

MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO-OLIVEIRA

"ESTUDO CITOENZIMOLÓGICO EM TÚBULOS DE
MALPIGHI DE *TRIATOMA INFESTANS* KLUG"

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do
grau de mestre em Biologia.

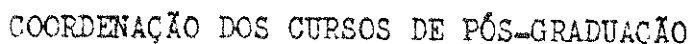
Orientadora: Prof^a D^{ra}. Maria Luiza Silveira Mello

CAMPINAS - 1982

T
Az24e

BC/4476

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PRE-
ÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Título da Dissertação ou Tese: "Estudo Citoenzimológico em Túbulos de Malpighi de Triatoma infestans Klug"

Data proposta para a Defesa: 29/06/82

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

assinatura do aluno

1 3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consul
te, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o forne
cimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a in
teressados.

assinatura do aluno

Orientador

Aos meus pais

e

esposo

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Maria Luíza Silveira Mello, pela dedicação e eficiência na orientação, mostrando sempre disponibilidade e segurança.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal por seu interesse e incentivo para que esse trabalho se concretizasse, além das sugestões no decurso do mesmo.

Ao Departamento de Biologia Celular e Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, onde esse trabalho foi realizado.

Aos professores, colegas e funcionários com os quais convivi durante essa etapa, pelo auxílio, amizade e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro sob a forma de bolsa de mestrado.

Às funcionárias Maria Teresa de Paula e Maria Aparecida Hartung pela atenção e disposição em auxiliar nas ampliações fotográficas.

Ao Prof. Dr. Newton Macha, chefe do laboratório de Histoquímica do Instituto de Ciências Biomédicas (USP), por sua orientação com relação às técnicas citoquímicas aqui uti

lizadas e fornecimento de algumas drogas químicas.

À Prof.^a Irene C. H. Lorand pela orientação na técnica de pesquisa de peroxidases em neutrófilos de sangue humano.

Ao Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi pelo fornecimento da droga oligomicina.

Ao Prof. Dr. Raymond Wegmann pelas sugestões dadas a alguns tópicos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José S. Barata, do Depto. de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, pelo fornecimento dos espécimens de *Triatoma infestans* utilizados no presente trabalho.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP), em especial às professoras doutoras Eurides Mambreu de Menezes e Marileila Varella Garcia pela orientação de estágios durante o curso de graduação, despertando em mim o interesse pela pesquisa.

Ao meu esposo, Antonio Barbosa de Oliveira Filho, pelo incentivo, companheirismo, paciência e compreensão.

Aos meus pais, irmãos e demais familiares pelo constante apoio, estímulo e interesse demonstrados.

A todos, enfim que contribuíram para minha formação e ajudaram de alguma forma durante a realização deste trabalho.

ÍNDICE

I	-	INTRODUÇÃO	1
II	-	MATERIAL E MÉTODOS	11
		1. Peroxidasas	12
		2. Desidrogenases succínicas	16
		3. Fosfatases alcalinas	17
		4. Fosfatases ácidas	19
		5. ATPases dependentes de Mg^{++}	22
III	-	RESULTADOS	
		1. Peroxidasas	25
		2. Desidrogenases succínicas	40
		3. Fosfatases alcalinas	43
		4. Fosfatases ácidas	50
		5. ATPases dependentes de Mg^{++}	74
IV	-	DISCUSSÃO	
		1. Peroxidasas	105
		2. Desidrogenases succínicas	109
		3. Fosfatases alcalinas	111
		4. Fosfatases ácidas	117
		5. ATPases dependentes de Mg^{++}	124
V	-	CONCLUSÕES	131
VI	-	SUMÁRIO	134
VII	-	SUMMARY	136
VIII	-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

I - INTRODUÇÃO

Os túbulos de Malpighi são órgãos excretadores de insetos e de outros artrópodes terrestres. A função desse sistema excretor é manter no animal um meio interno constante, através da eliminação ou segregação de substâncias desnecessárias, presentes na hemolinfa, e pela retenção ou reabsorção de constituintes úteis ao organismo (WIGGLESWORTH, 1965).

O interesse no estudo da estrutura e função dos túbulos de Malpighi foi estimulado pelos trabalhos de WIGGLESWORTH (1931 a, b, c) e pelos de RAMSAY (1952, 1953, 1954, 1955 a, b, 1956, 1958 e 1961). Este último planejou métodos de isolamento de túbulos individuais *in vitro* e coletou o fluído secretado. Dessa forma, foi possível obter-se informações detalhadas sobre a composição do fluído. Posteriormente, BERRIDGE (1966, 1968, 1969) elaborou um meio no qual os túbulos poderiam secretar por longos períodos, permitindo um maior conhecimento a respeito da formação e composição do fluído secretado.

A morfologia dos túbulos de Malpighi tem sido descrita para várias espécies de insetos: *Macrosteles fascifrons* (SMITH & LITTAU, 1960); *Rhodnius prolixus* (WIGGLESWORTH & SALPETER, 1962); *Dissosteira carolina* (TSUBO & BRANDT, 1962); *Dacus oleae* (BACETTI *et alii*, 1963; MAZZI & BACCETTI, 1963); *Sitophilus* (GRINYER & MUSGRAVE, 1964); *Lithobius forficatus* (FULLER, 1966); *Calliphora erythrocephala* (BERRIDGE & OSCHMAN, 1969); *Drosophila melanogaster* (WESSING & EICHELBERG, 1969, a, b); *Culex pipiens pallens* (SEGURI *et alii*, 1969); *Cenocorixa bifida* (JARIAL & SCUDDER, 1970); *Gryllodes sigillatus* (NARULA, 1970); *Tenebrio molitor* (GRIMSTONE *et alii*, 1968; BYERS, 1971); *Carausius morosus* (TAYLOR, 1971 a, b e 1973); *Gryllotalpa gryllotalpa* (LHONORÉ, 1973); *Blattella germanica* e *Blaberus craniifer* (WALL & OSCHMAN, 1973; NOIROT & NOIROT-TIMOTHÉE, 1976); *Musca domestica* (SOHAL, 1974); *Bombyx mori* (WAKU, 1974); *Petrobius maritimus* (FAIN-MAUREL & CASSIER, 1974); *Gaearea maculata*, *Cruptotympana mimica*, *Cosmoscarea abdominales*, *Philaenus spumarius*, *Philagra parva* e *Machaerota coronata* (MARSHALL, 1974); *Manduca sexta* (NIJHOUT, 1975); *Periplaneta americana* (WALL *et alii*, 1975); *Aedes aegypti* (MATHEW & RAI, 1976); *Glomeris marginata* (JOHNSON & RIEGEL, 1977); *Locusta migratoria* (BELL & ANSTEE, 1977); *Triatoma infestans* (MELLO & DOLDER, 1977; LACOMBE & RANGEL, 1979); *Panstrongylus megistus* (DOLDER & MELLO, 1979); *Pontania proxima* (SLEPYAN & GABARAYEVA, 1979); *Uropetala carovei* (GREEN, 1979a); *Arachnocampa luminosa* (GREEN, 1979 a, b, c e 1980; GREEN *et alii*, 1980); *Calpodes ethlius* (RYERSE, 1979); *Dolania americana* (SOLDÁN, 1979); *Solenopsis invicta* (PETRALIA, 1980); *Anthonomus grandis grandis* (MACGOWN & SIKOROWSKI, 1981).

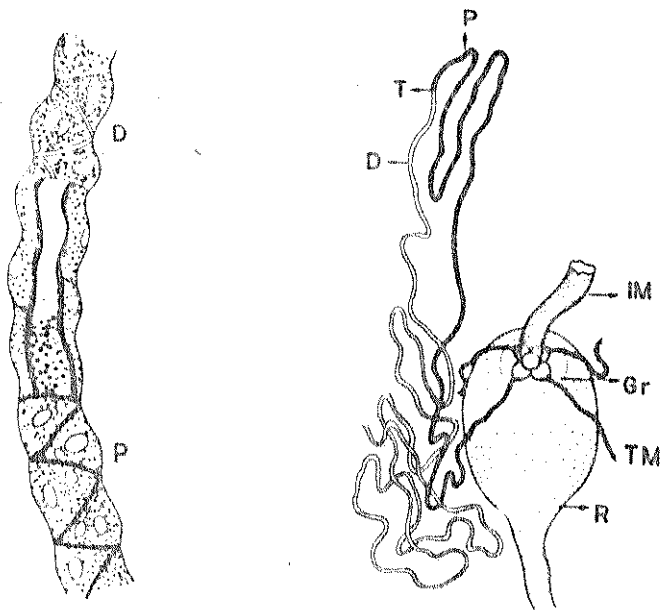
Na literatura ainda se encontram os trabalhos de BRADFIELD (1953); BEAMS *et alii* (1955); MEYER (1957); BERKALOFF (1960); WESSING (1965); MESSIER & SANDBORN (1966); KESSEL (1970); EICHELBERG & WESSING (1975) e de LANDA *et alii* (1980) referentes ao estudo da morfologia dos túbulos de Malpighi.

Esses estudos, no entanto, geralmente fornecem pouca informação sobre a especialização citológica e fisiológica das diferentes regiões dos túbulos de Malpighi, com exceção dos trabalhos de WIGGLESWORTH (1931 b, c); WIGGLESWORTH & SALPETER (1962); BERRIDGE & OSCHMANN (1969); TAYLOR (1973); WALL *et alii* (1975); MARSHALL (1974); BELL & ANSTEE (1977); JOHNSON & RIEGEL (1977); MELLO & DOLDER (1977); DOLDER & MELLO (1979); RYERSE (1979); GREEN (1979 b, c, 1980) e GREEN *et alii* (1980).

