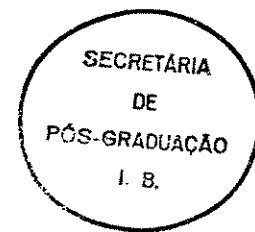


UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Silvana Gisele Pegorin de Campos

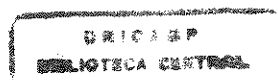
TOLERÂNCIA A CHOQUE FRIO EM
Triatoma infestans KLUG

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Silvana Gisele Pegorin de Campos
e aprovada pela Comissão Julgadora.

27/06/2001

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello



ADL

CHAMADA: UNICAMP

C157t

Ex.

BO BC/ 46122

C. 16-392/01

☐ D ☒

CO 04.11.00

A 17-02-01

CPD

CM00158844-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C157t Campos, Silvana Gisele Pegorin de
Tolerância a choque frio em *Triatoma infestans* klug/Silvana
Gisele Pegorin de Campos. – Campinas, S.P. [s.n.], 2001.
68f: ilus.

Orientadora: Maria Luiza Silveira Mello
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia.

1. Choque frio. 2. Condições nutricionais. 3. Fenótipos nucleares. I. Mello
Maria Luiza Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Data da defesa: 27/ 06/2001

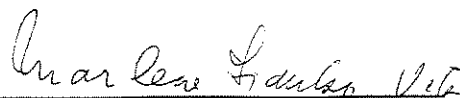
Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello (Orientadora)



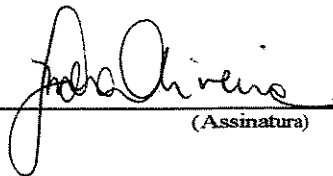
(Assinatura)

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta



(Assinatura)

Profa. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira



(Assinatura)

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder



(Assinatura)

...Se és capaz de arriscar numa única parada
Tudo quanto ganhaste em toda tua vida
E perder e, ao perder, sem nunca dizer nada
Resignado, tomar ao ponto de partida
De forçar coração, nervos, músculos, tudo
E dar seja o que for que neles ainda exista,
E a persistir assim quando, exausto, contudo,
Resta a vontade em ti, que ainda te ordena: Persiste !!

Se és capaz de entre a plebe não te corromperes,
Entre Reis, não perder a naturalidade;
E de amigos, quer bons, quer maus, te defenderes;
Se a todos podes ser de alguma utilidade;
E se és capaz de dar segundo por segundo,
Ao minuto fatal, todo teu valor e brilho,
Tua é a Terra com tudo que existe no mundo,
E – o que ainda é muito mais – és um Homem !!

Se...

Rudyard Kipling,

(Tradução: Guilherme de Almeida)

Aos meus pais,
Fernando e
Amigos

Agradecimentos

A Dra. Maria Luíza pela orientação durante esses dois anos, oportunidade de convívio e dedicação prestados durante a realização desse trabalho.

A banca examinadora: Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder.

Ao departamento de Biologia Celular pela disponibilidade de recursos e local para desenvolvimento do trabalho.

A SUCEN, nas pessoas de Vera Lúcia C. C. Rodrigues e Pedro Ribeiro da Silva pelo fornecimento e manutenção dos insetos e auxílio em experimentos.

A Profa. Dra. Cicília Yuko Wada por ter aceitado e colaborado nas análises estatísticas dos dados.

A Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel pela árdua dedicação dispendida a esse programa de pós-graduação, bem como aos alunos que dele participam.

Ao Prof. Dr. Édson Rosa Pimentel pela disponibilidade e carisma com que trata os alunos desse programa de pós-graduação.

A Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira por todo apoio durante o período de graduação e por ter incentivado meu ingresso nesse programa de pós-graduação.

Aos secretários Lillian e Sidnei pelo carinho, atenção e gentilezas prestadas.

A Simone pela amizade, compreensão e todo o apoio técnico prestados durante a realização desse trabalho.

As companheiras de sempre Cristiani, Júnia, Silvane e Tatiana por ter tornado essa estada em Campinas mais agradável e divertida.

Ao meu pai pelo amor, atenção e incansável incentivo para a conclusão de mais essa etapa.

A minha mãe (*in memoria*) por tudo que sou e por ter me feito entender que o amor é um sentimento eterno, que ultrapassa qualquer barreira física.

Ao Fernando por todo o carinho, paciência e alegria que tem me trazido ao longo desses anos.

Ao Sr. Juvenal e Regina pela compreensão e hospitalidade nesses últimos anos.

A CAPES pela concessão de uma bolsa de estudos.

Índice

Resumo	7
Abstract	10
Introdução	13
Objetivos	24
Artigos submetidos à publicação	26
Effect of sequential cold shocks on survival and molting rate in	27
<i>Triatoma infestans</i> (Hemiptera, Reduviidae)	
Change in nuclear phenotype frequencies after sequential cold	39
shocks in <i>Triatoma infestans</i> (Hemiptera, Reduviidae)	
Conclusões	57
Referências Bibliográficas	60

I. Resumo

Um agente estressor importante em hemípteros reduviídeos é o choque de temperatura. Quando tais insetos são submetidos a este tipo de estresse sofrem alterações em sobrevivência, ocorrência de mudas e fenótipos nucleares, na dependência da temperatura a que são submetidos, da duração do tratamento, das fases do desenvolvimento e do sexo. O presente trabalho teve como objetivos a pesquisa de tolerância a choque frio, avaliada através de alterações na taxa de sobrevivência, ocorrência de muda e fenótipos nucleares dos túbulos de Malpighi, em *Triatoma infestans*, um vetor da doença de Chagas. Como a resposta ao estresse pode ser afetada pelo estado nutricional dos espécimes, esta condição também foi analisada. Foram usadas ninfas de 5º instar, bem-alimentadas e em jejum moderado, submetidas a um choque inicial de 0°C por 1h, e após 8 h ou 24 h (30°C), a um choque de 0°C por 12 h. Como condições controles foram consideradas situações de um único choque de 0°C por 1 h e 12 h. Para análise estatística da incidência de muda foi utilizado o teste não-paramétrico de Log-rank. Para análise fenotípica foram feitas montagens totais dos túbulos de Malpighi 2 e 30 dias pós-choque frio, sendo utilizados órgãos de no mínimo 3 espécimes por condição experimental submetidos à Reação de Feulgen. A relação linear entre os fenótipos nucleares dos espécimes bem-alimentados e em jejum foi avaliada pela correlação de Pearson. Os resultados mostraram que o choque frio a 0°C não promoveu efeitos marcantes na taxa de sobrevivência dos insetos, independente do tempo de duração do choque e do estado de nutrição. Ao se considerar a ocorrência de mudas, os efeitos do choque frio mostraram-se mais significativos e indicaram aquisição de tolerância por parte dos insetos. No grupo alimentado pôde-se observar que a aquisição de tolerância ao frio foi afetada pelo período entre choques sequenciais, enquanto no grupo em jejum a tolerância adquirida permaneceu constante independente do período entre choques. Quanto aos fenótipos nucleares dos túbulos de Malpighi, fenótipos normais, bem como indicativos de sobrevivência (fusão nuclear, descompactação da heterocromatina) e morte celular (apoptose, necrose) ocorreram simultaneamente em todas as condições analisadas. Os fenótipos indicativos de sobrevivência não foram relevantes para aquisição de tolerância ao frio. Com base na diminuição na frequência de apoptose e necrose seguinte a choques frios sequenciais, inclusive sob condição de jejum, a aquisição de tolerância foi demonstrada citologicamente em *Triatoma infestans*. Foi deduzido que o jejum, ele mesmo fator estressante, possa somar efeito de proteção

celular ao induzido por choques frios seqüenciais ou um choque frio único suave. A tolerância de *T. infestans* ao choque frio pode ter dotado esta espécie com vantagens adaptativas considerando-se sua dispersão pela América do Sul. A presença de hsp, glicerol e outros mecanismos, incluindo variação genética em características metabólicas podem estar associados à resposta de tolerância ao frio em *Triatoma infestans*.

II. Abstract

Temperatures shocks are important stressing agents in hemipteran reduviids. When these insects are subjected to heat and cold shocks, alterations in survival, molting rate and nuclear phenotypes are elicited as a function of the temperature, developmental stage and sex. In the present study tolerance to cold shock, estimated through changes in survival rates, molting occurrence and Malpighian tubule nuclear phenotypes were investigated in nymphs of *T. infestans*, vector of Chagas' disease. Since response to stress may be affected by the nutritional state of the specimens, fully-nourished and moderately fasted specimens were analyzed. Immediately after a shock at 0°C for 1 h, the nymphs were returned to control conditions (30°C) and 8 h and 24h later were subjected to a second shock at 0°C. Which lasted 12 h specimens subjected to a single shock at 0°C for 1 h and 12 h were used as controls. The curves of molting were compared statistically using a non-parametric Log-rank test. In terms of phenotypic analysis, whole Malpighian tubule preparations were made two and 30 days after cold shocks. Organs obtained from at least three specimens used for each experimental condition were dissected then subjected to the Feulgen reaction. Pearson product correlation coefficients were used to assess the linear relationship between variables. The results indicated that in terms of insect survival, the cold shock at 0°C did not produce significant effect, regardless of the shock duration and nutritional state of the specimens. In terms of molting rate, the cold shock effects were more significant and indicated cold-tolerance acquisition. In the fully-nourished specimens the cold-tolerance acquisition was affected by the period between shocks. The Malpighian tubule nuclei exhibited normal phenotypes, as well as phenotypes indicative of mechanisms of cell survival (nuclear fusion and heterochromatin unravelling) and cell death (apoptosis and necrosis) occurring concurrently under all situations tested. The phenotypes indicative of mechanisms of cell survival were not relevant for acquisition of the cold-hardening response. Based on decreased frequency of apoptosis and necrosis following sequential cold shocks inclusive under fasting conditions, acquisition of cold-shock tolerance was demonstrated cytologically for *T. infestans*. Since fasting is also a stress factor, the cell protection it induces may be additive to that elicited by sequential cold shocks or a single mild cold shock. The cold-tolerance response in *T. infestans* may have endowed this species with adaptative traits considering its survival in areas of high altitudes and low temperatures in South American. Hsp, glycerol and other protective

mechanisms, including genetic variation in metabolic traits may be associated to the cold-tolerance response in *T. infestans*.

III. Introdução

A doença de Chagas passou a constituir um problema de saúde pública, a partir da domiciliação dos vetores (Silveira e Rezende, 1994). No Brasil, atualmente, existem cinco a seis milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanossoma cruzi* (Ianni, 2000), apesar do controle da transmissão vetorial da doença a partir de 1980, com a virtual eliminação de *Triatoma infestans* por controle químico (Silveira e Rezende, 1994). *Triatoma infestans* é a espécie com maior antropofilia e mais adaptada ao domicílio e, por isso, o mais importante vetor da doença de Chagas no país (Sherlock, 1979; Juarez, 1970; Silveira e Rezende, 1994). A maneira mais importante de transmissão da doença de Chagas ainda é pelo vetor, mostrando a importância do estudo da biologia dos triatomíneos, inclusive como estes reagem frente a diferentes agentes estressores, para planejamentos de controle e criação dos insetos em laboratório (Rodrigues et al., 1991; Silva e Silva, 1993; Garcia et al., 1999; 2001 a, b). Outra consideração de ordem prática a ser feita refere-se à utilização de *Triatoma infestans* em xenodiagnóstico e provas de suscetibilidade a inseticidas (Juarez, 1970).

A resposta das células a uma ação estressora é típica de todos os organismos vivos, desde bactérias ao homem (Alexandrov, 1994) e envolve síntese preferencial e o rápido acúmulo de uma série de proteínas chamadas hsp ("heat shock proteins") ou proteínas de estresse (Hightower e White, 1981; Welch e Feramisco, 1982; Ananthan et al., 1986; Cavicchioli e Watson, 1986; Amaral et al., 1988; Welch, 1993; Komatsu et al., 1996). A resposta parece ser uma função adaptativa e um componente da homeostase celular (Welch, 1993; Alexandrov, 1994). A ativação gênica das hsp é rápida e reversível, resultando em uma transição de níveis de transcrição dificilmente detectáveis em condições normais para taxas extremamente altas durante o estresse (Bienz e Pelham, 1987; Komatsu et al., 1996). Estas proteínas são induzidas por uma ampla variedade de agentes estressores como: temperatura, privação de oxigênio, agentes quimioterápicos, análogos de aminoácidos, inibidores metabólicos, hormônios esteróides, febre, desidratação, entre outros (Ashburner e Bonner, 1979; Hightower e White, 1981; Li e Shrieve, 1982; Amaral et al., 1986; Ananthan et al., 1986; Burdon et al., 1986; Lindquist, 1986; Lepock et al., 1988; Welch, 1993; Yiangou et al., 1997; Tammariello et al., 1999; Jackson et al., 2000). No entanto, parecem exercer funções protetoras gerais, podendo desempenhar um papel no crescimento e desenvolvimento normais (Morimoto e Fodor, 1984; Lindquist, 1986; Bienz e Pelham, 1987; Yiangou et al., 1997), e não sendo exclusivas para condições de estresse (Cavicchioli e Watson, 1986). Dois grupos de hsp

estão presentes nos organismos, as que são expressas constitutivamente, sob condições de crescimento normais e as induzidas, somente em células estressadas (Cheney e Shean, 1983; Lindquist e Craig, 1988; Alexandrov, 1994). Muitos dos genes que codificam hsp são similares em todos os organismos e esta conservação através da evolução demonstra a importância e universalidade de suas funções (Lin et al., 1984; Schlensinger, 1986; Lindquist e Craig, 1988; Welch, 1993). Em relação aos mecanismos de ativação, incluindo seus componentes, constata-se que esses são idênticos entre eucariotos superiores, similares entre eucariotos superiores e inferiores, mas provavelmente completamente diferentes entre procariotos (Bienz e Pelham, 1987).

