *T. infestans*, *R. prolixus* e *D. maximus*, obtidas pelo método II.

FV	GL	SS	MS	F
Espécies	2	2 749,9	1 374,9	22,46 > $F_{0,01} = 4,61$
Resíduo	147	8 998,0	61,2	
Total	149	11 747,8		

A hipótese das médias para as três espécies de hemípteros serem iguais é rejeitada ao nível de 0,01.

Os resultados deste teste coincidem com aqueles obtidos pelo método I, isto é, *R. prolixus* exibe a menor área nuclear, seguida de *T. infestans* e *D. maximus*.

Quanto aos volumes nucleares destas três espécies de hemípteros, também foram eles comparados por análise de variância (Tabela VIII) .

TABELA VIII - Análise de variância calculada para os volumes nucleares de *T. infestans*, *R. prolixus* e *D. maxímus*.

FV	GL	SS	MS	F
Espécies	2	55 695	27 848	16,72 $> F_{0,01} = 4,61$
Resíduo	147	244 827	1 665	
Total	149	300 522		

A hipótese das médias serem iguais é rejeitada ao nível de 0,01.

Também quanto ao parâmetro volume nuclear, constatou-se a relação crescente entre os três hemípteros comparados, sendo *R. prolixus* possuidor do menor volume, seguindo-se *T. infestans* e *D. maxímus*. Cerca de 14% dos núcleos de *D. maxímus* e *T. infestans* apresentam o mesmo volume.

DISCUSSÃO

Os fenótipos nucleares detectados neste trabalho com métodos de Banda C e reação de Feulgen nas células dos túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de *Triatoma infestans* coincidem com resultados anteriores, obtidos pelo método de reação de Feulgen, em células desse inseto em condições rotineiras de alimentação (Mello, 1971, 1978a).

Os fenótipos nucleares exibidos pelas células dos órgãos de ninfas de 3º estadio desse hemíptero, descritos na literatura como possuindo apenas um corpo heterocromático (Mello, 1971, 1978a) apresentaram núcleos com um ou dois cromocentros, porém com acentuada predominância dos primeiros. A porcentagem de núcleos com dois cromocentros foi extremamente baixa (menos de 1%). A detecção desse fenótipo nuclear já no 3º estadio, embora com frequência muito baixa, indica que a possível dissociação do corpo heterocromático único em pelo menos dois menores, deva ocorrer mais cedo do que no 4º estadio, etapa do desenvolvimento considerada como a inicial para tal processo (Mello, 1971).

Por outro lado, as células dos túbulos de Malpighi de ninfas de *Triatoma infestans* que foram submetidas a um período de jejum, exibiram núcleos com um, dois ou vários cromocentros, além de núcleos muito grandes, com cromocentro parcialmente descompactado. Com exceção do último, os padrões nucleares mencionados são encontrados também em ninfas de 5º estadio regularmente alimentadas (Mello, 1971, 1978a), sugerindo que esses núcleos não tiveram seu fenótipo alterado pelo jejum. Os núcleos muito grandes são sugestivos de terem sofrido fusão nuclear, fenômeno já detectado nesse grupo de insetos, quando submetidos a jejum prolongado (Wigglesworth, 1967; Mello & Raymundo, 1980; Mello, 1983). Admite-se que o fenômeno de fusão nuclear nesses insetos seja muito facilitado pelo fato da maioria de suas células serem binucleadas, e também pela baixa taxa de seu metabolismo (Wigglesworth, 1967) e presença muito freqüente de vírus nos seus vários tecidos (Dolder & Mello, 1978; Mello et al, 1980; Mello & Pudney - informação pessoal). Além disso, a fusão de núcleos nesse material pôde ser amplamente confirmada quando se examinou a freqüência nuclear nos insetos submetidos a jejum, o que será discutido mais adiante. Quanto aos núcleos com cromocentro descompactado, tal fenótipo já havia sido constatado nesse material (Mello, 1983) e em células de dutos de glândulas mamárias em processo de carcinogênese (Sandritter et al, 1974). Fenômeno semelhante foi observado em heterocromatina de cromossomos politênicos de *Rhynchosciara*, sob ação de antibióticos, choque de temperatura, presença de vírus e microsporídeos ou em culturas de glândulas salivares desse inseto (Simões et al, 1975; Simões e Cestari, 1982; Diaz et al, 1969). Tal fenômeno de descompactação poderia estar associado à colocação em atividade, como resposta ao "stress" fisiológico, de