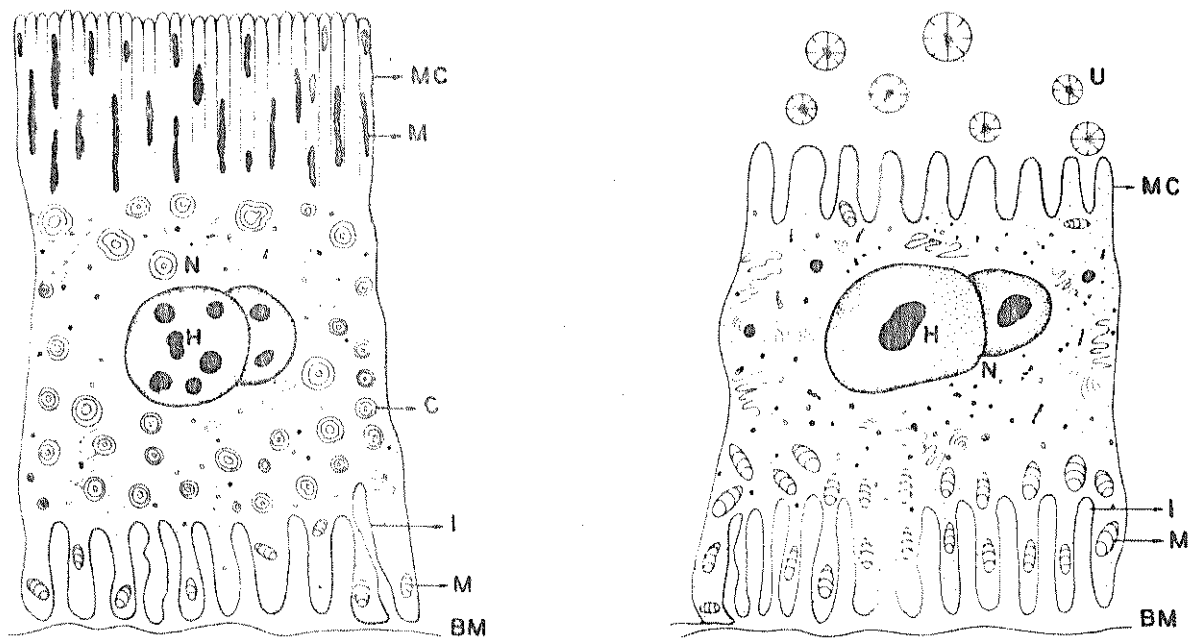
Nos hemípteros da família Reduviidae, os túbulos de Malpighi são em número de quatro, com comprimentos equivalentes entre si. Em *Rhodnius prolixus*, o comprimento de um túbulo medido em câmara clara é de 4,35 cm, o que equivale a mais de 2 vezes o comprimento do inseto (2 cm) (WIGGLESWORTH, 1931 b). Em espécimens de *Triatoma infestans*, cujo comprimento é 2,5 cm, os túbulos de Malpighi têm um comprimento de 6 a 7,5 cm, o que representa 2 a 3 vezes o comprimento do inseto (LACOMBE & RANGEL, 1979).

Nesses insetos os túbulos de Malpighi apresentam duas regiões distintas, proximal e distal, assim denominadas de acordo com a relação de proximidade que as mesmas guardam com referência a porção terminal do intestino médio (Esq. I). Estudos estruturais e ultraestruturais em *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* têm revelado diferenças notáveis entre esses segmentos, mesmo em ninfas jovens

Esquema I



Esquema II



Célula distal

Célula proximal

(WIGGLESWORTH & SALPETER, 1962; MELLO, 1971; MELLO & DOLDER, 1977 e 1980; DOLDER & MELLO, 1979). A porção distal de cada túbulo constitui cerca de dois terços de seu comprimento total, é translúcida e sem cor, ou, às vezes, fracamente amarelada. As suas células apresentam bordo apical estriado, suas microvilosidades são bastante próximas entre si, não tendo uma separação maior do que 150 a 200 Å. Este é o mesmo grau de separação que existe entre as membranas plasmáticas de células contíguas ou entre as duas membranas do envólucro nuclear. As células dessa região exibem no citoplasma grande quantidade de "concreções" laminares (glôbulos mineralizados), e mitocôndrias especialmente concentradas na parte apical celular^(Esq. II). Determinações citofluorométricas permitiram que se detectasse uma especial riqueza de quinurenina no citoplasma dessas células (MELLO & VIDAL, 1980).

Quanto à região proximal, as células são quase transparentes. Observa-se, por outro lado, no lúmen dessa região um material amarelo, composto por esferulitos de ácido úrico (MELLO & VIDAL, 1980), nunca presentes na região distal. O bordo apical das células proximais apresenta-se em forma de escova ("brush border") onde as microvilosidades são separadas por espaço equivalente ao seu próprio diâmetro. Nestas células não ocorrem "concreções" laminares e as mitocôndrias se concentram na porção celular basal (WIGGLESWORTH & SALPETER, 1962; MELLO, 1971; MELLO & DOLDER, 1977 e 1980; DOLDER & MELLO, 1979) (Esquema II).

Em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, após o 3º estadio ninfal, as células proximais diferem das distais também quanto ao fenótipo nuclear, ou seja, os núcleos das células proximais apresentam um único corpo heterocromático,

enquanto os das células distais apresentam vários cromocentros (MELLO, 1971, 1975 e 1976) (Esquema II). É de se esperar portanto alguma relação entre a estrutura cromatínica e a fisiologia das células neste material.

A origem e função dos glóbulos com laminação concêntrica, às vezes chamados de "concreções", esferitos, esfêrulas ou esferocristal, existentes nas células epiteliais dos túbulos de Malpighi e células intestinais dos insetos, têm sido tema de estudo em diversas espécies desses e de outros animais (BERKALOFF, 1958, 1959 e 1960; SMITH & LITTAU, 1960; WIGGLESWORTH & SALPETER, 1962; DONADEY, 1966; ANDRÉ & FAURÉ-FREMIET, 1967; LAVALLARD, 1967; GOURANTON, 1968a; MELLO & BOZZO, 1969; TAKAHASHI *et alii*, 1969; WESSING & EICHELBERG, 1969b; ABOLINS-KROGIS, 1970; INSTIN & GIRARD, 1970; JARIAL & SCUDDER, 1970; JEANTET, 1971; MORAN & STACHELIN, 1971; BALLAN-DUFRAÇAIS, 1972; MARTOJA, 1972 e 1974; CHEUNG & MARSHALL, 1973; FAIN-MAUREL *et alii*, 1973; LHONORÉ, 1973; WOLBURG *et alii*, 1973; BECKER *et alii*, 1974; HEVERT *et alii*, 1974; HUMBERT, 1974; JEANTET *et alii*, 1974 e 1980; TURBECK, 1974; WAKU & SUMIMOTO, 1974; WALL *et alii*, 1975; MATHEW & RAI, 1976; SOHAL *et alii*, 1976; MARTOJA *et alii*, 1977; MELLO & DOLDER, 1977; PEACOCK & ANSTEE, 1977; GREEN, 1979b; HAUSMANN & WALZ, 1979; SOHAL & LAMB, 1979; AKAI, 1980).

Mesmo assim, a despeito dos inúmeros estudos, muito pouco é conhecido com relação à origem dessas estruturas. De acordo com WIGGLESWORTH & SALPETER (1962), as "concreções" podem se originar através da mineralização das mitocôndrias. Em *Musca domestica*, no entanto, aparentemente se formam pela seqüestração de materiais

dentro de vacúolos envoltos por membrana, corpos multivesiculares, lisossomos secundários ou corpos residuais (TURBECK, 1974). RIEGEL (1966 a, b, 1971) sugeriu que essas estruturas às quais denominou "corpos formados" se originariam de vesículas pinocitóticas e que conteriam enzimas hidrolíticas necessárias à digestão dos materiais ingeridos. Esses "corpos" seriam, então, admitidos como mecanismo primário para o movimento dos solutos através do epitélio (WESSING & EICHELBERG, 1975).

Baseando-se em experimentos fisiológicos realizados por WIGGLESWORTH (1931 c, 1965), sabe-se que a porção distal dos túbulos de Malpighi desses reduviídeos está envolvida na eliminação de potássio e água, enquanto a região proximal reabsorve potássio. Wigglesworth demonstrou que o fluido presente no lúmen da porção distal é fracamente alcalino, enquanto o da porção proximal é distintamente ácido. Ácido úrico seria eliminado pela porção distal e cristalizado no lúmen da porção proximal sob a forma de esferulitos. Duas questões foram levantadas por esse autor; isto é, se as variações da taxa sódio/potássio na urina seriam associadas com correspondentes variações dessa taxa na hemolinfa do inseto e ainda se as porções dos túbulos de Malpighi citologicamente distintas possuiriam papéis diferentes na secreção de sódio e potássio. RAMSAY (1952) esclareceu que as mudanças consideráveis nas concentrações de sódio e potássio na urina de *Rhodnius prolixus* durante o curso normal de excreção não se refletem na hemolinfa, a qual permanece relativamente inalterada em sua composição. Quanto à outra questão levantada, foi concluído que a porção distal do túbulo é capaz de elaborar um fluido contendo menos sódio e mais potássio do que a hemolinfa, e que essas diferen

ças em concentração tornam-se sensivelmente reduzidas durante a passagem do fluido através da porção proximal. Com relação à eliminação de potássio na porção distal dos túbulos e reabsorção do mesmo na porção proximal, os dados de Wigglesworth foram confirmados por RAMSAY (1952). Quanto à questão de reabsorção de sódio, se na região distal dos túbulos ou no reto, não é ainda clara.