É bem conhecido que a temperatura tem um efeito fundamental em muitos aspectos da vida de um inseto, desde efeitos diretos sobre a cinética de reações enzimáticas aos limites de funções fisiológicas e comportamentais. Como um grupo, os insetos evoluíram não somente para sobreviver, mas também progredir em uma ampla variedade de ambientes térmicos (Lee e Denlinger, 1991).

Quando hemípteros reduvídeos são submetidos a choques de temperatura, exibem alterações em sobrevivência e em ocorrência de muda, na dependência da temperatura a que são submetidos, duração do tratamento, fases do desenvolvimento e sexo (Rodrigues et al., 1991; Garcia et al., 1999, 2001a, b). Diferentes respostas ao choque hipertérmico e ao choque frio são também observadas conforme a espécie considerada (Dantas e Mello, 1992; Garcia et al., 1999).

Sabe-se que uma breve exposição a temperaturas elevadas conduz todos os organismos a um estado transitório de resistência aumentada ao calor conhecida como termotolerância (Li e Shrive, 1982; Lindquist e Craig, 1988; Carretero et al., 1991; Mosser e Martin, 1992; Yocum e Denlinger, 1994; Nollen et al., 1999). O pré-tratamento pela exposição a temperaturas suaves aumenta a capacidade de sobrevivência dos organismos ao serem submetidos a temperaturas mais severas (letais) (Lin et al., 1984; Cavicchioli e Watson, 1986; Chen et al., 1991; Carretero et al., 1991). A resposta ao choque quente é uma rápida e transitória programação de atividades celulares para assegurar a sobrevivência durante o período de estresse, protegendo componentes celulares essenciais contra danos provocados pelo calor e permitindo rápida retomada das atividades celulares normais durante o período de recuperação (Burdon, 1986). A cinética do desenvolvimento desta resistência acompanha a cinética de síntese de

proteínas de choque térmico (hsp) (Mosser e Martin, 1992; Alexandrov, 1994; Samali e Cotter, 1996; Bienz e Pelham, 1987; Krebs e Feder, 1998).

Existe quase total consenso entre pesquisadores que o acúmulo de proteínas desnaturadas tem sido o gatilho para uma resposta ao estresse. O aumento na quantidade ou síntese de tipos diferentes de hsp, possivelmente, promova proteção contra efeitos letais do calor, auxiliando no reparo das proteínas lesadas (Edington et al., 1989; Chen et al., 1991; Mosser e Martin, 1992; Nollen et al., 1999). Isso leva a crer que algumas hsp desempenham função de chaperonas moleculares (Lindquist, 1986; Alexandrov, 1994; Krebs e Feder, 1998). Hsp das famílias de 60, 70 e 90 kDa são capazes de se ligarem a partes expostas de moléculas protéicas desenroladas ou não-nativas e protegê-las da ação de proteinases (Alexandrov, 1994); outras minimizam a formação de agregados (Krebs e Feder, 1998), ou ainda, eliminam proteínas anômalas com o uso de ubiquitina (Alexandrov, 1994), uma hsp eucariótica (Finley et al., 1987). O número exato de tipos diferentes de hsps varia entre os organismos e tipos de células, mas em todos os casos proteínas de aproximadamente 70 a 84 kDa estão entre as mais proeminentes. A maioria dos organismos produzem também hsp menores, de 15 a 30 kDa (Burdon, 1986; Bienz e Pelham, 1987). As hsp, ubiquitinas e chaperonas exibem propriedades que indicam suas capacidades para facilitar a recuperação de uma célula lesada por estresse. Estas são acumuladas nas células durante o choque e podem conduzir a um reparo mais rápido e completo durante estresses repetidos do que o dano inicial, por estimularem a habilidade reparatória, a qual pode persistir por muitos dias após um choque quente. Entretanto não está claro se a quantidade de ubiquitinas e chaperonas permanece excessiva durante este período (Alexandrov, 1994).

Bienz e Pelham (1987) propuseram um modelo para explicar a ativação dos genes de choque quente. Neste foi inferido que as células contêm uma proteína sensor que normalmente encontra-se em um estado ubiquitinado, porém pode ser desubiquitinada quando o sistema de degradação está sobrecarregado com substrato (proteínas desnaturadas). Esta proteína quando desubiquitinada torna-se ativa e pode então ativar o HSTF (fator promotor de choque quente), ou poderia ser o próprio HSTF, que se liga ao HSE (elemento regulatório do gene de choque quente) e, conseqüentemente, há ativação dos genes de choque quente. A regulação desse mecanismo é feita, aparentemente, por feedback. É conhecido que a transcrição dos genes de choque quente cessa após um certo tempo, mesmo se as condições de choque forem mantidas. De acordo com o

modelo, isso ocorrerá quando a ubiquitina livre torna-se disponível, por meio de síntese ou liberação de proteínas desnaturadas seguintes ao seu reparo ou degradação e, em retorno conduz à inativação do HSTF.

Na maioria dos organismos estudados, a resposta a altas temperaturas e inúmeros outros estresses biológicos é caracterizada por uma rápida transcrição de genes codificadores de proteínas de estresse e, concomitante declínio na transcrição e/ou processamento de genes que estavam ativos antes do insulto ambiental (Findly e Pederson, 1981; Morimoto e Fodor, 1984; Welch e Suhan, 1985; Joplin e Denlinger, 1990). A redução na síntese de proteínas normais é uma consequência do controle traducional que opera nas células que receberam choque quente (Amaral et al., 1988). Enquanto as células são mantidas a altas temperaturas, as hsp continuam sendo os produtos principais da síntese de proteínas e, com o retorno a temperaturas adequadas, o padrão de expressão normal é restaurado, de acordo com o grau de severidade do choque quente precedente (Berger e Woodward, 1983; Lin et al., 1984; Lindquist, 1986).

Há uma relação intrínseca entre a temperatura de indução de hsp e a temperatura do ambiente natural do organismo. Em diferentes seres vivos a resposta ao choque quente é induzida a diferentes temperaturas (Lindquist e Craig, 1988). A resposta parece ser transitória em alguns organismos e mantida em outros, podendo ser influenciada pelo estado metabólico da célula, fases do desenvolvimento e diferenciação (Lindquist, 1986).

Alguns estudos mostram que a correlação entre aquisição e queda de tolerância adquirida e hsp durante e após choque quente nem sempre existe, sugerindo que vários mecanismos estejam envolvidos no desenvolvimento de resistência das células a injúrias repetidas, restringindo assim o envolvimento das hsp nesse processo (Cavicchioli e Watson, 1986; Amaral et al., 1988; Carretero et al., 1991).

No caso de triatomíneos, particularmente em *Panstrongylus megistus*, tem sido sugerido que proteínas de choque térmico estariam envolvidas nos fenômenos de sobrevivência dos insetos ao choque hipertérmico (Rodrigues et al., 1991; Garcia et al., 1999, 2001a).

Mais recentemente tem sido aventado que as proteínas de choque térmico além de participarem na indução de sobrevivência a choque hipertérmico, poderiam também participar na indução de sobrevivência a choque frio, ao lado da ação de crioprotetores conhecidos (Chen et al., 1987; Burton et al., 1988; Komatsu et al., 1996; Garcia et al., 2001b). Komatsu e colaboradores (1996), utilizando células de levedura, têm

demonstrado que um choque quente prévio confere não somente termotolerância, mas também tolerância ao congelamento e à alta pressão hidrostática.

O choque frio, também referido como injúria fria direta, é o estresse imposto por uma breve exposição à baixa temperatura, porém não congelante. Quando o choque é muito severo, o organismo mantém a injúria, que pode resultar em morte (Lee e Denlinger, 1991). Caracteriza-se por uma rápida resposta a uma injúria fria que ocorre em minutos, mesmo em insetos que não enfrentam invernos rigorosos (Chen et al., 1987). É uma resposta que ocorre em insetos ativos na reprodução e alimentação ao longo do ano, sendo distinta do congelamento do inverno, um fenômeno sazonal que geralmente ocorre em estágios de inativação ou diapausa. A resposta à injúria fria ocorre a uma temperatura de 10 a 15°C acima daquela em que os fluidos corporais congelam. Em preparação para o inverno, o processo de congelamento requer dias ou semanas, enquanto que o processo de resfriamento rápido ("cold-hardening") associado ao choque frio envolve somente minutos ou horas (Lee, 1989).

Quando *Drosophila melanogaster* são resfriadas a 5°C, durante 30 minutos, aproximadamente 50% das moscas sobrevivem à exposição por 2 horas a -5°C, porém quando a exposição inicial a 5°C aumenta para 1 hora, a sobrevivência a -5°C alcança 90% (Czajka e Lee, 1990). A exposição da mosca *Sarcophaga crassipalpis* à baixa temperatura também provoca uma resposta protetora que previne injúrias quando esta é submetida ao frio mais severo (Chen et al., 1991). A capacidade de resposta ao resfriamento rápido parece ser comum entre os insetos e age como uma forma de proteção contra o choque frio (Chen et al., 1987), e em um contexto ecológico, é importante para sobrevivência desses insetos em algum período do ano (Czajka e Lee, 1990).

Na mosca *Sarcophaga crassipalpis*, o efeito de proteção ao frio também pode ser estimulado por alta temperatura (36°C), sugerindo que esta possa elicitar o mesmo efeito biológico que temperaturas ao redor de 0°C, embora os mecanismos não sejam necessariamente os mesmos. Sob condições de temperaturas adequadas, a resposta termoprotetora para baixas temperaturas nessa mosca parece ser mais rápida que a resposta para altas temperaturas. Uma outra observação é a de que uma breve exposição ao frio moderado não promove proteção contra o choque quente. A síntese de hsp em resposta ao choque frio difere de sua síntese a altas temperaturas em uma via fundamental. No choque quente, a síntese de proteínas normais é reprimida e a síntese

de hsp é aumentada, enquanto em seqüência ao choque frio, a síntese de proteínas normais prossegue junto com o aumento na produção de hsp (Chen et al., 1991).

O estudo da expressão da proteína nuclear PCNA envolvida com vias do ciclo celular também sugere que certos aspectos das estratégias de resposta aos choques quentes e frios sejam independentes. Em *S. crassipalpis*, 1h de exposição a -10°C diminui a expressão de PCNA, mas 1h de exposição a 45°C não altera os níveis de expressão da proteína (Tammariello e Denlinger, 1998). Em *Drosophila melanogaster* hsp são expressas durante a recuperação ao choque frio longo (Burton et al., 1988), enquanto em *S. crassipalpis* a expressão é mais pronunciada durante a recuperação de uma breve exposição a temperaturas mais severas e a quantidade de hsp aumenta com a severidade do choque frio (Joplin et al., 1990). Apesar de algumas diferenças, a possibilidade de que temperaturas altas e baixas provoquem a expressão das mesmas proteínas de estresse permanece como uma opção viável em *Sarcophaga crassipalpis* (Chen et al., 1991).

A exposição por breve período a 0°C promove também um rápido acúmulo de glicerol na hemolinfa de *S. crassipalpis*, indicando sua participação na resposta crioprotetora contra o choque frio, embora não se descarte a possibilidade de outros mecanismos protetores estarem operando conjuntamente (Chen et al., 1987; Chen e Walker, 1993). O glicerol tem sido encontrado em uma ampla variedade de insetos em todos os estágios do desenvolvimento e em outros artrópodes, estando envolvido na proteção contra injúrias provocadas por choque frio. Alguns solutos que também podem influenciar a resistência ao frio em insetos são aminoácidos livres, íons inorgânicos e açúcares (Zachariassen, 1985). O glicerol age como crioprotetor em espécies tolerantes ao frio e como anticoagulante em insetos susceptíveis ao congelamento (Patterson et al., 1981). Seu acúmulo em uma situação de resfriamento tem a função de abaixar os pontos de supercongelamento e congelamento, uma vez que, por ter baixo peso molecular, penetra membranas celulares e mantém sais em solução, prevenindo os danos por congelamento (Rockestein, 1978; Wigglesworth, 1984). Estudos criobiológicos têm demonstrado que o glicerol pode estabilizar membranas celulares e estruturas proteicas. Uma de suas características é a presença de grupos ligados a hidrogênio (OH, NH_2 , etc.) que, freqüentemente, ligam-se fortemente com a água. Há indícios de que a habilidade de proteção das células contra o congelamento esteja funcionalmente relacionada a estas ligações do hidrogênio. Assim, o glicerol, tem a capacidade de estabilizar as interações

entre solvente e macromoléculas de soluto (Komatsu et al., 1990). Em proteínas intensifica a estrutura ligada ao hidrogênio da água e, conseqüentemente, interações hidrofóbicas (Gekko e Koga, 1983). Para Komatsu et al. (1990), as hsps são também crioprotetores, concordando com a observação geral de que estes agentes sejam estabilizadores de macromoléculas e que aumentem interações hidrofóbicas. Segundo esses autores, muitos estudos têm demonstrado que crioprotetores como o glicerol atuam como protetores durante o choque quente da mesma maneira que atuam frente ao choque frio, estabilizando macromoléculas celulares.