áreas cromatínicas capazes de serem transcritas, embora cromocentros como os de *Triatoma infestans* contenham heterocromatina constitutiva descrita como predominantemente não codificadora (Mello, 1978b, 1983).

Em ninfas de 5º estadio de *Triatoma infestans*, realimentadas após esse período de jejum, encontraram-se vários tipos de fenótipos nucleares. Alguns eram característicos de ninfas de 5º estadio regularmente alimentadas (com um, dois ou vários cromocentros); outros, característicos do inseto em jejum (sem cromocentro e muito grandes). Os primeiros não foram afetados pelo jejum prolongado, enquanto nos outros ocorreu, além de fusão nuclear, também descompactação da heterocromatina do cromocentro. Em alguns núcleos a eucromatina apresentou-se filamentosa, quando normalmente encontra-se na forma granular. Esse aspecto filamentoso da eucromatina pode estar relacionado à fase do ciclo celular, pois em núcleos poliplóides de hemípteros tem sido descrito que a cromatina sofre alterações de espiralização em fases consideradas como pertencentes a diferentes etapas da endomitose (Gleiter, 1938 e 1939).

Núcleos com cromocentros entumescidos podem estar também relacionados ao fenômeno de descompactação da heterocromatina.

Os núcleos que se apresentaram estrelados, vacuolizados, sem forma definida ou como estruturas compactas e picnóticas, podem estar relacionados à necrose nuclear e morte da célula (Mello & Raymundo, 1978). Esses mesmos tipos foram observados também em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* em condições experimentais quando se submeteramos insetos a tratamento com metais pesados (cobre e mercúrio)

(Kubrusly, 1984).

Com relação às outras espécies estudadas, de triatomíneos, as células de *Rhodnius prolixus* mostraram núcleos sem cromocentro e com cromatina filamentosa, confirmando relatos anteriores (Mello & Lima, 1978), obtidos em túbulos de Malpighi submetidos à reação de Feulgen. Em alguns núcleos detectou-se, pelos métodos de Banda C e reação de Feulgen, uma região central clara. Tal região deve corresponder ao sítio nucleolar, uma vez que, frente a tais metodologias específicas para DNA, essa área apresentou-se em imagem negativa.

Em ninfas de 5º estadio de *Dipetalogaster maximus*, detectou-se, nos núcleos das células dos túbulos de Malpighi, eucromatina com aspecto granular e a presença de um pequeno cromocentro.

Nos túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de *Panstrongylus lignarius*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma brasiliensis*, alguns espécimens exibiram núcleos com um pequeno cromocentro, enquanto outros mostraram total ausência do corpo heterocromático. O mesmo fenômeno foi observado em *Panstrongylus megistus* (Mello, 1979; Mello et al, 1984; Randi et al, 1984). Há indicações de que, pelo menos nesta espécie, o cromocentro presente nos núcleos dos túbulos de Malpighi represente o cromossomo Y heterocromático, ocorrendo, portanto, apenas em machos (Randi et al, 1984). Dessas observações se conclui que a presença de cromocentro mais ou menos desenvolvido, ou mesmo sua ausência, não apresenta nenhuma correlação direta com a posição que as espécies estudadas ocupam na respectiva árvore filogenética. Em algumas espécies, a presença do cromocentro poderá estar ligada à heterocromatização do Y.