O transporte de sódio, sua taxa de secreção e a presença de potássio em túbulos de Malpighi têm sido tema de estudo para GEE (1976a, b e 1977) assim como a permeabilidade desses órgãos e a variação de solutos orgânicos tem sido o objetivo das pesquisas de MADDRELL & GARDINER (1974). Também devem ser destacados os trabalhos de PHILLIPS & MADDRELL (1974) e KICENIUK & PHILLIPS (1974) relacionados com a regulação e transporte ativo de magnésio pelos túbulos de Malpighi de larvas de *Aedes campestris*.

A análise da literatura no entanto, salienta poucos estudos citoquímicos envolvidos na detecção de enzimas nos túbulos de Malpighi.

Em alguns grupos de insetos sabe-se que determinadas atividades enzimáticas se restringem à regiões específicas dos túbulos de Malpighi (CRAIG, 1960). MAZZI & BACETTI (1957) discutiram os aspectos histoquímicos comparativos dos túbulos de *Blaps gibba*, *Mantis religiosa*, *Acrida bicolor* (Ortópteros) e *Apis* (Himenóptero) com respeito a atividades enzimáticas e sua localização. Os resultados mostraram uma marcante diferença na distribuição das enzimas, porém não puderam ser correlacionados com funções que se conhecem do órgão.

Taylor (1973), baseando-se nos seus estudos sobre mudanças estruturais e funcionais nos túbulos de Malpighi de

Carausius morosus durante períodos de alimentação e jejum, descreveu que possivelmente a taxa de formação de urina esteja controlada pelo número de moléculas de enzimas envolvidas no transporte de íons através do plasmalema.

Observações citoquímicas e citoenzimológicas envolvendo a distribuição de glicogênio, β -glucuronidase, fosfatase alcalina e outros grupos de enzimas foram realizadas nos túbulos de Malpighi e intestino de alguns Homoptera (Cercopidae e Jassidae). Esses dados confirmaram a existência de especializações funcionais no intestino médio e túbulos de Malpighi desses insetos (GOURANTON, 1968b).

MALL & CHATTORAJ (1981) detectaram qualitativamente enzimas digestivas em esôfago, intestino e túbulos de Malpighi de *Galerucella birmanica* (Chrysomelidae) encontrando apenas amilase nos órgãos excretórios.

EVANS (1957), usando sais tetrazólios que possuem a propriedade de transformarem-se em formazanas coloridas quando reduzidos, estudou a localização da atividade desidrogenásica em diversos tecidos associados com o intestino de *Calliphora erythrocephala* (Díptero).

Nos túbulos de Malpighi do milípora *Glomeris marginata*, estudos citoquímicos revelaram vesículas intracelulares com atividade fosfatásica ácida (JOHNSON & RIEGEL, 1977). Quanto a atividades fosfatásicas alcalinas e ATPásicas, essas mostraram-se com localização idêntica entre si. Tais atividades fosfatásicas foram relacionadas com características ultraestruturais e funcionais dos túbulos de Malpighi (JOHNSON & RIEGEL, 1977).

Através de técnicas de isolamento de enzima foi sugerido por BERRIDGE & GUPTA (1967), que as membranas basal e apical dos túbulos de Malpighi de *Calliphora* possuem uma

ATPase ativada por magnésio. PEACOCK *et alii* (1972 e 1976) mostraram também em preparados microssomais uma ATPase ativada por sódio/potássio e dependente de magnésio, presente nas membranas das células dos túbulos de Malpighi de *Schistocerca gregaria* e *Jamaica flava* (Ortópteros). Mais tarde a existência de um sistema consistindo de ATPase dependente de magnésio e ATPase ativada por sódio e potássio e dependente de magnésio foi confirmada nas membranas das células dos túbulos de Malpighi de *Locusta migratória* (ANSTEE & BELL, 1975 e 1978; PEACOCK, 1979; ANSTEE & FATHPOUR, 1981). No mesmo órgão deste inseto foi também demonstrado por ANSTEE & FATHPOUR (1979) a presença de uma ATPase dependente de magnésio, estimulada por HCO_3 e inibida por SCN. O papel dessa enzima, no entanto, é bastante obscuro por ainda não estar esclarecida a sua localização celular.

Nada, porém, se conhece até agora quanto à identificação e distribuição de enzimas nos túbulos de Malpighi de hemípteros hematófagos.

O presente trabalho tem, portanto, como objetivo investigar a presença de algumas enzimas, tais como fosfatases ácidas e alcalinas, ATPases, desidrogenases succínicas e peroxidases, e sua localização ao longo dos segmentos distais e proximais dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug, todas a nível de microscopia fotônica e algumas a nível de microscopia eletrônica. A pesquisa dessas enzimas nas diferentes regiões dos túbulos é motivada pelo conhecimento de: 1. diferenças ultraestruturais comparando-se às células que compõem essas regiões (WIGGLESWORTH, 1931b; MELLO & DOLDER, 1977; DOLDER & MELLO, 1979); 2. diferenças fisiológicas entre as regiões (WIGGLESWORTH, 1965); 3. diferente estrutura

cromatínica em termos de padrões heterocromáticos (MELLO, 1971, 1975 e 1980).

II - MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas ninfas não infectadas de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) de 3º, 4º e 5º estádios, além de alguns exemplares adultos. Os triatomíneos foram procedentes dos estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais (Corinto e Colônia Geral), e cedidos pelo Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo. Foram usados animais recém-alimentados, bem como alguns espécimes submetidos a jejum nunca superior a um mês.

Desses insetos removeram-se os túbulos de Malpighi, nos quais foi efetuada a pesquisa de atividade de algumas enzimas. Para alguns grupos enzimáticos o estudo foi realizado a nível de microscopia fotônica e eletrônica e para outros apenas a nível de microscopia fotônica. Para cada condição experimental utilizaram-se órgãos de pelo menos 5 indivíduos, que foram anestesiados com éter. A dissecação dos insetos foi efetuada empregando-se lupa estereoscópica Zeiss.

Os procedimentos citoquímicos utilizados para a iden

tificação das enzimas acham-se descritos a seguir.

1. Peroxidasas

A nível de microscopia fotônica, a técnica utilizada foi a de SATO (1928), segundo LISON (1960).

Foram usadas ninfas de 5º estadio e adultos. Os órgãos excretores foram colocados diretamente sobre lâminas e fixados em ácido acético (ECIBRA) a 45%. Alguns túbulos de Malpighi foram esmagados entre lâmina e lamínula. Neste caso, a lamínula foi movida após congelação do material em nitrogênio líquido. Na maioria dos casos, porém, trabalhou-se com a montagem total dos túbulos.

Sobre os tecidos foi gotejada com pipeta Pasteur uma solução contendo 0,3% de sulfato de cobre e 0,1% de ácido acético durante 1 minuto. Depois foram eles lavados com água e cobertos com uma solução saturada (0,1%) de benzidina adicionada de 0,2% de peróxido de hidrogênio a 10 volumes, durante 2 a 8 minutos. O melhor tempo constatado foi o de 6 minutos. O peróxido de hidrogênio tinha melhor atividade quando acrescentado na solução de benzidina no momento de uso.

Como controle da reação foram utilizados dois meios, um na ausência de benzidina e outro sem peróxido de hidrogênio.

Após a lavagem das lâminas em água, estas foram cobertas com solução aquosa de fucsina básica a 1% durante 20 segundos. Os preparados foram novamente lavados em água, secos ao ar e montados em gelatina-glicerina. O preparo deste meio de montagem foi o seguinte: 7 g de gelatina foram dissolvidos em 42 ml de água destilada aquecida. Logo após foram adicionados glicerina (50 ml) e fenol (1 g). A solução foi en

tão aquecida por mais 10 a 15 minutos e filtrada em algodão-de-vidro. Este meio de montagem deve ser guardado na estufa a 37°C. Seu índice de refração é igual a 1,474 (BEHMER *et alii*, 1976).

O material controle usado para esta reação constituiu-se de esfregaço de sangue humano (medula), seco ao ar, e que após ser submetido à técnica mencionada apresentou atividade peroxidásica positiva em neutrófilos (grânulos em marrom).

Para a pesquisa a nível de microscopia eletrônica foram utilizadas as técnicas de GRAHAM & KARNOVSKY (1966) e de NOVIKOFF & GOLDFISCHER (1969). As ninfas dos triatomíneos eram de 5º estadio e estavam entre o 15º e 20º dia após a alimentação. Os abdômens, dos insetos anestesiados com éter, foram abertos e imediatamente cobertos com fixador à temperatura de 4º C.

Quando se usou o procedimento de GRAHAM & KARNOVSKY (1966), os túbulos de Malpighi foram dissecados e fixados durante 2 horas por imersão em glutaraldeído a 3% (Merck) (4º C) e tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 contendo traços de cloreto de cálcio (Merck). Após esse período, os órgãos foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 durante 15 minutos e então incubados 90 minutos, à temperatura ambiente, no seguinte meio:

Meio de diaminobenzidina (DAB) de GRAHAM & KARNOVSKY (1966) (pH 7,6)

Diaminobenzina (Baker).....	5 mg
Tampão Tris - HCl 0,05 M, pH 7,6.....	10 mg

Peróxido de hidrogênio 1% (preparado na hora, a partir de estoque a 30%) (Merck)..0,1 ml

Uma parte do material foi ainda incubada em meio incompleto contendo apenas DAB tamponado (4° C), mas sem peróxido de hidrogênio, durante 1 hora. Após esse período, o material foi reincubado no meio completo contendo o peróxido de hidrogênio e aí permanecendo 90 minutos. Esse procedimento foi realizado levando-se em conta a lenta penetração da diaminobenzidina nos tecidos, sendo que dessa forma a penetração e coloração ocorrem mais uniformemente (ESSNER, 1973b).