Triatoma infestans apresenta altos níveis de sobrevivência a choque hipertérmico e a choque frio de curta duração (1h). Contudo estes insetos mostram sensível queda de sobrevivência e ocorrência de muda após choque frio de longa duração (12h) (Rodrigues et al., 1991). Em *Panstrongylus megistus*, a tolerância ao choque frio em relação à aquisição de aumento na sobrevivência e incidência de muda tem sido demonstrada, quando choques frios seqüenciais foram administrados (Garcia et al., 2001b) e esta resposta pode estar associada a possível síntese de hsp (Garcia et al., 2001a). No caso de ocorrer síntese de hsp induzida pelo frio em *Triatoma infestans*, é possível que se possa constatar a indução de tolerância a choques frios seguidos nessa espécie de reduvídeo também.

Nos triatomíneos, a maioria dos estudos em células somáticas têm sido realizados em túbulos de Malpighi, os quais apresentam células poliplóides (Mello, 1971, 1975, 1978a). Essas células são binucleadas e, em *T. infestans* contêm estruturas heterocromáticas constitutivas que se associam formando corpos maiores denominados cromocentros (Mello, 1971, 1989). Até o 3º instar ninfal somente um cromocentro aproximadamente circular é observado nos núcleos dos túbulos de Malpighi deste inseto mas, a partir do 4º instar, pode também ser encontrado mais de um cromocentro com formas variadas (Mello, 1971, 1975). Altos graus de ploidia são alcançados por essas células com o progressivo desenvolvimento ninfal (Mello, 1971, 1975, 1978a) estacionando-se a replicação de DNA no fim do 5º instar (Mello e Raymundo, 1980). Em *T. infestans* os núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi alcançam valores Feulgen-DNA de 32C e 64C, quando comparados com os conteúdos de Feulgen-DNA dos núcleos das células reprodutoras masculinas (Mello, 1975, 1978a). A ploidia nesse caso tem sido avaliada por métodos citofotométricos e atribuída a um fenômeno endomitótico (Mello, 1971, 1975, 1978a), baseado na constância do total de núcleos dos

túbulos de Malpighi ao longo da vida do inseto sob condições normais de alimentação (Mello, 1978b). O número máximo de endorreplicações do DNA normalmente encontrado nos núcleos dos túbulos de Malpighi de muitas espécies de reduvídeos é cinco (Mello, 1975, 1978a). No corpo gorduroso do reduvídeo *Rhodnius* sp, bem como nas células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* e *P. megistus*, graus de ploidia muito mais elevados são induzidos por fusão nuclear e celular, se os insetos forem submetidos a condições de jejum (Wigglesworth, 1967; Mello, 1989). Os choques de temperatura induzem nas células dos túbulos variados mecanismos de morte celular, como apoptose e necrose (Mello et al., 2001a), fenômenos estes que constituem dois processos distintos tanto morfológica quanto bioquimicamente (Harmon et al., 1990; Samali e Cotter, 1996; Umansky, 1996; Mello et al., 2001b).

A apoptose corresponde a uma forma controlada de morte celular, com participação ativa da célula no processo (Cotter e Al-Rubeai, 1995; Umansky, 1996), sendo um mecanismo essencial e comum de perda de células que ocorre sobre condições fisiológicas e patológicas (Mosser e Martin, 1992; Kerr et al., 1994). A apoptose é um processo essencial nos tecidos vivos para manutenção de suas arquiteturas e funções (Sakaguchi et al., 1995). A morte celular programada é observada na perda controlada de células durante a metamorfose, diferenciação, e “turnover” celular (Soloff et al., 1987; Fadok et al., 1992; Gerschenson e Rotello, 1992). É importante salientar que embora toda célula tenha este programa genético para cometer “suicídio”, ele permanece normalmente reprimido, até ser engatilhado. Sob condições normais, somente células não mais requeridas por um organismo ativam este programa (Bany et al., 1990; Steller, 1995). A morte apoptótica ocorre em tecidos em resposta a modalidades citotóxicas como: radiação, drogas quimioterápicas, hiper e hipotermia, hormônios esteróides, hormônios antagonistas, entre outros (Wyllie, 1980; Cohen e Duke, 1984; Lindquist, 1986; Lepock et al., 1988; Perotti et al., 1990; Szende et al., 1990; Takano et al., 1991; Mosser e Martin, 1992; Lowe et al., 1993; Kerr et al., 1994; Samali e Cotter, 1996). Ocorre em células individuais de forma assíncrona e, morfológica é caracterizada pelo “encolhimento” celular, condensação cromatínica, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos, que são limitados por membrana, contêm organelas bem preservadas e, normalmente, um componente nuclear. Os corpos apoptóticos são fagocitados por células vizinhas e o evento não está associado à inflamação (Fadok et al., 1992; Gerschenson e Rotello, 1992; Kerr et al., 1994; Umansky, 1996). A principal característica

bioquímica é a fragmentação do DNA internucleossomal por meio de uma endonuclease ainda não identificada (Walker et al., 1989; Martin et al., 1990; Perotti et al., 1990; Kerr et al., 1994; Camby et al., 1995; Samali e Cotter, 1996; Umansky, 1996), dependente de íons cálcio e magnésio e inibida por zinco (Cohen e Duke, 1984; Takano et al., 1991). O aumento na concentração de cálcio citosólico media a ativação da endonuclease em resposta a um número relevante de estímulos (Perotti, 1990). A fragmentação pode ser verificada imunocitoquimicamente ou pelo aspecto em escada do DNA, quando este é submetido à eletroforese em gel de agarose. A clivagem do DNA em estágio inicial pode servir como uma proteção, prevenindo a transferência de material genético potencialmente ativo para células vizinhas quando os corpos apoptóticos são fagocitados (Kerr et al., 1994). O mecanismo bioquímico fundamental de apoptose tem sido conservado durante a evolução desde organismos unicelulares até o homem, genes homólogos que regulam a morte celular estão presentes tanto em nematódeos como no homem (Bar, 1996; Peter et al., 1997; Mello et al., 2001b).

A necrose, ao contrário da apoptose, não é um processo dependente de energia e ocorre somente sob condições de injúrias, como exposição a hipertermia severa, hipóxia ou altas concentrações de substâncias tóxicas (Gerschenson e Rotello, 1992; Mosser e Martin, 1992) e caracteriza-se por um aumento precoce no volume da célula e organelas subcelulares, seguido por autólise (Umansky, 1996). Essas mudanças são atribuídas a perturbações nas membranas que alteram a integridade da barreira da permeabilidade (Helgason et al., 1993). A necrose afeta grupos de células adjacentes e o material citoplasmático liberado freqüentemente desencadeia uma resposta inflamatória (Kerr et al., 1994; Steller, 1995). A degradação da cromatina nuclear é um evento ao acaso mediado por proteases e endonucleases que ganharam acesso ao DNA devido à ruptura osmótica de estruturas celulares internas (Helgason et al., 1993). Em eletroforese essa quebra ao acaso do DNA é identificada como um arrasto (Gerschenson e Rotello, 1992; Mello et al., 2001b).

O nível de estresse é crucial para determinar qual tipo de morte celular a célula irá sofrer (Harmon et al., 1990; Mosser e Martin, 1992; Sakaguchi et al., 1995). Sob altos níveis de estresse, as células morrem por necrose, enquanto que, sob baixos níveis, pode ser desencadeada a morte por apoptose. Em níveis intermediários de estresse, os dois fenômenos podem coexistir (Cotter e Al-Rubeai, 1995; Sakaguchi et al., 1995).

Fenômenos considerados como tentativas de sobrevivência celular como fusão nuclear e celular (Wigglesworth, 1967; Mello, 1983) e descompactação de heterocromatina são também observados em *T. infestans* simultaneamente à apoptose e à necrose, quando os insetos são submetidos a estresse por temperatura ou outros agentes (Álvares-Garcia, 1988; Dantas e Mello, 1992; Mello et al., 1995, 2001a). A fusão nuclear em triatomíneos em jejum aumenta os graus de ploidia ótimos previamente alcançados por endomitose (32C e 64C) (Mello, 1978, 1989; Andrade e Mello, 1987) e, este processo surge provavelmente devido à baixa taxa metabólica celular nessas espécies (Wigglesworth, 1967; Mello e Raymundo, 1980). No corpo gorduroso de *Rhodnius* sp, a fusão de núcleos parece ser um processo lento e depende, inicialmente, do íntimo contato entre dois ou mais núcleos, com a manutenção de seus limites individuais por algum tempo (Wigglesworth, 1967). Em relação à mudança no estado de empacotamento da heterocromatina sob a ação de diferentes estressores, foi verificado que alguns cromocentros alargam-se, aumentando a área esperada em comparação a espécimes bem-alimentados. Esta resposta associada a aspectos ultra-estruturais sugere uma tentativa para ativar genes usualmente silentes (Mello, 1989; Dantas e Mello, 1992; Mello et al., 1995; Mello et al., 2001a). Porém ainda se desconhece se essas zonas heterocromáticas contêm genes para hsp (Mello, 1989; Dantas e Mello, 1992).

Os mesmos fenótipos indicativos de tentativa de sobrevivência celular ocorrem em *Panstrongylus megistus* sob condições semelhantes (Garcia et al., 2000a, b). O choque hipertérmico intensifica nas ninfas de *T. infestans* o processo de apoptose induzido por jejum, especialmente 7 dias após o choque. O aumento significativo de necrose se dá posteriormente à maior incidência de apoptose (14 dias após choque) (Mello et al., 2001a).

No entanto, se desconhece se os mecanismos de morte e de sobrevivência celular em *T. infestans*, expressos segundo padrões fenotípicos nucleares bem conhecidos (Mello, 1971; Dantas e Mello, 1992; Mello et al., 2001a) se alterariam após choques sequenciais de temperatura, em particular, choques frios. Tais dados certamente poderiam ampliar o conhecimento sobre a resposta às condições de estresse nesses insetos em laboratório e melhor elucidar as características biológicas de espécimes capturados na natureza. Os próprios fenômenos de morte celular e sobrevivência celular associados ao estresse poderiam ser melhor compreendidos.

IV. Objetivos

- ✓ Tendo-se em vista os fatos acima relatados, no presente estudo busca-se estabelecer se ocorrem fenômenos de indução à tolerância ao frio em ninfas de 5º estágio de *T. infestans*, seja em termos de sobrevivência dos espécimes, em alteração no seu padrão de muda ou na frequência dos diferentes fenótipos nucleares das células epiteliais de seus túbulos de Malpighi.

- ✓ Como a resposta ao estresse em alguns triatomíneos parece ser afetada pelo estado de nutrição dos espécimes, resultados referentes a insetos bem-alimentados e a insetos em jejum são comparados entre si.

V. Artigos submetidos à publicação

Journal of Medical Entomology
Section: Research Article
Running head: Cold-shock tolerance
in *T. infestans*

Maria Luiza S. Mello Dept. of Cell Biology
UNICAMP, 13083-970 Campinas,
Brazil. FAX: +55-19-3788-7821
E-mail: mlsmello@obelix.unicamp.br

Effect of sequential cold shocks on survival and molting rate in *Triatoma infestans*
(Hemiptera, Reduviidae)

SILVANA P. CAMPOS¹, VERA L.C.C. RODRIGUES³, C.Y. WADA², and MARIA LUIZA S.
MELLO^{1*}

¹Department of Cell Biology, Institute of Biology and ²Department of Statistics, Institute of
Mathematics, Statistics and Computation Science, UNICAMP, 13083-970 Campinas (SP),
Brazil; ³Sucen, 13840-000 Mogi-Guaçu (SP), Brazil

*Corresponding author. FAX: 55-19-3788-7821.

Abstract

The survival and molting incidence in *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease, were investigated following sequential shocks at 0°C in fifth instar nymphs under moderate fasting and full nutritional conditions. The shocks were separated by intervals of 8 h and 24 h at 30°C. The results indicated that in terms of insect survival, *T. infestans* is tolerant to a single cold shock at 0°C even for 12 h, or to sequential cold shocks, regardless of the nutritional state of the specimens. The cold-hardening response in *T. infestans* was much more effective than in *Panstrongylus megistus*, which also belongs to the family Reduviidae. In terms of molting rate, fasting enhanced the tolerance to sequential cold shocks, but did not to exceed the tolerance acquired by fully-nourished specimens, except when cold shocks were separated by an 8 h interval at 30°C. The protective action elicited by fasting was assumed to be additive to that induced by a single mild cold shock or sequential cold shocks. The cold-tolerance response of *T. infestans* may have favoured its survival in areas of South America with low temperatures, although this species is predominantly associated with human habitats.

KEY WORDS: *Triatoma infestans*, nutritional conditions, cold-shock tolerance, sequential shocks, survival, molting rate

Introduction

The survival, molting incidence and chromatin supraorganization of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus*, blood-sucking hemipteran vectors of Chagas' disease, are affected by stressing agents, including heat and cold shocks (Rodrigues et al. 1991, Dantas and Mello 1992, Mello et al. 1995, Garcia et al. 1999, 2000). These insect species differ in nuclear characteristics (Mello 1971, 1975, Mello et al. 1986) and in their response to heat and cold shocks (Rodrigues et al. 1991, Garcia et al. 1999), with *P. megistus* being less resistant to prolonged heat (40°C) and cold (0°C) shocks than *T. infestans* (Rodrigues et al. 1991, Garcia et al. 1999).

Thermotolerance following sequential heat shocks and tolerance to sequential cold shocks (i.e., an acquired increase in survival and molting incidence) have been reported in *P. megistus* (Garcia et al. 2001a, b). Cold-shock tolerance in insects has been suggested to involve the synthesis of heat-shock or other proteins, as well as the presence of cryoprotectants and improved use of metabolic energy resources (Clark and Fucito 1998). There is no evidence of cryoprotectant use in blood-sucking hemipterans. However, the synthesis of heat-shock proteins during the cold-shock tolerance response has been suggested for *P. megistus* (Garcia et al. 2001a).