Mas, pelo menos em *Triatoma infestans*, o cromocentro é formado principalmente pelos grandes autossomos A, B e C, heterocromáticos, que participariam de um mecanismo de isolamento reprodutivo da espécie (Schreiber & Pellegrino, 1950).

Os dados quantitativos de frequências nucleares demonstraram predominância acentuada de núcleos com um cromocentro, seja no 3º como no 5º estádios do desenvolvimento de *Triatoma infestans*, sobre aqueles com dois cromocentros. É interessante mencionar que, pelo menos para 5º estadio ninfal, há dados e observações de que a ocorrência de núcleos com mais de um cromocentro seja sensivelmente maior do que a verificada neste trabalho (Mello, 1971; Kubrusly, 1984), às vezes dentro de uma mesma população de insetos, o que pode sugerir até um certo "polimorfismo em fenótipos nucleares" para esta espécie.

Já foi demonstrado, por análises citofotométricas, que nos núcleos dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* ocorre um processo de poliploidização ao longo do desenvolvimento (Mello, 1971, 1975, 1978a, c). Essa poliploidia poderia ser atingida por endomitoses (Mello, 1975) ou por fusão nuclear, pois sabe-se que em hemípteros sugadores de sangue pode ocorrer fusão de núcleos somáticos, quando os insetos permanecem por algum tempo em jejum (Mello & Raymundo, 1980), ou por ambos.

O teste de Wilcoxon revelou não haver alteração no número de núcleos dos túbulos de Malpighi de ninfas de *Triatoma infestans* de 3º estadio, quando comparado com o número de núcleos presentes em ninfas de 5º estadio regularmente alimentadas. Conseqüentemente, o aumento da poliploidia detectado nesses insetos, ao longo do desenvolvimento normal, não

seria resultante de fusões nucleares, mas sim de endomitose . Isso foi também demonstrado em túbulos de Malpighi de *Panstrongylus megistus* (Mello, 1978c).

Quando se comparou o número de núcleos dos túbulos de Malpighi de ninfas de *Triatoma infestans* de 5º estadio regularmente alimentadas e o de ninfas submetidas a jejum prolongado, encontrou-se um decréscimo no número de núcleos dos insetos em jejum, da ordem de 40%. Também o teste de Wilcoxon comprovou estatisticamente o decréscimo no número de núcleos. Esses resultados são significativos de que o jejum induz a fusão nuclear nesses insetos, levando a um aumento no grau de ploidia obtido anteriormente por endomitose (Mello & Raymundo, 1980). O fenômeno de fusão nuclear foi também observado em outras espécies de hemípteros sujeitos a jejum (Wigglesworth, 1967; Mello & Raymundo, 1978, 1980), o que sugere ser um processo de ocorrência geral entre os hemípteros sugadores de sangue.

Dentre os insetos realimentados após jejum prolongado, dois deles recusaram alimento, e nesses, o número de núcleos presentes em seus órgãos, aproximou-se daquele encontrado nos insetos mantidos em jejum. Nos insetos que aceitaram a realimentação, a frequência nuclear esteve próxima àquela encontrada nos insetos regularmente alimentados. Pode-se especular que, neste caso, o estado fisiológico desses insetos permitiu sua realimentação numa tentativa de recuperar seu metabolismo normal. No entanto, deve-se mencionar que nestes insetos grande parte de seus núcleos encontrava-se em processo de degeneração, o que talvez dificultasse o retorno às condições metabólicas normais. Por outro lado, nos insetos com fusão nuclear e que recusaram alimentação, suas condições fisiológicas gerais poderiam estar drástica e irreversivelmente alteradas. Essas di

ferências individuais de resposta ao "stress" fisiológico, no caso jejum, encontram apoio em resultados de diferentes respostas individuais à ação tóxica por metais pesados (Kubrusly, 1984).