Após incubação, o material foi lavado em água destilada (3 vezes), pós-fixado em tetróxido de ósmio (Fluka) a 1,3% em tampão cacodilato de sódio pH 7,2, contendo sacarose a 5%, durante 90 minutos.

Os túbulos foram então desidratados em série etanólica e óxido de propileno e incluídos em Epon 812 segundo LUFT (1961). Os cortes ultra-finos de aproximadamente 60 e 80 nm de espessura foram obtidos em ultramicrotomo LKB, coletados em telas de cobre (200 mesh) e examinados em microscópio eletrônico Zeiss 9 S operado a 60 KV. Apenas alguns cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, pois os sítios do produto da reação são facilmente observados nos cortes sem coloração e, neste caso, a contra-coloração é empregada apenas para que as estruturas do tecido possam ser claramente visualizadas. Além disso, já foi estabelecido que soluções alcalinas de chumbo não prejudicam o produto da reação (GRAHAM & KARNOVSKY, 1966).

O outro meio de incubação empregado foi o de NOVIKOFF & GOLDFISCHER (1969), uma modificação do meio ante-

rior:

Diaminobenzidina (Baker)..... 20 mg
 Tampão Tris - HCl 0,05 M (Sigma)..... 9,8 ml
 Peróxido de hidrogênio 1% (recentemente
 preparado a partir de estoque a 30%)
 (Merck)..... 0,2 ml
 (pH 9,0; filtrar, se necessário).

Neste caso, os túbulos foram fixados por 2 horas em glutaraldeído a 2,5% mais tampão cacodilato de sódio 0,1 M (4° C) e, então, lavados em tampão cacodilato 0,1 M. Foram incubados durante 60 minutos em meio com diaminobenzidina sem a presença de peróxido de hidrogênio a 37° C e só depois é que foram incubados durante 4 horas em meio com peróxido de hidrogênio a 37° C.

A solução de DAB foi preparada na hora do uso, para se evitar a autooxidação na presença de oxigênio. A solução quando recentemente preparada possui cor palha, tornando-se progressivamente mais escura, como resultado da autooxidação (ESSNER, 1973b). Como nesta técnica o tempo de incubação foi muito longo, o meio foi renovado a intervalos regulares (de 1 em 1 hora) para que fosse evitada acumulação excessiva do óxido, pois até 1 hora de incubação a autooxidação é mínima (ESSNER, 1973).

Após o período de incubação, o material foi lavado em tampão cacodilato 0,1 M e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% contendo tampão cacodilato 0,2 M (v/v) durante 2 horas. Novamente o material foi lavado em tampão cacodilato 0,1 M. Os procedimentos de desidrata-

ção, inclusão, ultramicrotomia e observação foram os mesmos da técnica anterior. Neste caso, porém, não foi usada a dupla coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo.

Os meios controles para ambas técnicas utilizadas em microscopia eletrônica consistiram de:

1. Ausência do substrato (DAB) no meio completo.
2. Ausência de peróxido de hidrogênio no meio completo.
3. Ausência de diaminobenzidina e de peróxido de hidrogênio simultaneamente.

2. Desidrogenases succínicas

Para esta técnica, introduzida por NACHLAS *et alii* (1957) e modificada por WEGMANN & TORDET-CARIDROIT (1960), foram utilizadas ninfas recém-alimentadas de 3º e 5º estádios.

Os órgãos isolados e não fixados foram colocados sobre lâmina e imediatamente cobertos pelo meio de incubação constituído de:

Succinato de sódio (Schuchardt, Munchen)	
0,3 M.....	1 ml
N.B.T. (Nitro Blue Tetrazolium) (Schuchardt, Munchen) 0,5 mg/ml.....	1 ml
Tampão fosfato 0,1 M - pH 7,4.....	2 ml

As lâminas permaneceram incubadas durante 30 minutos em estufa a 37°C. Foram então lavadas em água destilada, passadas por formol neutro a 10% (pH 7,0) por 5 minutos,

novamente lavadas em água destilada e finalmente montadas em gelatina-glicerina.

Como controle da reação utilizou-se incubação do material em meio sem substrato (succinato de sódio). O material controle utilizado foi músculo cardíaco de camundongo não fixado e cortado em congelação.

A atividade desidrogenásica succínica positiva aparece sob a forma de uma coloração azul-violeta escura.

3. Fosfatases alcalinas

A técnica utilizada foi a de GÖMÖRI (1952) com algumas modificações.

Os túbulos de Malpighi utilizados pertenciam a ninfas de 3º e 5º estádios e a alguns adultos.

Os órgãos não fixados foram incubados na solução abaixo descrita durante 1 hora a 37° C.

Beta-glicerofosfato de sódio (Merck)	
a 2%.....	25 ml
Dietil barbiturato de sódio (Merck)	
a 2%.....	25 ml
Cloreto de cálcio (Baker) a 2%.....	5 ml
Sulfato de magnésio (Usina Colombina	
S/A) a 2%.....	2 ml
Água destilada.....	50 ml

O pH desse meio de incubação deve ser de 9,2. Este fator é crítico, pois tal grupo de enzimas exibe atividade ótima somente em pHs alcalinos (9.0 - 9.6). O meio de incubação não deve ser guardado e é aconselhável se preparar solu-

ções recentes para se processar a reação (BANCROFT, 1967).

Após a incubação, o material foi lavado em água destilada e logo após tratado com solução de nitrato de cobalto (Merck) a 2% durante 5 minutos. Novamente foi lavado com água destilada e então tratado por uma solução de sulfato de amônia (Baker) a 1% preparada na hora, durante 2 minutos. As lâminas foram a seguir, bem lavadas em água destilada e após estarem secas, montadas com gelatina-glicerina.

Para o controle da reação usaram-se 3 meios distintos da solução incubadora:

1. Meio completo sem substrato (Beta-glicero-fosfato de sódio).
2. Meio completo com substrato (Beta-glicero-fosfato de sódio) e sem sulfato de magnésio.
3. Meio sem Beta-glicero-fosfato de sódio e sem sulfato de magnésio.

O órgão controle utilizado para a verificação dessa atividade enzimática foi o rim de camundongo, fixado em formol cálcio de Baker (formol 10% adicionado de 1 g de acetato de cálcio, até o pH da solução atingir o valor 7,0), durante 18 a 20 horas. O material foi cortado em congelação, tendo os cortes por volta de 7 μ m de espessura. Os cortes foram colhidos com lâminas em água destilada e somente então incubados no meio para a reação.

Outra maneira mais simples e rápida de se fixar o órgão também foi utilizada (TAPER, 1979). O rim foi conge-

lado imediatamente após a sua remoção e cortes variando de 8 a 10 μ m foram obtidos em criostato, colhidos em lâmina e deixados à temperatura ambiente, por 5 minutos. Após as lâminas estarem secas, o material foi fixado no formol cálcio de Baker durante 15 minutos e então lavado por 5 minutos em 2 banhos de água destilada. A incubação foi realizada simultaneamente com a dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*.

A atividade fosfatásica alcalina positiva se revela segundo um precipitado marrom escuro.

4. Fosfatases ácidas

A técnica utilizada para a microscopia fotônica foi uma modificação da de GÖMÖRI (1950).

Túbulos de Malpighi não fixados de ninfas de 3º e 5º estádios recém-alimentadas foram incubados durante 30 minutos a 37° C em uma solução constituída de:

Tampão acetato 0,05 M (pH 5.0)

Beta-glicerofosfato de sódio... 0,36 g/5 ml H₂O

Nitrato de chumbo (Merck)..... 0,264 g/200 ml

tampão acetato

No preparo do substrato acima (substrato de Gömöri) foi dada especial atenção à precipitação antecipada do nitrato de chumbo. Por isso, a solução de Beta-glicerofosfato de sódio foi gotejada sob agitação em um Erlenmeyer contendo a solução de nitrato de chumbo e tampão acetato. Esse substrato permaneceu em estufa a 37° C durante 12 horas, havendo então a total precipitação do nitrato de chumbo. A solução foi filtrada antes do uso.

Após o período de incubação, o material foi lavado com água destilada e então mergulhado em sulfeto de amônia a 1%, recém preparado, durante 1 minuto. Novamente as lâminas foram lavadas, secas e montadas em gelatina-glicerina.

Como controle da reação foi utilizado o meio incubador sem substrato (Beta-glicerofosfato de sódio). O órgão controle usado para verificação da atividade fosfatásica ácida foi rim de camundongo, fixado em formol cálcio de Baker (como descrito para fosfatases alcalinas) e então mergulhado na mistura goma 1% mais sacarose 0,88 M onde permaneceu 24 horas no mínimo e no máximo até 7 dias, sendo então retirado e lavado durante 5 minutos em água destilada. Essa metodologia é empregada rotineiramente no laboratório de histoquímica (USP) de acordo com o trabalho de HOLT (1959). Também neste caso o material foi cortado em congelação.

A atividade fosfatásica ácida positiva se revela segundo um precipitado pardo escuro.

Para a utilização da técnica a nível ultraestrutural, os túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estágio foram removidos e transferidos diretamente para a solução de glutaraldeído a 1,5% em tampão cacodilato de sódio 50 mM, pH 7,4, e fixados por 30 minutos à temperatura de 4° C. A redução do tempo de fixação para a detecção de fosfatases é necessária para que haja uma maior preservação das enzimas, pois o glutaraldeído mesmo a baixas concentrações é um potente inibidor de fosfatases (ESSNER, 1973a). Após terem sido lavados várias vezes em tampão cacodilato de sódio 96 mM, os túbulos foram colocados no meio de incubação para fosfatase ácida (GÖMÖRI, 1952).