Since no generalization can be made about the responses of different species of the same family to temperature shocks (Clark and Fucito 1998), and since *T. infestans* and *P. megistus* differ from each other in several aspects, including their responses to heat and cold shocks, it is possible that *T. infestans* may respond differently to sequential cold shocks compared to *P. megistus*. This response may be affected by the state of nourishment of the insects (Garcia et al. 1999).

In the present study, survival and molting incidence were investigated in *T. infestans* after sequential cold shocks under different conditions of nourishment and the responses compared to those of *P. megistus* (Garcia et al. 2001a).

Materials and Methods

Fifth instar nymphs of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) reared at 30°C and 80% relative humidity in the laboratory at Sucen (Mogi-Guaçu, SP) were used.

The insects were fed once a week on hen blood. Some specimens were fasted for up to 15 days before and up to 30 days after the shocks.

Immediately after a shock at 0°C for 1 h, the nymphs were returned to control conditions and 8 h and 24 h later were subjected to a second shock at 0°C which lasted 12 h. The temperature of 0°C was chosen based on a previous report (Rodrigues et al. 1991).

Nymphs maintained at 30°C, a temperature traditionally used for rearing *T. infestans* in the insect facilities at Sucen since 1980 (Rodrigues et al. 1991)(control #1), as well as nymphs subjected to a single shock at 0°C for 1 h (control #2) or 12 h (control #3) were used as controls.

After the shocks, the nymphs were returned to the control temperature (30°C) and monitored daily for 32 days to score the survival rate and molting incidence.

The molting rates and curves were compared statistically using a non-parametric log-rank test (Collet 1994). The log-rank test used was considered efficient for comparisons when the functions expressing the absence of molting in the various groups were proportional, and their resulting curves did not cross. When the resulting curves crossed, the χ^2 test was used to compare the presence and absence of molting.

Results

The survival rate of the nymphs subjected to a single short (1 h, control #2) or long (12 h, control #3) shock at 0°C or to sequential shocks at 0°C interspersed by an 8- or 24-h period at 30°C did not differ from each other or from that of the non-shocked nymphs (control #1), regardless of the nutritional condition of the specimens (Table 1).

Similarly, the molting rate of fully-nourished insects subjected to a single short or long shock did not differ from each other or from that of the non-shocked insects. There was no significant difference in the molting rate of fully-nourished nymphs after sequential shocks, compared to that after a single shock (Table 2). Although there was an apparent increase in the molting incidence 32 days after sequential shocks when the period between shocks was 24 h (Table 1), and the resulting p-value for the log-rank test was significant for the comparison of this condition with control #3 (Table 2), the resulting curves for the lack of molting in these groups crossed (data not shown), and the p-value for the χ^2 test was not significant (Table 2).

In all cases, the molting started earlier in the fasted specimens (Table 3), which also showed a larger variability in molting time molting when compared with fully-nourished specimens (Table 3).

Fasting increased significantly the incidence and rate of molting after a single short cold shock, but decreased these parameters after a single long cold shock, when compared with the state of full nourishment (Tables 1 and 4). A cold-shock tolerance response induced in the fasted specimens by sequential cold-shock treatment was detected as an increase in the molting rate values compared with those after a single long shock (Tables 1 and 2). However, values comparable to those obtained after the single one-hour shock were not attained (Tables 1 and 2). The molting rates attained after the sequential shocks were the same in the fasted specimens, regardless of the time between shocks (Tables 2 and 4). The molting rate after a 24 h period between shocks did not vary with the nutritional condition of the nymphs (Table 4).

Discussion

T. infestans was tolerant to cold shock at 0°C for up to 12 h. This response was not affected by sequential cold shocks or the nutritional state of the specimens, and differed from that of *P. megistus*, a blood-sucking hemipteran of the same family as *T. infestans* and with a wide geographical distribution in Brazil (Forattini 1980). Less than 10% of fifth instar *P. megistus* nymphs survive 30 days after a single 12 h shock at 0°C, although cold tolerance is acquired when the specimens are subjected to sequential cold shocks (Garcia et al. 2001). The cold-hardening response of *T. infestans* may have facilitated the successful survival of this species at altitudes up to 7000 m in the Andes mountains (Usinger et al. 1966) and its spread throughout regions of South America with seasonally low temperatures, besides adaptation to Neotropical areas of this continent, particularly in association with human distribution and habitats.

Although survival was not affected by the cold-shock treatments, molting occurred earlier in moderately fasted fifth instar nymphs exposed to single or sequential cold shocks and varied in time when compared to fully-nourished specimens. Fasting enhanced the tolerance to sequential cold shocks (reflected in the molting rates) but not beyond that acquired by fully-nourished specimens, except when the period at 30°C between cold shocks was short (8 h). A specific time at 30°C, between cold shocks, was not found to

induce enhancement in molting rate compared to the rate obtained after the single cold shock for 12 h in fully-nourished nymphs. In fasted specimens, the 8 h and 24 h intervals allowed the insects to supercede the tolerance level obtained with a single drastic cold shock, in a manner similar to fasted *P. megistus* nymphs (Garcia et al. 2001a). However, the change in molting rate caused by sequential cold shocks in *P. megistus* was much less marked than in *T. infestans* (Garcia et al. 2001a). Since fasting is also a stress factor, the cell protection it induces may be additive to that elicited by sequential cold shocks or a single mild cold shock.

Hsp and other protective mechanisms may operate concurrently to induce the cold-hardening response in *P. megistus* (Garcia et al. 2001a). These mediators may also be responsible for the cold-shock hardening response in *T. infestans*, in which the ability to survive low temperatures is more developed and probably was more efficiently selected for this species (Chen and Walker 1993). The divergent responses to sequential cold shocks in *T. infestans* and *P. megistus* also agree with the idea that genotypes may respond differently to environmental stress by varying their regulation of energy metabolism. This variation in response to stress may be important in maintaining genetic variation in metabolic traits (Clark and Fucito 1998).

Acknowledgments

This study received financial support from the Brazilian research foundations CAPES, FAPESP (São Paulo State Foundation for Research, grant no. 99/02547-8), and CNPq (Brazilian National Council for Research and Development).

References Cited

- Chen, C. P., and V. K. Walker. 1993. Increase in cold-shock tolerance by selection of cold resistant lines in *Drosophila melanogaster*. *Ecol. Entomol.* 18: 184-190.
- Clark, A. G., and C. D. Fucito. 1998. Stress tolerance and metabolic response to stress in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 81: 514-527.

- Collet, D. 1994. Modelling survival data in medical research. Chapman & Hall, London.
- Dantas, M. M., and M.L.S. Mello. 1992. Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. Rev. Bras. Genét. 15: 509-519.
- Forattini, O. P. 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. Rev. Saúde Públ. 14: 265-299.
- Garcia, S. L., V.L.C.C. Rodrigues, N. L. Garcia, A. N. Ferraz Filho, and M.L.S. Mello. 1999. Survival and molting incidence after heat and cold shocks in *Panstrongylus megistus* Burmeister. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94: 131-137.
- Garcia, S. L., M.L.S. Mello, V.L.C.C. Rodrigues, and N. L. Garcia. 2000. Nuclear phenotype changes after heat shock in *Panstrongylus megistus* (Burmeister). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95: 271-277.
- Garcia, S. L., N. L. Garcia, V.L.C.C. Rodrigues, and M.L.S. Mello. 2001a. Effect of sequential cold shocks on survival and molting incidence in *Panstrongylus megistus* (Burmeister) (Hemiptera, Reduviidae). Cryobiology (in press).
- Garcia, S. L., M.L.S. Mello, N. L. Garcia, and V.L.C.C. Rodrigues. 2001b. Experimentally induced heat-shock tolerance in *Panstrongylus megistus* (Burmeister) (Hemiptera, Reduviidae). J. Med. Entom. (in press).
- Mello, M.L.S. 1971. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv., Hemiptera). Cytologia 36: 42-49.
- Mello, M.L.S. 1975. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. Rev. Brasil Pesq. Méd. Biol. 8: 101-107.
- Mello, M.L.S., M.A.F. Randi, S. Giorgio, A. N. Ferraz-Filho, V.L.C.C. Rodrigues, E. O. Rocha-e-Silva, and J. A. Cordeiro. 1986. Number of chromosomes, Feulgen-DNA

content and nuclear phenotypes in domestic and wild specimens of *Panstrongylus megistus*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 80: 641-648.

Mello, M.L.S., F. S. Kubrusly, M.A.F. Randi, V.L.C.C. Rodrigues, and A. N. Ferraz Filho. 1995. Effects of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. Entomol. Exp. Appl. 74: 209-218.

Rodrigues, V.L.C.C., M.L.S. Mello, A. N. Ferraz Filho, and M. M. Dantas. 1991. Sobrevivência e ocorrência de muda em *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) após choque de temperatura. Rev. Saúde Públ. 25: 461-467.

Usinger, R. L., P. Wygodzinsky, and R. E. Ryckman. 1966. The biosystematics of Triatominae. Ann. Rev. Entomol. 11: 309-330.

Table 1. Survival and molting incidence (%) in 5th instar nymphs of *T. infestans* 32 days after sequential cold shocks.

Experimental condition	Survival (%)		Molting incidence (%) [*]	
	N	F	N	F
Control #1, 30°C	96	100	80	-
Control #2, a single shock at 0°C (1h)	98	100	72	98
Control #3, a single shock at 0°C (12 h)	100	98	76	52
Time (h) at 30°C between shocks				
8	100	100	66	82
24	96	100	88	86

n, 50; F, fasted nymphs; N, fully-nourished specimens; *, $\chi^2 = 39.82$, d.f. = 7 (control #1 not included; p = 0.001).

Table 2. Comparison of the molting rates of cold-shocked nymphs of *T. infestans*

Nutrition	Conditions Compared			Log-rank test		χ^2 test	
	control (0°C, h)	Intervals at 30°C between shocks (h)		log-rank	p-value	χ^2 value	p-value
	1	12	8	24			
Full	X	X			0.16	0.68	0.20
	X		X		1.34	0.25	0.42
	X			X	2.53	0.11	2.95
		X			0.72	0.40	1.21
	X			X	5.23	0.02*	1.62
			X	X	8.58	<0.01**	5.48
Fasting	X	X			29.69	<0.01**	28.21
	X		X		6.21	0.01**	7.11
	X			X	5.18	0.02*	4.89
		X			9.46	<0.01**	10.17
	X			X	11.36	<0.01**	13.51
			X	X	0.14	0.71	0.29

* , significant, ** highly significant

Table 3. Summary statistics regarding molting incidence along a 32-day period after sequential cold shocks

Treatments	Nutritional state	Molting incidence time (days)			
		Average	Standard error	Minimal	Median
Control #2	N	24.8	0.7	15.	26.
Control #3	N	26.1	0.6	18.	26.
Time (h) at 30°C between shocks					
8	N	26.3	0.6	16.	28.
24	N	23.6	0.7	15.	22.
Control #2	F	17.4	0.9	4.	17.5
Control #3	F	23.1	0.9	4.	28.
Time (h) at 30°C between shocks					
8	F	20.1	1.1	4.	20.
24	F	20.2	1.	7.	19.

n, 50; F, fasting; N, fully nourishment; #2, a single shock at 0°C (1 h); #3, a single shock at 40°C (12 h)

Table 4. Effect of the nutritional state of *T. infestans* nymphs on the cold-shock response expressed as molting rate.

Items compared under full nourishment vs fasting conditions	Log-rank test		χ^2 test†	
	log-rank value	p-value	χ^2 value	p-value
Control, a single shock at 0°C (1 h)	33.29	0.0001*		
Control, a single shock at 0°C (12 h)	0.31	0.5800	6.25	0.0124*
Time (h) at 30°C between shocks				
8	13.78	0.0002*		
24	3.65	0.0558		

*, highly significant; †, values cited only when more efficient than the log-rank values since the resulting curves for absence of molting crossed

Change in nuclear phenotype frequencies after sequential cold shocks in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae)

Silvana P. de Campos¹, Vera Lúcia C. C. Rodrigues² and Maria Luiza S. Mello^{1*}

¹Department of Cell Biology, Institute of Biology, UNICAMP, 13083-970 Campinas (SP), Brazil; ²SUCEN, 13840-000 Mogi-Guaçu (SP), Brazil

*Corresponding author: FAX: 55-19-3788-7821

Short title: Nuclear phenotypes after sequential cold shocks

Abstract

Nuclear phenotypes of Malpighian tubule cells of 5th instar nymphs of *Triatoma infestans*, vector of Chagas' disease, were studied following sequential shocks at 0°C, separated by intervals of 8 and 24 h at 30°C, under moderate fasting and full nourishment conditions. Since nuclear phenotypes are affected in this species by single cold shocks, it was expected that they could be additionally changed after sequential shocks, mainly because the insect's biology responses to sequential cold shocks may change in comparison to that following single shocks. Nuclear phenotypes indicative of cell survival mechanisms (nuclear fusion and heterochromatin unravelling) and cell death (apoptosis and necrosis) were observed in all tested conditions to occur concurrently. Nuclear fusion and heterochromatin unravelling were not found relevant for presumed acquisition of the cold-hardening response in *T. infestans*. Acquisition of cold-shock tolerance was demonstrated cytologically for *T. infestans*, based on decreased frequency of apoptosis and necrosis following sequential cold shocks including under fasting conditions.