Nos outros triatomíneos estudados, a frequência nuclear encontrada nos túbulos de Malpighi colocou-se na seguinte ordem: maior em *Dipetalogaster maximus*, seguida por *Panstrongylus lignarius*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Rhodnius prolixus*. Além disso, os diagramas esquemáticos de áreas e volumes nucleares e respectivos testes estatísticos determinados para *Dipetalogaster maximus*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, revelaram que *Rhodnius prolixus* possui os menores volumes e áreas nucleares, seguido por *Triatoma infestans* e *Dipetalogaster maximus*. Há uma relação direta entre a frequência nuclear e o tamanho desses insetos. Assim *Dipetalogaster maximus* com maior frequência nuclear, é o maior em tamanho e *Rhodnius prolixus*, com menor frequência, é o menor. Os resultados obtidos quanto às frequências, áreas e volumes nucleares não mostraram correspondência dessas espécies com suas respectivas posições na árvore filogenética de Usinger (*Rhodnius* ocupa a posição mais baixa, enquanto *Triatoma* a mais elevada). Não existe também correlação com o número de cromossomos dessas espécies (Ueshima, 1966), nem com a compactação das áreas cromatínicas em cromocentros.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- A poliploidia previamente relatada, com base em métodos citofotométricos, nos túbulos de Malpighi de ninfas de *Triatoma infestans* regularmente alimentadas é resultante de endomitoses, uma vez que a frequência nuclear não se reduz com o desenvolvimento.

- O jejum prolongado induz a fusão nuclear em células dos túbulos de Malpighi de ninfas de *Triatoma infestans* (mesmo naquelas em que o grau de ploidia ótimo havia sido já atingido, ou seja, no 5º estadio ninfal).

- A frequência nuclear determinada para os órgãos de três diferentes gêneros de triatomíneos assim como o valor das áreas e volumes nucleares desses hemípteros, estão diretamente correlacionados com o tamanho médio dos insetos de cada espécie e não com a posição dos gêneros na árvore filogenética de Usinger, ou com os números de cromossomos respectivos.

- Das espécies analisadas, apenas *Triatoma infestans* exibiu mais de um fenótipo nuclear para um mesmo indivíduo. As frequências desses fenótipos parecem variar em função do estado metabólico dos insetos.

- Em algumas espécies (*Panstrongylus lignarius*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma brasiliensis*) há indicações de que a variação em fenótipo, em termos de presença ou ausência de cromocentro, mostra-se ligada ao sexo dos espécimens, ou seja, a presença do cromossomo Y acarretaria a existência de um pequeno cromocentro por núcleo.

RESUMO

Com base na determinação do número de núcleos dos túbulos de Malpighi de ninfas do 3º e 5º estádios de *Triatoma infestans*, corados com orceína lacto-acética, demonstrou-se que a poliploidia previamente relatada para esses núcleos é resultante de endomitoses. Essa poliploidia é certamente aumentada nos núcleos de insetos sujeitos a jejum prolongado, devido à ocorrência de fusões nucleares.

Com métodos de Banda C, reação de Feulgen e coloração com orceína lacto-acética, foram determinados os fenótipos e frequências nucleares em túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de seis gêneros diferentes de triatomíneos. Estes dados possibilitaram determinar que a frequência nuclear, áreas e volumes nucleares dos túbulos de *Triatoma infestans*, *Dipetalogaster maximus* e *Rhodnius prolixus*, estão diretamente correlacionados com o tamanho médio dos insetos e não com a posição dos gêneros na árvore filogenética ou com o número de cromossomos respectivos.

Mais de um fenótipo nuclear, com frequência variando em função do metabolismo do inseto foram detectados somente em *Triatoma infestans*. Em *Panstrongylus lignarius*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma brasiliensis*, o achado de um pequeno cromocentro caracterizando um dos fenótipos nucleares das espécies se deve possivelmente à presença do cromossomo Y heterocromático.

ABSTRACT

Based on nuclear frequency in the Malpighian tubes of 3rd and 5th instar nymphal of *Triatoma infestans* stained with lacto-acetic orcein, it has been demonstrated that in this system polyploidy arises by endomitosis. The polyploidy level is certainly increased in the nuclei of specimens subjected to a long starvation period, due to nuclear fusions.