Beta-glicerofosfato de sódio (Merck)..... 30 mg

Tampão acetato 0,05 M (pH 5.0).....	11 ml
Nitrato de chumbo 12% (Merck) (concentração final 3,3 mM).....	0,1 ml

Neste caso, deve-se também filtrar o substrato antes do uso pois ocorre precipitação do nitrato de chumbo.

Para observações ao microscópio eletrônico não foi necessário a imersão em sulfeto de amônia diluído, pois o produto inicial da reação, fosfato de chumbo, é suficientemente opaco aos elétrons (ESSNER, 1973a). Entretanto, a imersão em sulfeto de amônia pode ser útil nas observações de cortes semi-finos sob microscópio de contraste de fase a fim de se reconhecer sítios reativos para subsequente cortes ultra-finos (SERRANO *et alii*, 1976). Neste caso, o produto final da reação é o sulfeto de chumbo.

O período de incubação variou de 1 a 1 hora e 30 minutos e foi realizado tanto em temperatura ambiente como a 37° C. Após a incubação, o material foi novamente lavado em tampão cacodilato de sódio 50 mM, e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em cacodilato de sódio 40 mM, pH 7,4 por 30 minutos, pois uma prolongada exposição ao ósmio pode dissolver o fosfato de chumbo (REALE & LUCIANO, 1964). O material foi então lavado em tampão, desidratado em série etanólica e incubado em Epon 812, como descrito para peroxidases. Neste caso, o material foi observado sem coloração pois já é conhecido o fato de que a exposição dos cortes ultra-finos às soluções de coloração e em especial ao acetato de uranila deve ser evitada, desde que isso pode resultar em uma considerável perda ao produto da reação (PRIESTER, 1972).

Para controle da reação utilizaram-se dois meios controles:

1. Meio completo sem substrato (Beta-glicerofo^sfato de sódio).

2. Meio completo com substrato (Beta-glicerofo^sfato de sódio) e presença de fluoreto de sódio 0,01 M.

5. ATPases dependentes de Mg^{++}

Para a pesquisa a nível de microscopia fotônica, o método usado foi o de SLATER (1958), modificado segundo WEGMANN & BANKOWSKY (1960). Foram usados órgãos não fixados de ninfas de 3º, início de 4º e 5º estadios e de adultos recém-alimentados. Alguns poucos preparados foram fixados em etanol acético ou formol cálcio de Baker a 10%.

Para o estudo da atividade ATPásica foi utilizada uma solução estoque composta de:

Cloreto de potássio (Baker).....	885 mg
Tris (hidroximetilamino metano)	
(Merck).....	980 mg
Sacarose (Reagent, ACS).....	225 mg
Cloreto de magnésio (Reagen).....	30 mg
Cloreto de cálcio (Baker).....	3,96 g
Água destilada.....	150 cc

O pH dessa solução é 9,4 sendo que a mesma tem duração de até 3 meses na geladeira. Para cada ml dessa solução estoque foram acrescentados 4 mg de ATP (Sigma), o pH ajustado para 7,4 com HCl 0,1 N e a solução agitada e filtrada.

Os túbulos foram incubados durante 30 minutos a 37° C. Logo após foram lavados em água destilada por 10 minutos e submetidos ao tratamento com nitrato de cobalto a 2% du

rante 5 minutos. Novamente, o material foi lavado por 10 minutos em água destilada e mergulhado em solução de sulfeto de amônia a 2% por 2 minutos. Após a lavagem final das lâminas, estas foram secas e montadas em gelatina-glicerina.

Além dessa incubação em meio completo, foram ainda testadas incubações em meios com as seguintes modificações:

1. Solução estoque sem ATP (PAUTRAT & BENKÖEL, 1977).
2. Solução estoque com ATP (4 mg/ml) (PAUTRAT & BENKÖEL, 1977) e sem $MgCl_2$.
3. Solução estoque sem ATP (PAUTRAT & BENKÖEL, 1977) e sem $MgCl_2$.
4. Solução estoque com ATP (PAUTRAT & BENKÖEL, 1977) e com NaF 0,1 M.
5. Solução estoque sem ATP (PAUTRAT & BENKÖEL, 1977) e com NaF (Fisher S.C.) 0,1 M.
6. Solução estoque com oligomicina (0,04%) e sem ATP (RACKER, 1976).
7. Solução estoque com oligomicina e com ATP (RACKER, 1976).

O órgão utilizado como controle da atividade ATPásica positiva foi rim de camundongo. Este órgão foi fixado em formol cálcio de Baker e cortado em congelação, como descrito anteriormente.

A atividade ATPásica positiva revelou-se segundo precipitado pardo escuro.

Todas as observações deste trabalho a nível fotô

nico, incluindo-se as fotomicrografias, foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss.

Para localização de ATPases a nível de microscopia eletrônica foi empregado o meio de ATP/chumbo de WACHSTEIN & MEISEL (1957):

ATP (Na) (Sigma).....	25 mg
Água destilada.....	22 ml
Tampão tris maleato 0,2 M.....	20 ml
Sulfato de magnésio anidroso (Fab. S. Caetano do Sul).....	5 ml
Nitrato de chumbo a 2% (concentração final 3,6 mM, pH 7,2).....	3 ml

As incubações controles constituíram-se de:

1. Ausência de ATP no meio completo.
2. Ausência de $MgSO_4$ no meio completo.
3. Presença de oligomicina (0,04%) no meio completo.
4. Presença de NaF (0,1 M) no meio completo.

As técnicas utilizadas para fixação, desidratação, inclusão, ultramicrotomia e observação foram as mesmas relatadas para a detecção de fosfatases ácidas. Novamente, não se utilizou coloração dos cortes ultra-finos.

Para a pesquisa deste grupo enzimático a nível ultraestrutural foram utilizadas ninfas de 5º estadio.

III - RESULTADOS

1. Peroxidases

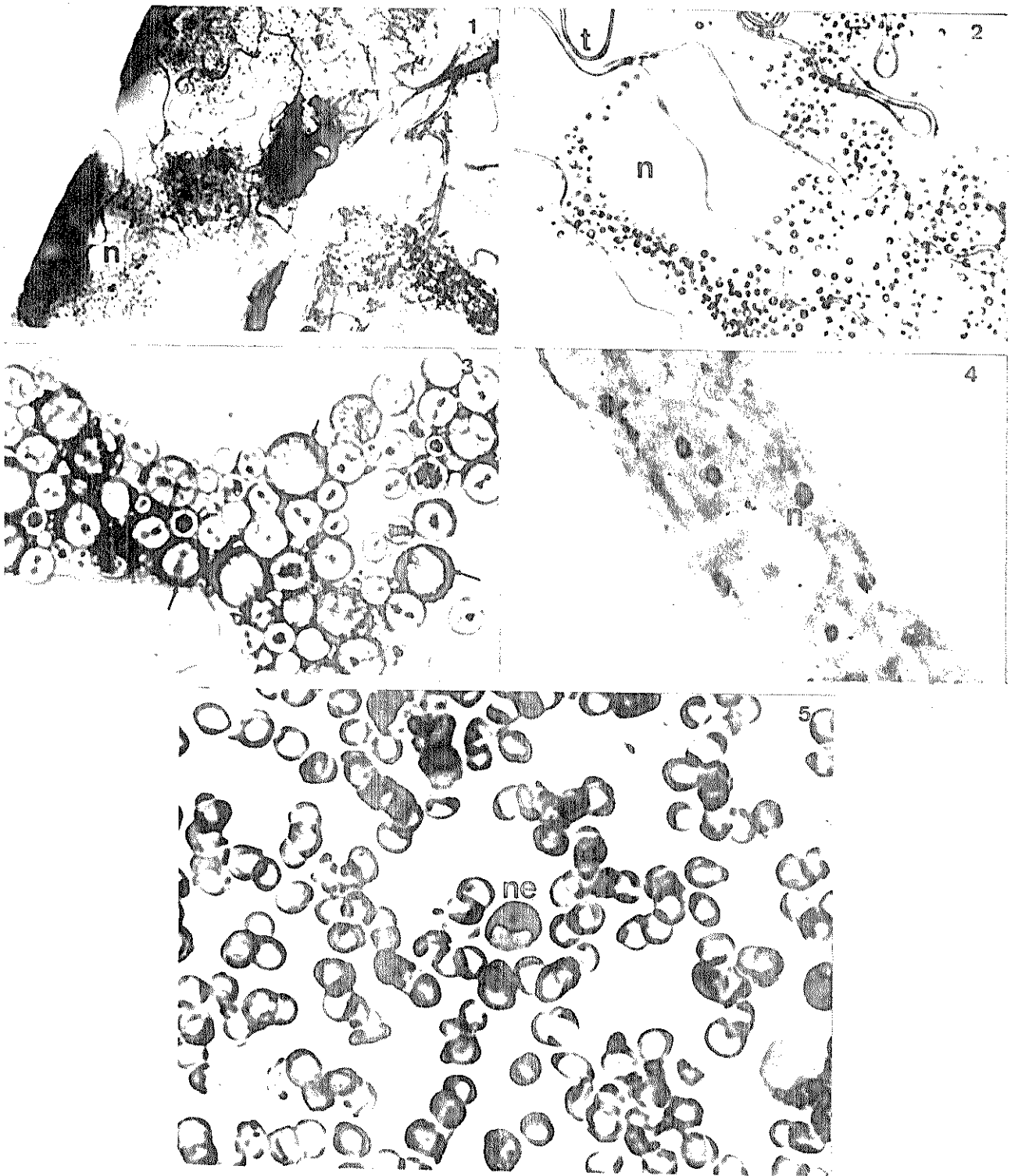
A nível fotônico foi observada reação positiva à benzidina no citoplasma da maioria das células da região distal dos túbulos de Malpighi (Figuras 1 e 2). Essa atividade apresentou-se tanto em ninfas de 5º estadio, como em adultos, na porção periférica de glóbulos de tamanhos variados (Figura 2). Em algumas preparações de ninfas de 5º estadio, os glóbulos apareceram bastante individualizados. Nos exemplares adultos, os glóbulos apresentaram-se às vezes, formando densos acúmulos. Neste caso pôde-se mesmo observar a imagem negativa dos núcleos. No lúmen da região distal dos túbulos de Malpighi não foi observada nenhuma resposta positiva.