Key words: cold shocks – sequential shocks – nuclear phenotypes – *Triatoma infestans*

Introduction

Triatoma infestans, a blood-sucking insect, is one of the most important vectors of Chagas' disease. Survival, molting rate and chromatin supra-organization are affected in this species by stressing agents such as fasting, gamma-radiation, heavy metals and temperature shocks (1, 4, 7, 11, 13, 14, 15).

In terms of insect survival, *T. infestans* is tolerant to a single shock at 0°C up to 12h, or to sequential cold shocks, regardless of the nutritional state of specimens (4). The cold-hardening response in *T. infestans* may have favoured its survival in South American areas under low temperatures, although this insect relocates predominantly in association with human habitats (4).

In terms of molting rate, *T. infestans* nymphs may be affected by cold shocks as a function of the nutritional state of the specimens. Fasting enhances tolerance to sequential cold shocks, in comparison with full nourishment states, provided the interval range at 30°C between sequential shocks at 0°C is no longer than 8 h (4).

Single cold shocks at 0°C for 1 h or 12 h induce change in nuclear phenotypes in the Malpighian tubules of *T. infestans* (7). While in this species nuclei normally show a single or several conspicuous chromocenters represented by heterochromatic A, B, and C autosomes plus sexual chromosomes, phenotypes indicative of cell survival (unravelling heterochromatin, nuclear and cell fusion) and cell death (apoptosis, necrosis) strategies are concurrently observed especially in response to stress (7, 14).

Since *T. infestans* Malpighian tubule nuclear phenotypes are affected by single cold shocks, changes in nuclear phenotype frequencies are also expected to be elicited by sequential cold shocks, even because although this insect's survival is practically unchanged after sequential cold shocks, the same is not true for the insect's molting rate (4). Here we analyzed the effect of sequential cold shocks on nuclear phenotypes of Malpighian tubules of *T. infestans* under fasting and fully-nourished states.

Materials and Methods

Fifth instar nymphs of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) reared at 30°C and 80% relative humidity in the laboratory were used. Specimens fed once a week on

hen blood and specimens fasted for as long as 15 days before the shocks, through 30 days after the shocks, were compared.

Immediately after a shock at 0°C for 1 h the insects were returned to 30°C; 8 h and 24 h later they were subjected to an additional shock at 0°C which then lasted 12 h. The temperature of 0°C was chosen on the basis of previously reported results (4, 15). Nymphs subjected to a single shock at 0°C for 1 h and 12 h were controls 1 and 2. Description of data for nymphs maintained at 30°C, a condition traditionally used for rearing *T. infestans* in the laboratory since 1980 (15), has been previously reported (7).

Following shocks the nymphs were returned to the temperature of 30°C. Malpighian tubule preparations were made two and 30 days after single or sequential cold shocks. Organs from at least three specimens were used for each item tested.

Whole Malpighian tubules were mounted on glass slides, fixed in ethanol-acetic acid (3:1, v/v) for one minute, rinsed in 70% ethanol for 5 min, and air dried at room temperature. The material was then subjected to the Feulgen reaction, with hydrolysis in 4 N HCl at 25°C for 65 min. The Feulgen-stained material was rinsed in sulfurous and distilled water, air dried, cleared in xylene, and mounted in Canada balsam.

The total number of Feulgen-stained Malpighian tubule epithelial cell nuclei as well as of the different nuclear phenotypes identified were counted in each specimen. Photomicrographs were obtained using a Zeiss Axiophot 2 (Oberkochen, Germany) microscope.

Pearson product moment correlation coefficients were used to assess the degree of linear relationship between multiple columns of variables at the same time (correlation matrix) for fully-nourished and moderately fasted specimens (Minitab™ software (State College, USA)). Correlation values significant at $P < 0.05$.

Results

The most usual nuclear phenotypes present in *T. infestans* contained one or several heterochromatic bodies (chromocenters) amidst euchromatin (Figs. 1 and 2) regardless of cold shock, nutritional state or time following shock.

As regards altered nuclear phenotypes, apoptotic nuclei (Figs. 3 and 4), nuclei suspected of apoptosis (Fig. 5), necrotic nuclei (Fig. 6), nuclei with heterochromatin decondensation (Fig. 7) and giant nuclei (Figs. 8 and 10) were observed. In some cases

giant nuclei were found with signs of necrosis or apoptosis (Figs. 5, 9, 11 and 12). The apoptotic nuclei showed evenly distributed condensed chromatin; sometimes apoptotic vesicles were present. Nuclei suspected of apoptosis were those in which euchromatin stained with the Feulgen reaction as deeply as heterochromatin, showing a chromatin condensation pattern similar to that which in other cell systems show a decrease in Feulgen-DNA amounts preceding the drastic DNA losses typical of the advanced stage of apoptosis (Fig. 5). The necrotic nuclei showed various steps of nuclear disruption. Heterochromatin decondensation affected the chromocenters totally or partly. The giant nuclei are generated by nuclear and/or cell fusion (Fig. 8) (11).

Since individual variation in number of nuclei is common in the Malpighian tubules of reduviids (2, 7, 13), the individual frequencies of total nuclei and specific nuclear types are reported (Tables 1-4).

In all cases the most frequent nuclei were those with normal phenotypes, followed by necrotic nuclei. The latter were significantly more frequent under moderate fasting in specimens examined 2 days after shocks (positive correlation, $P = 0.04$) (Table 5), but decreased thereafter (non significant correlation) (Table 6). The total number of nuclei did not decrease significantly with fasting (Tables 5 and 6).

Apoptosis was rarely found in the various groups analyzed, especially in insects 30 days after shocks (Tables 1-4). Only in a few specimens the apoptotic nuclei represented $\geq 0.20\%$ of total cell nuclei (Table 1 - insect codes I_4 and I_{15} ; Table 2 - insect code I_{17}). Giant nuclei and nuclei with unravelling heterochromatin were also rarely found in the various groups. The frequency of nuclei with unravelling heterochromatin was not significantly affected in the various experiments (Tables 5 and 6).

When comparing the frequency of apoptosis and of suspected apoptosis under the various situations tested, a significant decrease was demonstrated with advancing time after shocks (negative correlation, significant at $P = 0.05$ and $P = 0.00$, respectively) (Table 6). Apoptosis in normal-sized nuclei was significantly correlated to frequency of giants with necrotic morphology or suspected of apoptosis following cold shocks ($P = 0.00$) (Tables 5 and 6). No correlation of total number of nuclei or a specific nuclear phenotype with the sequential cold shock condition, or time at 30°C between shocks could be demonstrated statistically, considering the periods of 2 and 30 days after shocks (Tables 5 and 6).

When comparing the various conditions tested, a significant decrease in number of necrosis and of total nuclei was found after single shocks (negative correlation significant at

P, 0.04) (Table 6). Only necrosis was correlated positively (P 0.04) with the fasting state and with total number of nuclei (P 0.03), when examining cell nuclei 2 days after cold shocks (Table 5). With advancing time after shocks the frequency of necrosis decreased significantly (negative correlation significant at P 0.00) (Table 6).

Discussion

Normal nuclear phenotypes as well as nuclear phenotypes indicative of mechanisms of cell survival (nuclear fusion and heterochromatin unravelling) (11, 14, 17) and cell death (apoptosis and necrosis) occurring concurrently were found in the Malpighian tubules of *T. infestans* under all tested situations. These phenotypes had been reported previously after single cold shocks (7) and heat shocks (7, 14) as well as under other stress conditions like gamma radiation, long fasting periods, and heavy metals (1, 11, 13). When considering heat shock tests, heterochromatin unravelling was more relevant for cell survival in fully-nourished nymphs, whereas nuclear and cell fusions were more important in fasted specimens (14). In the present study neither nuclear and/or cell fusion or heterochromatin unravelling were found relevant for acquisition of the cold-hardening response.

Nuclear fusion which generates giant nuclei in several reduviid species, especially after long fasting periods (2, 11, 12, 17), was found to increase 30 days following sequential cold shocks in fasted *T. infestans* specimens. Even so, presence of giant nuclei was occasional and not to the extent of affecting significantly the total number of nuclei estimated under fasting plus cold shock conditions. Whether cell/nucleus fusion was induced as part of a cold-hardening response in *T. infestans*, it was not an efficient mechanism, since many giant nuclei exhibited cell death morphologies.

As regards heterochromatin unravelling, it was not elicited significantly as a surviving strategy following cold shocks. Probably, heterochromatin unravelling is not even required for cell survival following cold shocks in *T. infestans*, differing from the situation in *Panstrongylus megistus*, a reduviid species which is more sensitive to cold shock, which presents a significant increase in heterochromatin decondensation following stress by this agent and acquires cold-shock tolerance following sequential cold shocks (8, 9, 10).

Apoptosis and necrosis are cell death forms recognized in the Malpighian tubules of reduviids by typical morphological aspects (7, 9, 13, 14). In the present study, the apoptosis incidence was low, especially following sequential cold shocks, regardless of the number

and duration of the shocks, interval at 30°C between shocks, and nutritional conditions. A significant decrease in apoptosis frequency was demonstrated when extending time following shocks to 30 days. This is assumed to be related to the cold-tolerance response developed by *T. infestans*.

Additionally, necrosis, a form of cell death promoted by severe cell damage, was observed in all specimens analyzed in this investigation. It is thus assumed that cold shocks promote a certain injury to the Malpighian tubule cells of *T. infestans*, which is more extensive in specimens bearing a larger nuclear frequency. However, necrosis increased only in fasted specimens, two days after the sequential shocks, but not thereafter. Consequently, fasting was also not capable of eliciting increase in necrosis frequency.

Acquisition of cold-shock tolerance was thus proven cytologically in *T. infestans* in terms of the decreased frequency of cell death forms following sequential cold shocks even under fasting conditions. Indeed, in terms of insect survival, *T. infestans* is tolerant of single or sequential shocks at 0°C regardless of the specimens nutritional state, whereas in terms of molting rate, fasting elicits a protective action in addition to that induced by cold shock (4).

Tolerance of *T. infestans* to cold shocks may have endowed this species with abilities which facilitated its survival at low temperatures at altitudes up to 7000m in the Andes mountains (16) and subsequently its spread throughout regions of South America with seasonally low temperatures (4). Selection based on the ability of this species to survive low temperatures may have occurred (3, 5). Involvement of heat-shock proteins and other mechanisms including genetic variation in metabolic traits (6) may be responsible for the cold-hardening response in *T. infestans*.

Differing from the decrease in total number of nuclei in Malpighian tubules of *T. infestans* submitted to very long fasting periods (11), the present results showed unaffected frequency of total nuclei with fasting, which is probably related to the relatively moderate state of this physiological condition as used here.

References Cited

1. Álvares-Garcia, R. S. Efeitos da radiação gama sobre fenótipos nucleares de alguns tipos celulares de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). Masters Thesis, UNICAMP, Campinas, (1988).

2. Andrade, C. G. T. J., and Mello, M. L. S. Phenotypes and number of Malpighian tubule nuclei in *Triatoma infestans* Klug along development and starvation. *Rev. Bras. Genet.* **10**, 449-457 (1987).
3. Burton, V., Michel, H. K., Young, P. and Petersen, N. S. Heat shock protein against cold stress of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* **8**, 3550-2 (1988).
4. Campos, S. P., Rodrigues, V. C. C., Wada, C. Y., and Mello, M. L. S. Effect of sequential cold shocks on survival and molting rate in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). Subm. for publication (2001).
5. Chen, C. P., and Walker, V. K. Increase in cold-shock tolerance by selection of cold resistant lines in *Drosophila melanogaster*. *Ecolog. Entomol.* **18**, 184-190 (1993).
6. Clark, A. G., and Fucito, C. D. Stress tolerance and metabolic response to stress in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **81**, 514-527 (1998).
7. Dantas, M. M. and Mello, M. L. S. Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. *Rev. Brasil. Genetic* **15** (3), 509-19 (1992).
8. Garcia, S. L., Rodrigues, V. L. C. C., Garcia, N. L., Ferraz Filho, A. N., and Mello, M. L. S. Survival and molting incidence after heat and cold shocks in *Panstrongylus megistus* Burmeister. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**(1), 131-137 (1999).
9. Garcia, S. L., Mello, M. L. S., Garcia, N. L., and Rodrigues, V. L.C.C., Changes in nuclear phenotypes following cold shock in *Panstrongylus megistus* (Burmeister). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**(6), 893-898 (2000).
10. Garcia, S. L., Garcia, N. L., Rodrigues, V. L. C. C., and Mello, M. L. S. Effect of sequential cold shocks on survival and molting incidence in *Panstrongylus megistus* (Burmeister) (Hemiptera, Reduviidae). *Cryobiology* (in press) (2001).
11. Mello, M. L. S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. Bras. Genet.* **12**, 485-498 (1989).
12. Mello, M. L. S., and Raymundo, H. H. Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a blood-sucking hemipteran. *Cytologia* **45**, 203-209 (1980).
13. Mello, M. L. S., Kubrusly, F. S., Randi, M. A. F., Rodrigues, V. L. C. C. and Ferraz Filho, A. N. Effects of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. *Entomol. Exp. Appl.* **74**, 209-218 (1995).
14. Mello, M. L. S., Tavares, M. C. H., Dantas, M. M., Rodrigues, V. L. C. C., Maria, S. S., Campos, S. P., and Garcia, N. L. Cell death and survival alterations in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* following heat shock. Subm. for publ. (2001a).