After a C - banding method, Feulgen reaction and lacto-acetic orcein staining, nuclear phenotypes and frequencies were determined in the Malpighian tubes of 5th instar nymphal of six different triatomid genera. The data allowed us to conclude that the nuclear frequency, and the nuclear areas and volumes of *Triatoma infestans*, *Dipetalogaster maximus* and *Rhodnius prolixus* tubes are directly related to the average size of the insects and not to their chromosome number or their relative position in Usinger's phylogenetic key.

Only *Triatoma infestans* exhibited more than one nuclear phenotype with a frequency varying as a function

of the insect metabolism.

The finding of a small chromocenter characterizing one of the nuclear phenotypes in *Panstrongylus lignarius*, *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma brasiliensis* is very feasibly due to presence of a heterochromatic Y chromosome.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENEKE, G. Application of interference microscopy to biological material. In: WIED, G.L. *Introduction to quantitative Cytochemistry*. New York, Academic, 1966. p. 63 - 92.
- BROWN, Jr, B. W. & HOLLANDER, M. Analysis of the two -sample location problem using ranks. In:----- . *Statistics; a biomedical introduction*. New York, Wiley, 1977. cap.13, p. 327 - 39.
- CARRERA, M. Ordem dos hemípteros. In:----- . *Entomologia para você*. 3. ed. São Paulo, Edart, 1967. p. 56-67.
- DACHS, J.N.W. Análise exploratória. In:----- *Análise de dados e regressão*. Campinas, 1978 p. 5 - 27.
- DIAZ, M.; PAVAN, C. & BASILE, R. Effects of a virus and microsporidian infections in chromosomes of various tissues of *Rhynchosciara angela*. *Revta. bras. Biol.*, 29 : 191 - 206, 1969.

- DOLDER, H. & MELLO, M.L.S. Virus-like particles in the Malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. *Cell Molec. Biol.*, 23 : 299 - 310, 1978.
- GEITLER, L. Die entstehung der polyploiden somatischen zellkerne bei heteropteren durch wiederholte chromosomen - teilung ohne spindelbindung und kernteilung. *Naturwissens - chaften*, 26 : 722 - 3, 1938.
- GEITLER, L. Die entstehung der polyploiden somakerne der heteropteren durch chromosomenteilung ohne kernteilung. *Chromosoma*, 1 : 1 - 22, 1939.
- KUBRUSLY, FLÁVIA S. Ação do cobre e mercúrio sobre a estrutura nuclear e atividade de alguns sistemas enzimáticos. Campinas, 1984. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, (Tese de Mestrado em andamento).
- MELLO, MARIA LUIZA S. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv. hemiptera). *Cytologia*, 36 : 42 - 9, 1971.
- Feulgen - DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Revta bras. Pesq. Méd. Biol.*, 8 (2): 101 - 7, 1975.
- Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero e eucromatinas. Campinas, 1976. 206p. Dissertação - Livre docência. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- & RAYMUNDO, H. H. Change with age of Feulgen - DNA values in the blood - sucking insect, *Triatoma infestans* Klug. *Histochemistry*, 54 : 219 - 23, 1977.

- Computer analysis of stained chromatin on Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) *Mikroskopie*, 34 : 285 - 99, 1978a.
- Heterocromatina. *Ciênc. Cult.*, S. Paulo, 30 (3) : 290 - 303, 1978b.
- Mechanism of polyploidization in the Malpighian tubes of blood - sucking reduviid hemipterans. *Revta bras. Genet.*, 1 (2) : 97 - 102, 1978c.
- & LIMA, M.J.P. Somatic polyploidy in *Rhodnius prolixus* Stahl. *Nucleus*, 21 (1): 39 - 42, 1978.
- & RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in starving blood - sucking hemipterans. *Revta Micros. Elect.*, 5: 298-9, 1978.
- A heterocromatina constitutiva de *Panstrongylus megistus* Burmeister. In: Encontro de Geneticistas Paulistas, 2., São José do Rio Preto, 1979. p. 24 -5. Resumos.
- & RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a blood - sucking hemipteran. *Cytologia*, 45: 203 - 9, 1980.
- ; RODRIGUES, V.L.C.C. & DOLDER, H. Viral infection in blood - sucking hemipterans. *J. submicrosc. Cytol.*, 12: 85 - 93, 1980.
- & VIDAL, B.C. Noções fundamentais de cariometria. In:----- & -----, *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo, Edgard Blucher; Campinas, Funcamp, 1980. cap. 7, p. 35 - 40.

- , Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *Histochem. J.*, 15 : 739 - 51, 1983.
- ; YAMADA, A.T.; FERREIRA FILHO, A.N.; RODRIGUES, V.L.C.C.; GIORGIO, S. & RANDI, M.A.F. Variação em proteínas da hemolinfa e padrões cariotípicos de *P. megistus* de hábito domiciliar e silvestre. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 20 e Congresso da Sociedade Latino-Americana de Medicina Tropical, 1, Salvador, 1984. p. 5. *Resumos*.
- RANDI, M.A.F.; MELLO, M.L.S.; RODRIGUES, V.L.C.C. & FERRAZ - FILHO, A.N. Fenótipos nucleares somáticos em *Panstrongylus megistus* de hábitos domiciliar e silvestre. *Ciênc. Cult.*, S. Paulo, 1984 (no prelo)
- SANDRITTER, W.; KIEFER, G.; SALM, R.; MOORE, G.W.; GRIMM, H. & KIEFER, R. DNA in heterochromatin: Cytophotometric pattern recognition image analysis among cell nuclei in duct epithelium and in carcinoma of the human breast. *Beitr. Path.*, 151 : 87 - 96, 1974.
- SCHEFFÉ, H. The one-way layout. Multiple comparison. In: -----, *The Analysis of variance*. Wiley, 1958. cap.3, p. 69.
- SCHREIBER, G. & PELLEGRINO, J. Eteropicnosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione. *Scientia Genet.*, 3 : 215 - 26, 1950.
- ; CARVALHO, H.C. & ESPINOLA, H.N. Genetics of Triatoma and other vector species. In: WRIGHT, J. W. & PAL, R. *Genetics of insect vectors of disease*. Amsterdam, Elsevier, 1967. p. 441 - 56.

- & PINHO, A.C. Cytogenetics of Triatominae :
caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis
of autosomes. *Revta bras. Biol.*, 32 (2): 255 - 63, 1972.
- SHERLOCK, I.A. Vetores. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z.A.
Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Rio de Janeiro,
Guanabara Koogan, 1979. cap. 2, p. 42 - 88.
- SIMÕES, L.C.G.; AMABIS, J.M. & CESTARI, A. N. Puffs in the
heterochromatin in chromosomes of *Rhynchosciara*. *Ciênc.
Cult.*, S. Paulo. 27 (2) : 159 - 61, 1975.
- & CESTARI, A. N. Cromossomos politênicos: siste-
mas experimentais *in vivo* e *in vitro*. *Ciênc. Cult.*, S.
Paulo, 34 (4) : 480 - 5, 1982.
- SUMNER, A.T.A. A simple technique for demonstrating centro-
meric heterochromatin. *Expl. Cell Res.*, 75 : 304 - 6 ,
1972.
- UESHIMA, N. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae :
Hemiptera) *Chromosoma*, 18 : 97 - 122, 1966.
- USINGER, R.L. The triatominae of North and Central America
and west Indies and their public health significance.
Publ. Hlth. Bull., 288 : 1 - 83, 1944.
- WIGGLESWORTH, V. B. Polyploidy and nuclear fusion in the
fat body of *Rhodnius* (Hemiptera). *J. Cell Sci.*, 2 :
603 - 16, 1967.