Nas células da região proximal não se observou atividade peroxidásica, porém no lúmen dessa região constatou-se que granulações esféricas cristalinas com tamanho variado e estriações radiais internas, apresentaram sua porção externa (esfêrulas maiores) ou interna (esfêrulas menores)

FIGURAS 1 a 3 - Reatividade à benzidina em células de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*. Figuras 1 e 2. Células distais. n = imagem negativa nuclear. t = traquéia. Figura 1, X 430; Figura 2, X 1070. Figura 3 - Reação positiva em cristais de urato (setas) no lúmen da região proximal. X 1070.

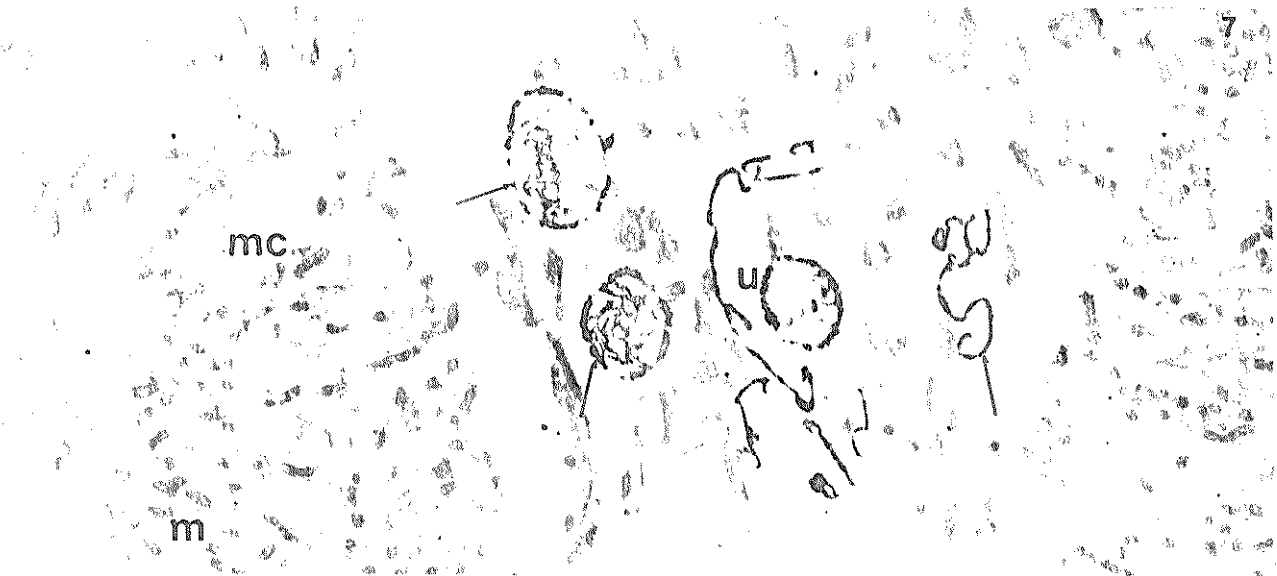
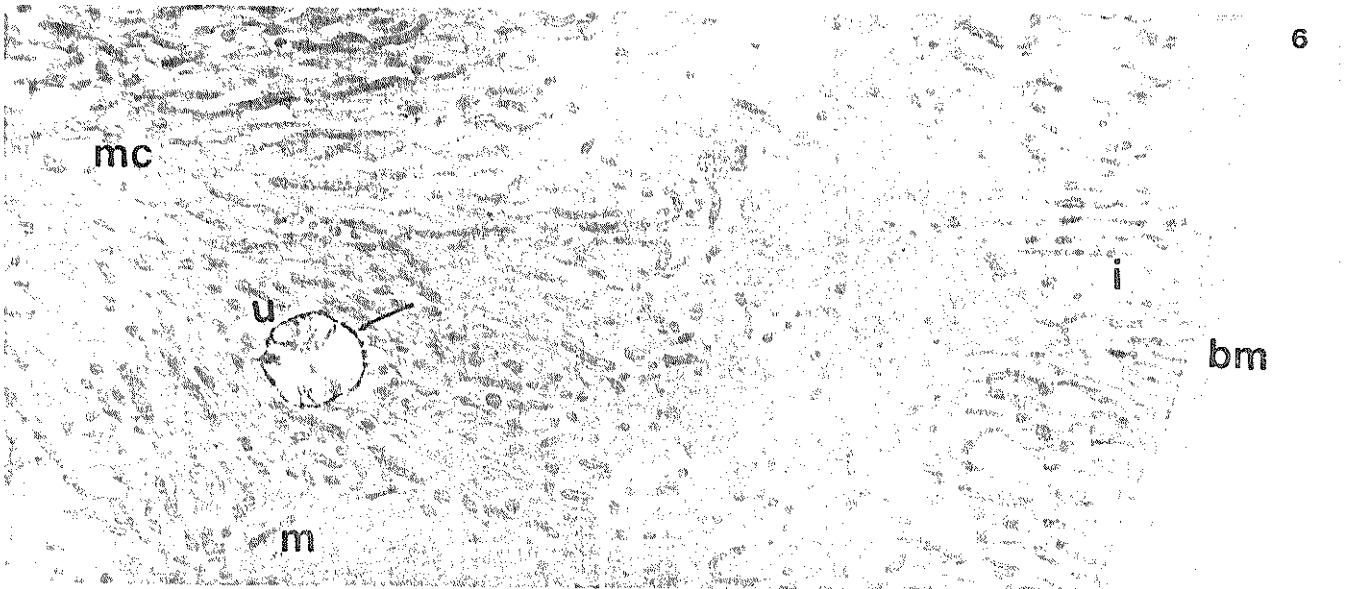
FIGURA 4 - Túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* submetido a tratamento controle (ausência do substrato) para detecção de reatividade à benzidina. Contracoloração com fucsina básica. n = núcleo. X 200.

FIGURA 5 - Atividade peroxidásica em neutrófilos (ne) de medula humana. X 800.



MF

FIGURAS 6 a 8 - Reatividade à benzidina na região proximal de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*. Observar coloração pela benzidina num material localizado na periferia de cristais de urato (setas). u = cristal de urato. mc = microvilosidades. bm = lâmina basal. i = invaginação do plasmalema. m = mitocôndrias. Figura 6, X 7800; Figura 7, X 8200; Figura 8, X 8000.



densamente coradas pela benzidina (Figura 3). Sabe-se através da literatura que esses esferulitos representam cristais de urato (WIGGLESWORTH, 1965; MELLO & DOLDER, 1979; MELLO & VIDAL, 1980).

O controle da reação foi realizado na ausência do substrato (benzidina), sendo a atividade peroxidásica totalmente abolida ao longo das células dos túbulos. A visível coloração dos núcleos dessas células foi proporcionada pelo uso da fucsina básica como corante de fundo (Figura 4).