15. Rodrigues, V. L. C. C., Mello, M. L. S., Ferraz Filho, A N., and Dantas, M. M. Sobrevivência e ocorrência de muda em *Triatoma infestans* Klug (Hemíptera, Reduviidae) após choque de temperatura. *Rev. Saúde Públ.* **25**, 461-7 (1991).
16. Usinger, R. L., Wygodzinsky, P., and Ryckman, R. E. The biosystematics of Triatominae. *Ann. Rev. Entomol.* **11**, 309-330 (1966).
17. Wigglesworth, V. B. Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of *Rhodnius* (Hemíptera). *J. Cell. Sci.* **2**, 603-616 (1967).

Table 1. Absolute frequencies of nuclear phenotypes in Malpighian tubule epithelial cells of full nourished *T. infestans* nymphs 2 days after sequential cold shocks at 0°C.

Experimental conditions	Insect code	Nuclear Phenotypes								Total
		A	A _s	NE	G	G _{NE}	G _s	HD	N	
Control 1, one single 1h shock	I ₁	1	146	855	3	2	7	43	8237	9294
	I ₂	0	202	759	6	0	5	53	6560	7585
	I ₃	0	189	1163	0	0	0	41	6767	8160
	I ₄	18	324	627	6	0	15	37	6991	8018
	I ₅	0	221	1230	0	0	17	50	5654	7172
Control 2, one single 12h shock	I ₆	0	581	808	1	0	5	26	7666	9087
	I ₇	0	209	623	0	0	0	27	5135	5994
	I ₈	1	217	424	2	5	59	20	8065	8793
	I ₉	3	133	896	7	2	11	23	6642	7717
Time (h) at 30°C between shocks										
8	I ₁₀	0	231	740	0	0	4	28	4340	5343
	I ₁₁	0	362	369	0	0	6	50	7722	8509
	I ₁₂	0	409	725	0	0	2	84	7430	8650
24	I ₁₃	0	265	1437	4	0	5	33	8273	10017
	I ₁₄	4	182	955	29	11	56	26	6779	8042
	I ₁₅	15	276	1143	8	2	30	58	5963	7495

A, apoptosis; A_s, suspected apoptosis; G, giant nuclei; G_{NE}, necrotic giant nuclei; G_s, giant nuclei with suspected apoptosis; HD, heterochromatin decondensation; N, normal; NE, necrosis.

Table 2. Absolute frequencies of nuclear phenotypes in Malpighian tubule epithelial cells of fasted *infestans* nymphs 2 days after sequential cold shocks at 0°C.

Experimental conditions	Insect code	Nuclear Phenotypes								Total
		A	A _s	NE	G	G _{NE}	G _s	HD	N	
Control 1, one single 1h shock	I ₁₆	2	63	944	4	0	0	14	7956	8983
	I ₁₇	20	349	1507	4	27	97	39	4924	6967
	I ₁₈	3	313	1823	0	0	0	40	8368	10547
	I ₁₉	0	454	1720	0	0	0	73	6732	8982
	I ₂₀	6	216	572	4	12	34	7	5561	6412
Control 2, one single 12h shock	I ₂₁	3	318	736	13	6	26	27	5339	6468
	I ₂₂	0	256	494	7	0	7	25	5423	6212
	I ₂₃	0	549	1705	0	0	0	30	7697	9981
	I ₂₄	4	168	922	0	3	28	18	3080	4223
	I ₂₅	2	432	630	0	0	0	23	7592	8678
Time (h) at 30°C between shocks										
8	I ₂₆	2	432	1702	5	0	0	24	5446	7611
	I ₂₇	2	449	1857	0	0	1	13	6752	9074
	I ₂₈	3	483	1357	0	0	0	16	8822	10681
24	I ₂₉	2	233	1177	0	0	13	33	10351	11809
	I ₃₀	3	438	979	0	0	0	13	5497	6900
	I ₃₁	5	440	585	8	0	12	58	8000	9108

A, apoptosis; A_s, suspected apoptosis; G, giant nuclei; G_{NE}, necrotic giant nuclei; G_s, giant nuclei with suspected apoptosis; HD, heterochromatin decondensation; N, normal; NE, necrosis.

Table 3. Absolute frequencies of nuclear phenotypes in Malpighian tubule epithelial cells of fully-nourished *T. infestans* nymphs 30 days after sequential cold shocks at 0°C.

Experimental conditions	Insect code	Nuclear Phenotypes							
		A	A _s	NE	G	G _{NE}	HD	N	Total
Control 1, one single 1h shock	l ₃₂	2	7	508	9	5	21	9209	9761
	l ₃₃	0	42	153	30	4	11	10524	10764
	l ₃₄	1	6	417	6	7	26	7445	7908
	l ₃₅	2	120	776	0	0	14	9768	10680
	l ₃₆	2	21	373	32	6	7	7714	8155
Control 2, one single 12h shock	l ₃₇	1	8	399	2	0	16	5987	6413
	l ₃₈	0	46	232	4	0	27	8162	8471
	l ₃₉	0	1	264	1	0	1	5734	6000
	l ₄₀	1	37	381	9	1	7	9224	9660
	l ₄₁	0	87	407	4	0	4	9815	10317
Time (h) at 30°C between shocks									
8	l ₄₂	2	49	336	0	1	15	7225	7628
	l ₄₃	0	26	441	8	0	25	8275	8775
	l ₄₄	7	31	130	4	0	7	7716	7895
24	l ₄₅	1	9	147	5	0	35	10247	10444
	l ₄₆	0	17	138	4	0	21	7142	7322
	l ₄₇	0	6	146	0	0	10	4298	4460

A, apoptosis; A_s, suspected apoptosis; G, giant nuclei; G_{NE}, necrotic giant nuclei; HD, heterocromatin decondensation; N, normal; NE, necrosis.

Table 4. Absolute frequencies of nuclear phenotypes in Malpighian tubule epithelial cells of fasted *infestans* nymphs 30 days after sequential cold shocks at 0°C.

Experimental conditions	Insect code	Nuclear phenotypes								
		A	A _s	NE	G	G _{NE}	G _s	HD	N	Tot
Control # 1, one single 1h shock	I ₄₈	1	19	445	89	2	0	76	5041	5670
	I ₄₉	1	57	151	0	0	0	49	5943	6200
	I ₅₀	3	98	878	82	5	10	4	10795	11887
	I ₅₁	1	23	607	22	0	0	14	9931	10593
	I ₅₂	2	9	731	8	6	2	17	8687	9465
Control # 2, one single 12h shock	I ₅₃	3	24	468	0	0	0	33	6470	6995
	I ₅₄	1	23	147	1	0	0	49	6515	6736
	I ₅₅	3	119	288	21	0	0	138	9759	10320
	I ₅₆	3	99	64	2	0	0	11	6974	7150
	I ₅₇	0	79	92	1	0	0	28	7959	8159
	I ₅₈	2	57	495	2	0	0	1	8297	8856
Time (h) at 30°C between shocks										
8	I ₄₉	1	78	380	2	0	0	21	12034	12685
	I ₆₀	2	20	377	1	1	0	9	10021	10430
	I ₆₁	2	23	567	3	0	0	28	8308	8931
24	I ₆₂	0	60	494	183	27	7	17	9944	10738
	I ₆₃	0	90	341	0	0	0	11	10918	11369
	I ₆₄	2	51	345	12	0	0	17	7024	7456

A, apoptosis; A_s, suspected apoptosis; G, giant nuclei; G_{NE}, necrotic giant nuclei; G_s, giant nuclei suspected of apoptosis; HD, heterocromatin decondensation; N, normal; NE, necrosis.

Table 5. Pearson correlation coefficients and levels of significance for stress factors and the absolute frequency of nuclear phenotypes 2 days after cold shocks at 0°C.

	1 st shock (h)	2 nd shock (h)	Time between shocks	Fasting (days)	A	As	NE	G	GNE	Gs	HD	N
fasting (days)	0.05	-0.03	-0.02									
	0.79	0.89	0.91									
A	-0.22	-0.03	0.10	0.07								
	0.23	0.87	0.61	0.69								
As	0.05	0.26	0.10	0.34	0.00							
	0.78	0.16	0.58	0.06	0.99							
NE	-0.31	0.13	0.08	0.37	0.05	0.31						
	0.09	0.48	0.67	0.04	0.80	0.08						
G	-0.03	0.13	0.32	-0.14	0.24	-0.26	-0.17					
	0.88	0.49	0.08	0.46	0.19	0.16	0.36					
GNE	-0.06	-0.17	-0.08	0.14	0.59	-0.13	0.03	0.36				
	0.76	0.36	0.68	0.45	0.00	0.47	0.88	0.05				
Gs	0.03	-0.13	0.03	-0.03	0.61	-0.22	-0.10	0.43	0.90			
	0.88	0.50	0.89	0.88	0.00	0.23	0.61	0.01	0.00			
HD	-0.35	0.11	0.10	-0.33	0.03	0.13	0.03	-0.05	-0.13	-0.08		
	0.06	0.56	0.59	0.07	0.85	0.47	0.85	0.77	0.49	0.68		
N	-0.20	0.19	0.24	-0.03	-0.20	0.17	0.10	-0.09	-0.30	-0.25	0.15	
	0.27	0.32	0.20	0.87	0.28	0.35	0.58	0.61	0.10	0.17	0.40	
Total	-0.27	0.22	0.25	0.09	-0.16	0.32	0.38	-0.14	-0.26	-0.26	0.17	0.95
	0.14	0.22	0.18	0.62	0.40	0.08	0.03	0.45	0.15	0.16	0.35	0.00

Significant correlations appear in boldface

Table 6. Pearson correlation coefficients and levels of significance for stress factors and the absolute frequency of nuclear phenotypes following cold shocks at 0°C.

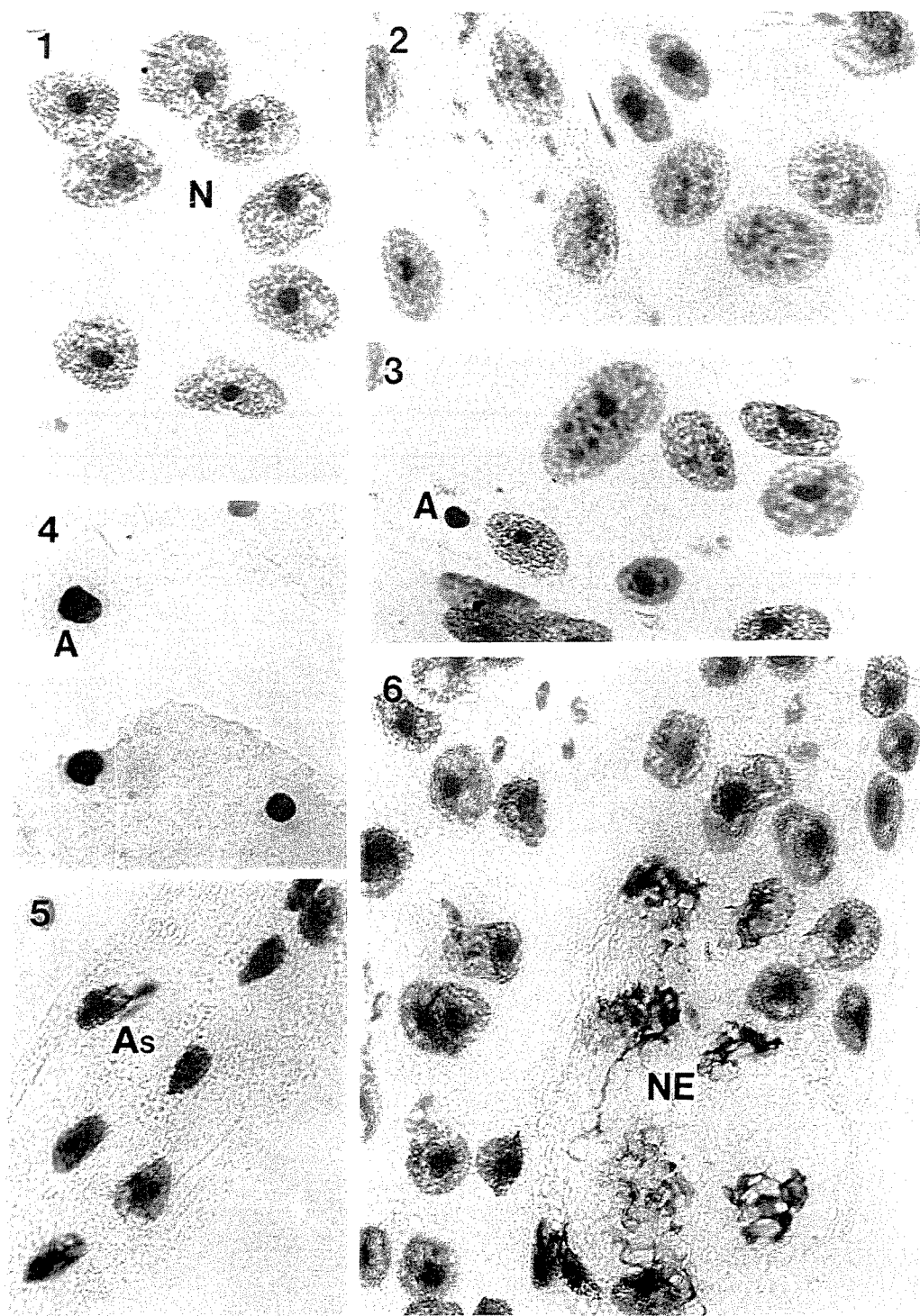
	1 st shock (h)	2 nd shock (h)	Time between shocks	Time after shocks	Fasting (days)	A	As	NE	G	GNE	Gs	HD	N
fasting (days)	0.07	-0.03	-0.02	0.37									
	0.66	0.82	0.85	0.00									
A	-0.16	-0.00	0.03	-0.25	-0.04								
	0.21	0.97	0.78	0.05	0.76								
As	0.01	0.09	0.03	-0.82	-0.25	0.21							
	0.93	0.49	0.82	0.00	0.04	0.10							
NE	-0.26	0.04	-0.00	-0.68	-0.13	0.20	0.66						
	0.04	0.77	0.98	0.00	0.29	0.12	0.00						
G	-0.15	0.06	0.17	0.22	0.32	-0.05	-0.24	-0.04					
	0.24	0.62	0.18	0.07	0.10	0.68	0.05	0.73					
GNE	-0.15	-0.10	-0.01	-0.14	0.01	0.51	0.03	0.16	0.31				
	0.24	0.43	0.94	0.27	0.93	0.00	0.84	0.20	0.01				
Gs	-0.00	-0.07	0.02	-0.42	-0.17	0.61	0.24	0.23	-0.03	0.78			
	0.97	0.57	0.85	0.00	0.18	0.00	0.06	0.07	0.80	0.00			
HD	-0.08	-0.04	-0.03	-0.20	0.07	0.08	0.23	0.10	0.11	-0.03	0.04		
	0.53	0.77	0.80	0.11	0.56	0.52	0.07	0.42	0.39	0.82	0.72		
N	-0.19	0.12	0.10	0.43	0.21	-0.22	-0.27	-0.14	0.17	-0.18	-0.31	-0.07	
	0.13	0.35	0.42	0.00	0.09	0.09	0.02	0.27	0.17	0.16	0.01	0.57	
Total	-0.26	0.14	0.11	0.20	0.16	-0.14	-0.03	0.16	0.16	-0.12	-0.22	-0.01	0.95
	0.04	0.28	0.40	0.12	0.20	0.26	0.81	0.20	0.21	0.33	0.08	0.92	0.00

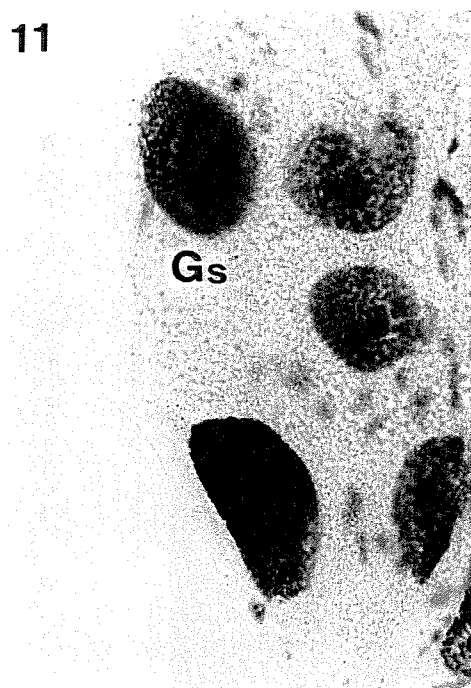
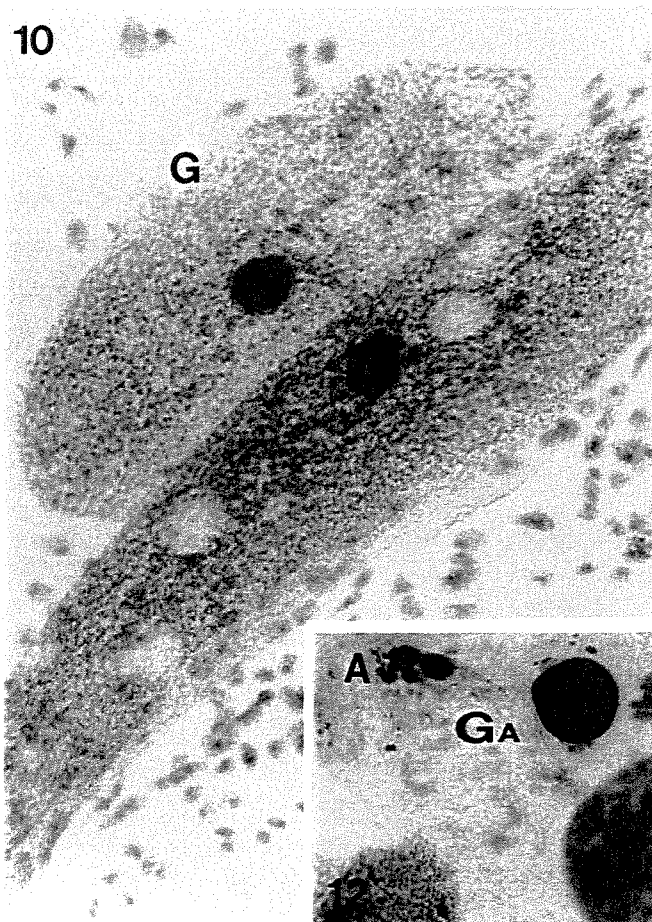
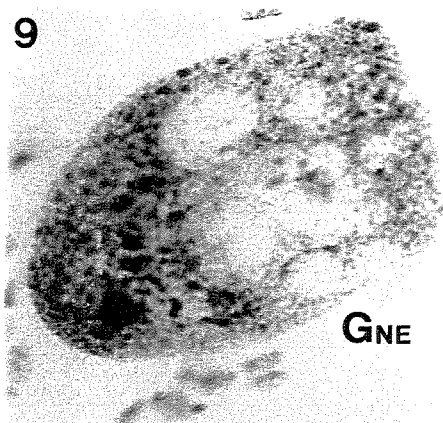
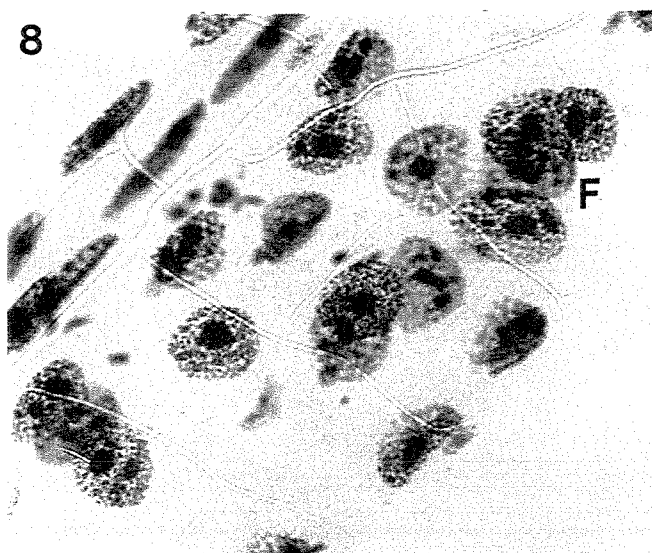
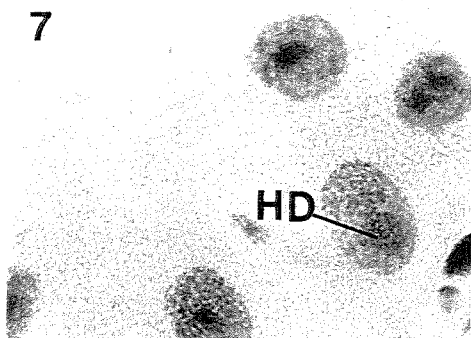
Significant correlations appear in boldface

Legends of Figures

Figs. 1-6. Nuclear phenotypes in Feulgen-stained Malpighian tubules of *Triatoma infestans* nymphs subjected to cold shocks. A, apoptosis; As, nuclei suspected of apoptosis; N, normal nuclei; NE, necrosis.

Figs. 7-11. Nuclear phenotypes in Feulgen-stained Malpighian tubules of *Triatoma infestans* nymphs subjected to cold shocks. A, apoptosis; F, fusing nuclei; G, giant nucleus; G_A, apoptotic giant nucleus; G_{NE}, necrotic giant nuclei; Gs, giant nucleus suspected of apoptosis; HD, heterochromatin decondensation.





VI. Conclusões

- ✓ Ninfas de 5º instar de *Triatoma infestans* são tolerantes, quanto à sobrevivência, a choques frios a 0°C únicos, curtos ou longos, ou a choques frios seqüenciais e esta tolerância independe do estado nutricional do inseto.
- ✓ A incidência de muda em ninfas bem-alimentadas não é afetada por choque frio único, curto ou longo.
- ✓ O tempo entre choques frios seqüenciais em ninfas bem-alimentadas afeta a incidência de muda, sendo o tempo de 8h entre choques ineficiente para elicitar mecanismos de defesa do organismo.
- ✓ A ocorrência de muda é antecipada nos espécimes em jejum e estes mostram maior variabilidade no tempo de incidência de muda em comparação aos espécimes bem-alimentados.
- ✓ O jejum induz um aumento significativo na incidência de muda após um choque frio único curto, mas uma diminuição na mesma após um choque frio longo.
- ✓ O jejum induz uma resposta de tolerância ao frio em condições de choques frios seqüenciais, verificado pelo aumento na taxa de muda em comparação à situação de choques frios únicos.
- ✓ O jejum é um fator estressante para ninfas de 5º instar de *T. infestans* e soma efeito de proteção celular ao induzido por choques frios únicos ou seqüenciais.
- ✓ Nos espécimes em jejum, o tempo entre choques frios seqüenciais não é um fator relevante; as taxas de muda alcançadas após choques seqüenciais independem do período decorrido entre choques.
- ✓ As ninfas não exibem diferenças significantes quanto aos padrões fenotípicos nucleares dos seus túbulos de Malpighi, independente do estado nutricional ou condição de choque frio.

✓ Os fenômenos de tentativa de sobrevivência celular (fusão celular/nuclear, descompactação da heterocromatina) não são relevantes para aquisição de tolerância ao frio, uma vez que não ocorrem em frequências significativas.

✓ As células dos túbulos de Malpighi são tolerantes ao choque frio e a morte celular por apoptose, porém são mais susceptíveis à morte por necrose, identificada em todos os espécimes analisados em frequência significativa.

✓ O jejum associado ao choque frio aumenta a incidência de morte por necrose 2 dias após choque, mas não é suficiente para prejudicar a sobrevivência dos insetos.

✓ Expressão de hsp e outros mecanismos fisiológicos intrínsecos da espécie, provavelmente participam na promoção de tolerância ao frio em *T. infestans*.

VII. Referências Bibliográficas

- ALEXANDROV, V. Y. Functional aspects of cell response to heat shock. *Int. Rev. Cytol.*, 148: 171-227, 1994.
- ÁLVARES-GARCIA, R. S. Efeitos da radiação gama sobre fenótipos nucleares de alguns tipos celulares de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). Masters Thesis, UNICAMP, Campinas, 1988.
- AMARAL, M. D., GALEGO, L. and RODRIGUES-POUSADA, C. Stress response of *Tetrahymena pyriformis* to arsenite and heat shock. Differences and similarities. *Eur. J. Biochem.*, 171: 463-470, 1988.
- ANANTHAM, J., GOLBERG, A. L., and VOELLMY, R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 232: 522-524, 1986.
- ANDRADE, C. G. T. J., and MELLO, M. L. S. Phenotypes and number of Malpighian tubule nuclei in *Triatoma infestans* Klug along development and starvation. *Rev. Bras. Genet.*, 10: 449-457, 1987.
- ASHBURNER, M., and BONNER, J. J. The induction of gene activity in *Drosophila melanogaster* by heat shock. *Cell*, 17: 241-254, 1979.
- BANY, M. A., BEHNKE, C. A., and EASTMAN, A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Ann. Biochem. Pharmacol.*, 40: 2353-2362, 1990.
- BAR, P. R. Apoptosis – The cell's silent exit. *Life Sciences*, 59: 369-378, 1996.
- BERGER, E. M., and WOODWARD, M. P. Small heat shock in *Drosophila melanogaster* may confer thermal tolerance. *Exper. Cell Res.*, 147: 437-442, 1983.
- BIENZ, M., and PELHAM, H. R. B. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Advan. Genet.*, 24: 31-71, 1987.
- BURDON, R. H. Heat shock and heat shock proteins. *Biochem. J.*, 240: 313-324, 1986.
- BURTON, V., MICHEL, H. K., YOUNG, P. and PETERSEN, N. S. Heat shock protein against cold stress of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.*, 8: 3550-2, 1988.
- CAMBY, I., SALMON, I., DANGUY, A., PASTEELS, J-L, and KISS, R. The use of the digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei to detect apoptosis. *Histochem. Cell. Biol.*, 104: 407-414, 1995.
- CARRETERO, M. T., CARMONA, M. J., and DIEZ, J. L. Thermotolerance and heat shock proteins in *Chironomus*. *J. Insect Physiol.*, 37: 239-246, 1991.
- CAVICCHIOLI, R., and WATSON, K. Loss of heat-shock acquisition of thermotolerance in yeast is not correlated with loss of heat-shock proteins. *FEBS Letters*, 207 (1): 149-152, 1986.