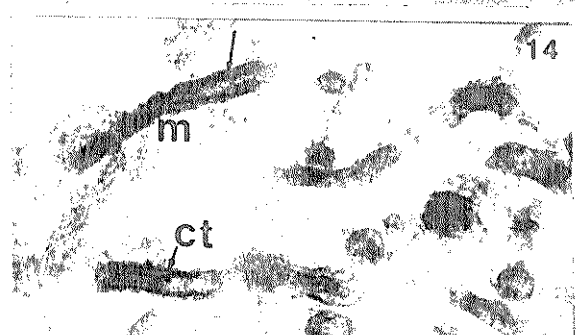
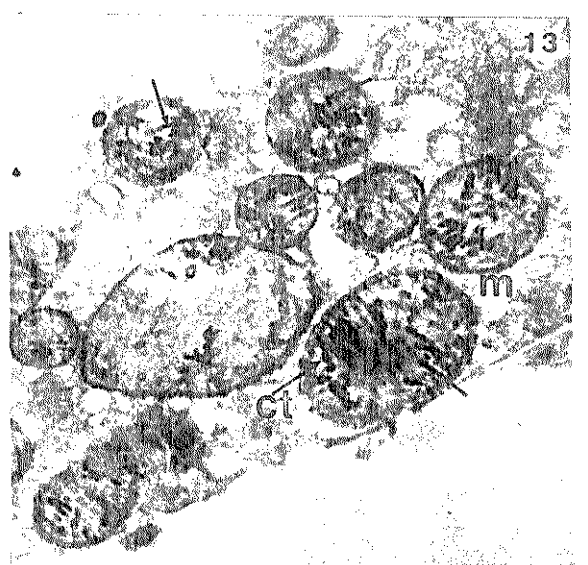
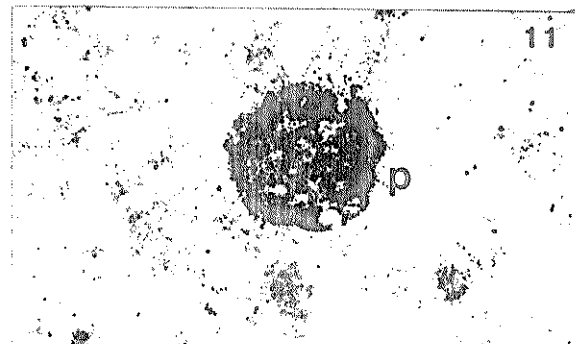
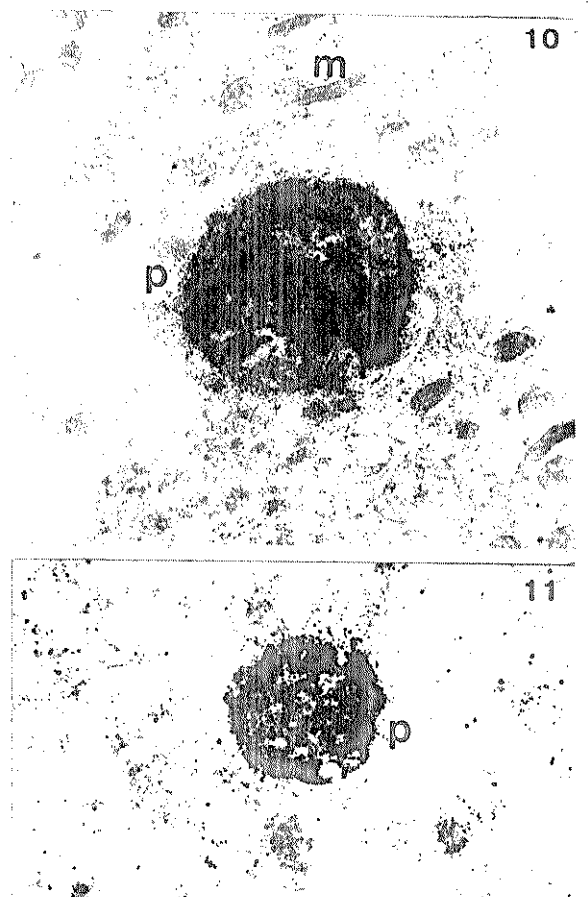
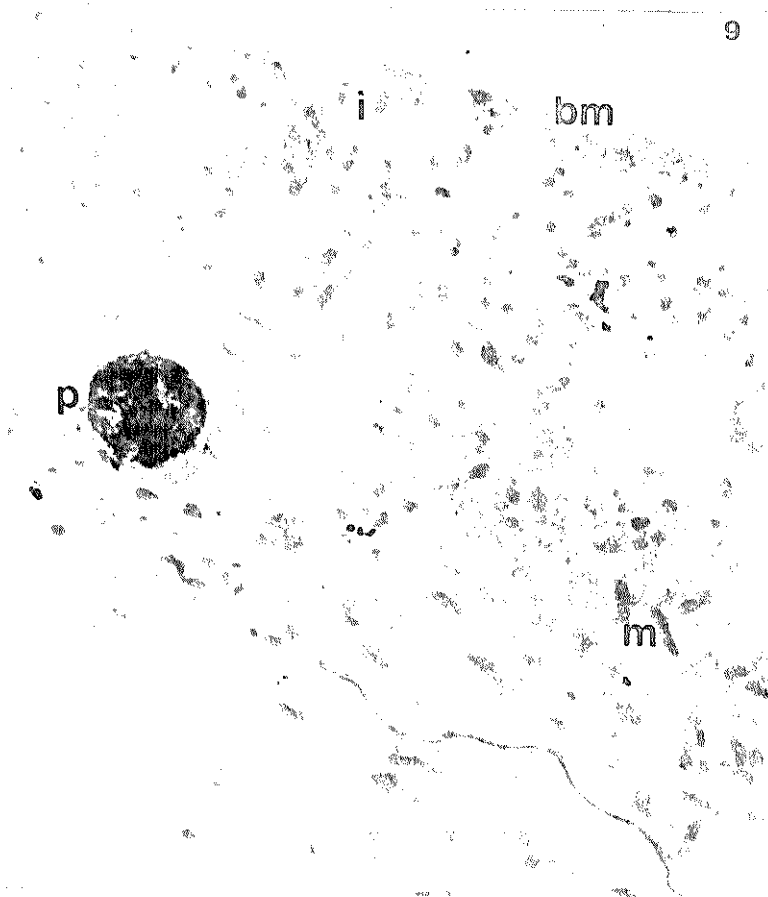
As células utilizadas como controle (leucócitos da medula humana), como esperado, apresentaram resposta peroxidásica positiva nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos (Figura 5).

A nível da microscopia eletrônica foram observados resultados semelhantes em ninfas de 5º estadio. Reatividade positiva à benzidina, quando o meio incubador apresentava pH 7,6, foi confirmada num material circundando os cristais de urato (Figuras 6, 7 e 8). Esse mesmo material apareceu também fragmentado no lúmen da própria região proximal, sob uma forma filamentosa (Figuras 7 e 8).

Na região distal dos túbulos reatividade à benzidina foi encontrada em algumas estruturas citoplasmáticas que devem tratar-se de microcorpos (peroxissomos). Estes provavelmente são os mesmos glóbulos citoplasmáticos que responderam ao método quando da pesquisa a nível fotônico (Figuras 9, 10 e 11).

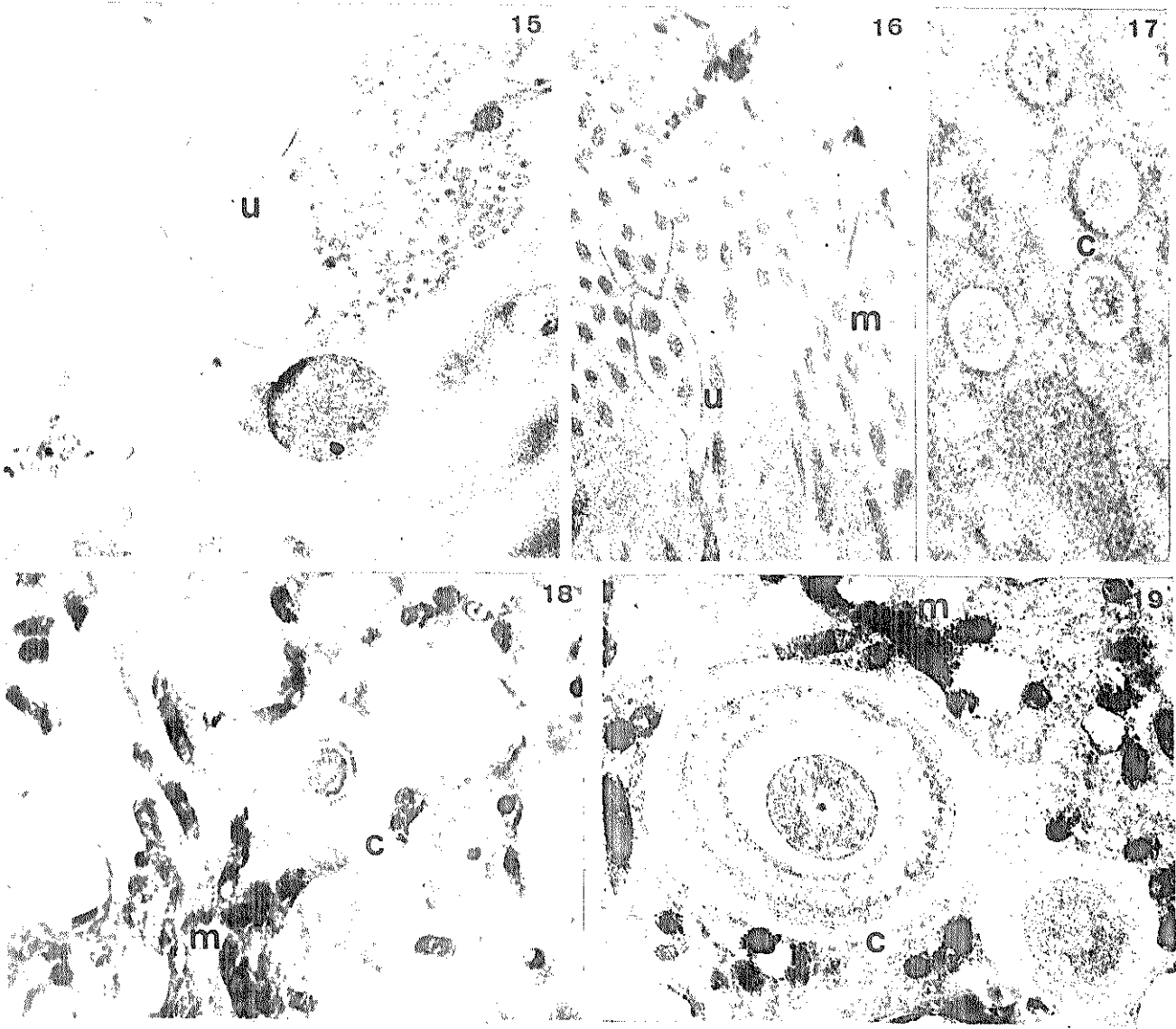
As "concreções" laminares, características do citoplasma da região distal, não apresentaram o produto da reação, isto é, composto insolúvel, corado e elétron-denso, resultante da redução da diaminobenzidina em presença de peróxido

FIGURAS 9 a 14 - Reatividade à benzidina na região distal do túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans*. Figuras 9 a 11 - Atividade em microcorpos (peroxissomos). p = microcorpo. m = mitocôndrias. bm = lâmina basal. i = invaginações do plasmalema. Figura 9, X 9700; Figura 10, X 19500; Figura 11, X 27000. Figura 12 - "Concreções" laminares sem resposta positiva ao método da benzidina. c = "concreções". b = bordo celular apical. m = mitocôndrias. X 17776. Figuras 13 e 14 - Mitocôndrias com cristas coradas pela benzidina (setas). m = mitocôndrias. ct = cristas. Figura 13, X 20700; Figura 14, X 20200.