- CHEN, C. P., DENLINGER, D. L., and LEE R. E. Cold shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Zool.*, 60: 297-304, 1987.
- CHEN, C. P., LEE R. E., and DENLINGER, D. L. Cold shock and heat shock: a comparison of the protection generated by brief pretreatment at less severe temperatures. *Physiol. Entomol.*, 16: 19-26, 1991.
- CHEN, C. P., and WALKER, V. K. Increase in cold-shock tolerance by selection of cold resistant lines in *Drosophila melanogaster*. *Ecolog. Entomol.*, 18: 184-190, 1993.
- CHENEY, C. M., and SHEARN, A. Developmental regulation of *Drosophila* imaginal disc proteins: synthesis of heat shock protein under non heat shock conditions. *Developmental Biology*, 95: 325-330, 1983.
- COHEN, J. J. and DUKE, R. C. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.*, 132(1): 38-42, 1984.
- COTTER, T. G. and AL-RUBEAI, M. Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *Trends in Biotechnology TIBTECH*, 13: 150-155, 1995.
- CZAJKA, M., and LEE, R. E. A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.*, 148: 245-254, 1990.
- DANTAS, M. M. and MELLO, M. L. S. Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. *Rev. Brasil. Genetic*, 15 (3): 509-19, 1992.
- DOS REIS, G. A. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Today*, 13 (9): 335-342, 1997.
- EDINGTON, B. V., WHELAN, S. A., and HIGHTOWER, L. E. Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *J. Cell. Physiol.*, 139: 219-228, 1989.
- FADOK, V. A., VOELKER, D. R., CAMPBELL, P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L., and HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, 148: 2216-2216, 1992.
- FINDLY, R. C., and PEDERSON, T. Regulated transcription of the genes for actin and hsp in cultured *Drosophila* cells. *J. Cell Biol.*, 88: 323-328, 1981.
- FINLEY, D., OZKAYNAK, E., and VARSHAVSKY, A. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell*, 48: 1035-1046, 1987.

- GARCIA, S. L., RODRIGUES, V. L. C. C., GARCIA, N. L., FERRAZ FILHO, A. N. e MELLO, M. L. S. Survival and molting incidence after heat and cold shocks in *Panstrongylus megistus* Burmeister. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94(1): 131-137, 1999.
- GARCIA, S. L., MELLO, M. L. S. RODRIGUES, V. L. C. C. and GARCIA, N. L. Nuclear phenotype changes after heat shock in *Panstrongylus megistus* (Burmeister). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95: 271-277, 2000a.
- GARCIA, S. L., MELLO, M. L. S., GARCIA, N. L., and RODRIGUES, V. L.C.C., Changes in nuclear phenotypes following cold shock in *Panstrongylus megistus* (Burmeister). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95: (6): 893-898, 2000b
- GARCIA, S. L., GARCIA, N. L., RODRIGUES, V. L. C. C., and MELLO, M. L. S. Effect of sequential cold shocks on survival and molting incidence in *Panstrongylus megistus* (Burmeister) (Hemiptera, Reduviidae). Cryobiology, 44(1): 1-7, 2001a.
- GARCIA, S. L., MELLO, M. L. S. RODRIGUES, V. L. C. C, and GARCIA, N. L. Experimentally induced heat-shock tolerance in *Panstrongylus megistus* (Burmeister) (Hemiptera, Reduviidae). J. Med. Entom. (in press), 2001b.
- GEKKO, K., and KOGA, S. Increased thermal stability of collagen in the presence of sugars and polyols. J. Biochem., 94: 199-205, 1983.
- GERSCHENSON, L. E. and ROTELLO, R. J. Apoptosis: a different type of a cell death. Faseb J., 6: 2450-2455, 1992.
- HARMON, B. V., CORDER, A. M., COLLINS, R. J., GOBE, G. C., ALLEN, J., ALLAN, D. J., and KERR, J. F. R. Cell death induced in murine mastocytoma by 42-47°C heating in vitro: evidence that the form the death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. Int. J. Radiat. Biol., 58(5): 845-858, 1990.
- HELGASON, C. D., SHI, L., GREENBERG, A. H., SHI, Y., BROMLEY, P., COTTER, R.G., GREN, D. R., BLEACKLEY, R. C. DNA fragmentation induced by cytotoxic T lymphocytes can result in target cell death. Exp. Cell. Res., 206: 302-310, 1993.
- HIGHTOWER, L. E., and 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: 261-275, 1981.
- IANNI, B. M. Forma indeterminada: possibilidades evolutivas. In: XVI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doenças de Chagas. Rev. Soc. Brasil. Med. Trop., 33(supl.II): 140-141, 2000.
- JACKSON, K. M., DeLEON, M., SISTONEN, L., and VERRET, R. C. Heat-shocked A20 lymphoma cells fail to induce degranulation of cytotoxic T lymphocytes: possible mechanism of resistance. Cell Immunol., 203: 12-18, 2000.

- JOPLIN, K. H., and DENLINGER, D. L. Developmental and tissue specific control of heat shock induced 70kDa related proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. J. Insect Physiol., 30(4): 239-249, 1990.
- JOPLIN, K. H., YOCUM, G. D., and DENLINGER, D. L. Cold shock elicits expression of heat shock proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. J. Insect Physiol., 36 (11): 825-834, 1990.
- JUAREZ, E. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. Rev. Saúde Públ., 4: 147-166, 1970.
- KERR, J. F. R., WINTERFORD, C. M., and HARMON, B. V. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. Cancer, 73(8): 2013-2026, 1994.
- KOMATSU, Y., KAUL, S.C., IWAHASHI, H. and OBUCHI, K. Do heat shock provide protection against freezing ? FEMS Microbiol. Letters, 72: 159-162, 1990.
- KOMATSU, Y., KODAMA, O. and FUJITA, K. Heat shock treatment reduces *in situ* temperature in yeast at sub-lethal high temperature. Cell. Mol. Biol., 42: 839-45, 1996.
- KREBS, R. A., and FEDER, M. E. HSP70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much ? J. Insect Physiol., 44: 1091-1101, 1998.
- LEE, R. E., and DENLINGER, D. L. Insects at low temperature. Chapman & Hall, New York and London, 1991.
- LEE, R. E. Insect cold-hardiness: to freeze or not to freeze. BioScience, 39: 308-313, 1989.
- LEPOCK, J. R., FREY, H. E., RODAHL, A. M., and KRUV, J. Thermal analysis of CHL V79 cells using differential scanning calorimetry. Implications for hypertermic cell killing and the heat shock response. J. Cell. Physiol., 137: 14-24, 1988.
- LI, G. C., and SHRIEVE, D. C. Thermal tolerance and specific protein synthesis in chinese hamster fibroblasts exposed to prolonged hypoxia. Exp. Cell. Res., 142: 464-468, 1982.
- LIN, C. Y., ROBERTS, J. K., and KEY, J. L. Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. Synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. Plant Physiol., 74: 152-160, 1984.
- LINDQUIST, S. The heat shock response. Ann. Rev. Biochem., 55: 1151-91, 1986.
- LINDQUIST, S., and CRAIG, E. A. The heat shock proteins. Ann. Rev. Genet., 22: 631-677, 1988.

- LOWE, S. W., SCHIMITT, E. M., SMITH, S. W., OSBORNE, B. A., and JACKS, T. p-53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362: 847-849, 1993.
- MARTIN, S. J., BRADLEY, J. G., and COTTER, R. G. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subseqüente die via apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 448-453, 1990.
- NOLLEN, E. A. A., BRUNSTING, J. F., ROELOFSEN, H., WEBER, L. A., KAMPINGA, H. H. In vivo chaperona activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell. Biol.*, 19(3): 2069-2079, 1999.
- MELLO, M. L. S. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv., Hemiptera). *Cytologia*, 36: 42-9, 1971.
- MELLO, M. L. S. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Rev. Bras. Pequi. Med. Biol.*, 8: 101-107, 1975.
- MELLO, M. L. S. Computer analysis of stained chromatin on Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). *Mikroskopie*, 34: 285-299, 1978 a.
- MELLO, M. L. S. Mechanism of polyploidization in the Malpighian tubes of blood-sucking reduviid hemipterans. *Rev. Bras. Genet.*, 1: 97-102, 1978 b.
- MELLO, M. L. S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *J. Histochem.*, 15: 739-751, 1983.
- MELLO, M. L. S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. Bras. Genet.*, 12: 485-498, 1989.
- MELLO, M. L. S., and RAYMUNDO, H. H. Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a blood-sucking hemipteran. *Cytologia*, 45: 203-209, 1980.
- MELLO, M. L. S., KUBRUSLY, F. S., RANDI, M. A. F., RODRIGUES, V. L. C. C. and FERRAZ FILHO, A. N. Effects of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. *Entomol. Exp. Appl.*, 74: 209-18, 1995.
- MELLO, M. L. S., TAVARES, M. C. H., DANTAS, M. M., RODRIGUES, V. L. C. C., MARIA, S. S., CAMPOS, S. P., and GARCIA, N. L. Cell death and survival strategies in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* following heat shock. Subm. for publ., 2001a.
- MELLO, M. L. S., VIDAL, B. C., and MARIA, S. S. Morte Celular. In *A Célula 2001*, Carvalho, H. F. and Recco-Pimentel, S. M. (ed.). Editora Manole Ltda, São Paulo. 275-281p, 2001b.
- MORIMOTO, R., and FODOR, E. J. Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes. *J. Cell Biol.*, 99: 1316-1323, 1984.

- MOSSER, D. D., and MARTIN, L. H. Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line. *J. Cell. Physiol.*, 151: 561-570, 1992.
- PATTERSON, J. L., KELLY, T. J., and DUMAN, J. G. Purification and composition of thermal hysteresis producing protein from the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *J. Comp. Physiol.* 142: 539-542, 1981.
- PEROTTI, M., TODDEY, F., MIRABELLI, F., VARETTI, M., BELLOMO, G., McCONKEY, D. J., and ORRENIUS, S. Ca-dependent DNA fragmentation in human synovial cells exposed to cold shock. *FEB*, 259(2): 331-334, 1990.
- PETER, M. E., HEUFELDER, A. G., HENGARTNER, M. O. *Advances in apoptosis research*. *Proc. Natl. Acad. Science*, 94: 12736-12737, 1997.
- ROCKESTEIN, M. *Biochemistry of insects*. Academic Press, 649p, 1978.
- RODRIGUES, V. L. C. C., MELLO, M. L. S., FERRAZ FILHO, A. N. e DANTAS, M. M. Sobrevivência e ocorrência de muda em *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) após choque de temperatura. *Rev. Saúde Públ.*, 25: 461-7, 1991.
- SAKAGUCHI, Y., STEPHENS, L. C., MAKINO, M., KANEKO, T., STREBEL, F. R., DANHAUSER, L. L., JECKINS, G. N., and BULL, J. M. C. Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia. *Cancer Res.*, 55: 5459-5464, 1995.
- SAMALI, A. and COTTER, T.G. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp. Cell. Res.*, 223: 163-170, 1996.
- SCHLESINGER, M. J. H. Heat shock proteins: the search for functions. *J. Cell Biol.*, 103: 321-325, 1986.
- SHERLOCK, I. A. Vectores. In *Trypanossoma cruzi e doença de Chagas*. Z. Brener and Z. Andrade, ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 42-88, 1979.
- SILVA, I. G. and SILVA, H. H. G. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. III. *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Bras. Entomol.*, 37 (3): 489-496, 1993.
- SILVEIRA, A. C. and REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 27 (sup. LIII): 11-12, 1994.
- SOLOFF, B. L., NAGLE, W. A., MOSS, A. J. Jr, HENLE K. J., and CRAWFORD, J. T. Apoptosis induced by cold shock *in vitro* is dependent on cell growth phase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 145 (2): 876-883, 1987.
- STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267: 1445-1448, 1995.

- SZENDE, B., SRKALOVIC, G., GROOT, K., LAPIS, K., SCHALLY, A. V. Growth inhibition of mouse MXT mammary tumor by the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *J. Nat. Cancer Inst.*, 82 (6): 513-517, 1990.
- TAKANO, Y. S., HARMON, B. V., KERR, J. F. R. Apoptosis induced by wild hyperthermia in human and murine tumor cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J. Pathol.*, 163: 329-336, 1991.
- TAMMARIELLO, S. P., RICHART, J. R. and DENLINGER, D. L. Desiccation elicits heat shock protein transcription in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but does not enhance tolerance to high or low temperatures. *J. Insect Physiol.*, 45: 933-938, 1999.
- TAMMARIELLO, S. P., DENLINGER, D.L. Cloning and sequencing of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, and its expression in response to cold shock and heat shock. *Gene*, 215: 425-429, 1998.
- UMANSKY, S. R. Apoptosis: Molecular and cellular mechanisms (A review). *Mol. Biol.*, 30 (3): 285-295, 1996.
- WALKER, N. I., BENNETT, R. E., and KERR, J. F. R. Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Amer.J. Anat.*, 185: 19-32, 1989.
- WELCH, W. J. How cells respond to stress. *Scientific American*, 5: 56-64, 1993.
- WELCH, W. J., and FERAMISCO, J. R. Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J. of Biol. Chem.*, 257(24): 14949-14959, 1982.
- WELCH, W. J., and 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: 1198-1211, 1985.
- WIGGLESWORTH, V. B. *Insect Physiology*, ed. Chapman and Hall, London, 8th E., 1984.
- WIGGLESWORTH, V. B. Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of *Rhodnius* (Hemiptera). *J. Cell. Sci.*, 2: 603-616, 1967.
- WYLLIE, A. H. Glucorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284: 555-556, 1980.
- YIANGOU, M., TSAPOGAS, P., NIKOLAIDIS, N., SCOURAS, Z. G. Heat shock gene expression during recovery after transient cold shock in *Drosophila auria* (Diptera: Drosophilidae). *Cytobios*, 92: 91-98, 1997.
- YOCUM, G-D. and DENLINGER, D. L., Anoxia blocks thermotolerance and the induction of rapid cold hardening in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Entomol.*, 19(2): 152-158, 1994.

- ZACHARIASSEN, K. E. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.*, 65: 799-832, 1985.