FIGURAS 15 a 17 - Ausência de reatividade à benzidina em tubúlos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetidos à incubação sem substrato (DAB). Figuras 15 e 16. Região proximal. u = cristal de urato. m = mitocôndrias. Figura 15, X 16000. Figura 16, X 14500. Figura 17. Região distal. c = "concreções". X 23200.

FIGURAS 18 e 19 - Ausência de reatividade em "concreções" la-minares da região distal dos túbulos de Malpighi submetidos à incubação em meio a pH 9,0. m = mitocôndrias. c = "concreções". Figura 18, X 10000; Figura 19, X 15300.



ME

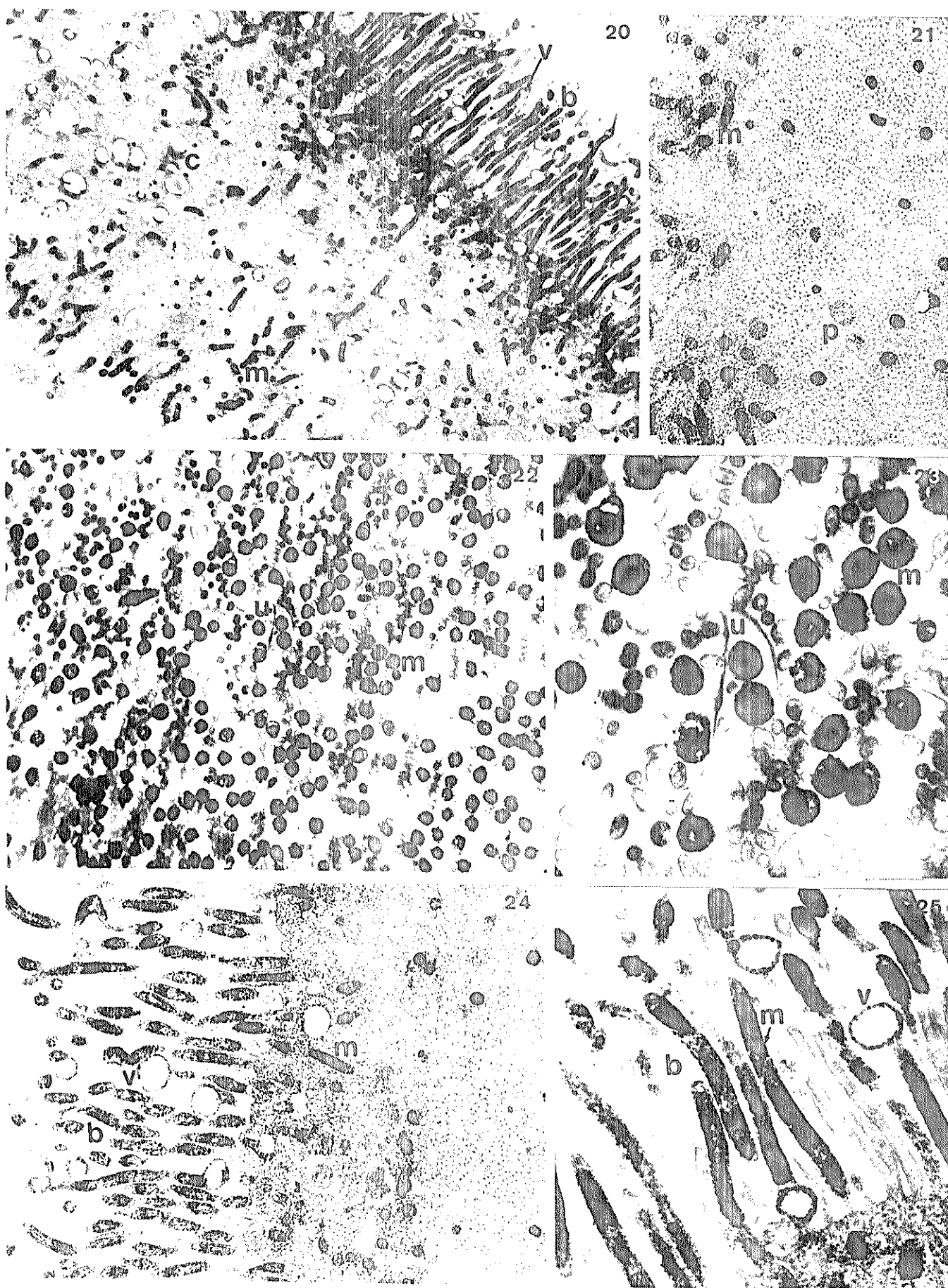
do de hidrogênio (DAB oxidado) (Figura 12). O mesmo pôde ser observado no material submetido ao meio de incubação a pH 9,0 (Figuras 18 e 19). Uma resposta positiva ao método da benzidina a pH 7,6 foi também observada entre as cristas mitocondriais, sendo ausente na matriz e no espaço entre a membrana interna e externa (Figuras 13 e 14).

Nos dois tipos de controles utilizados para essa reação, ausência do substrato (DAB) e presença do substrato e ausência de peróxido de hidrogênio, não se observou reação positiva nas cristas mitocondriais, assim como nos cristais de urato ou nas "concreções" laminares (Figuras 15, 16 e 17).

No material submetido ao meio de incubação a pH 9,0, pôde-se observar na região distal dos túbulos uma coloração mais acentuada nas mitocôndrias, não se podendo diferenciar as cristas da matriz mitocondrial. No bordo apical da região distal é notável a reatividade dessas organelas junto às microvilosidades (Figura 20). Neste caso, os microcorpos apresentaram-se tenuemente reativos (Figura 21). Na região proximal dos túbulos observaram-se corados fragmentos do material que aparece circundando os cristais de urato e mitocôndrias com forte resposta ao método (Figuras 22 e 23). Foi interessante notar a presença de formações vesiculares junto às microvilosidades da região distal (Figuras 20, 24 e 25).

Nos controles utilizados para o meio de incubação a pH 9,0, observou-se uma atividade menor nas mitocôndrias, podendo-se até mesmo se diferenciar as cristas da matriz mitocondrial quando na ausência de peróxido de hidrogênio e presença de DAB. Neste caso, o peróxido de hidrogênio apenas intensificou a reação (Figura 26) (NOVIKOFF & GOLDFISCHER, 1968; STELLY *et al.*, 1975; HAND, 1976). No material

FIGURAS 20 a 25 - Reatividade à benzidina em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetidos à incubação em meio a pH 9,0. Figuras 20 e 21 - Região distal. m = mitocôndrias. c = "concreções". p = microcorpos. v = vesículas. b = bordo celular apical. Figura 20, X 4000. Figura 21, X 10000. Figuras 22 e 23 - Região proximal. m = mitocôndrias. u = cristal de urato. X 3800; X 10200. Figuras 24 e 25 - Região distal (detalhes). m = mitocôndrias. v = vesículas. b = bordo celular apical. Figura 24, X 9800; Figura 25, X 17600.



ME

FIGURAS 26 a 28 - Túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetidos a diversos controles para atividade peroxidásica. Figura 26 - Ausência apenas de peróxido de hidrogênio no meio incubador, podendo-se diferenciar cristas mitocondriais (setas). X 9800. Figura 27 - Ausência apenas de diaminobenzidina (DAB). Região distal. X 9000. Figura 28 - Ausência de DAB e peróxido de hidrogênio. Região proximal. m = mitocôndrias. n = núcleo. X 9000.

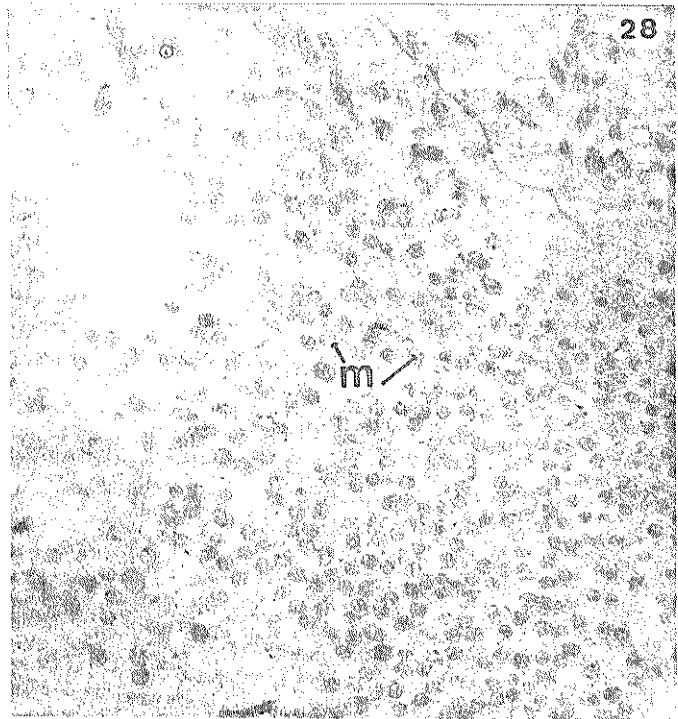
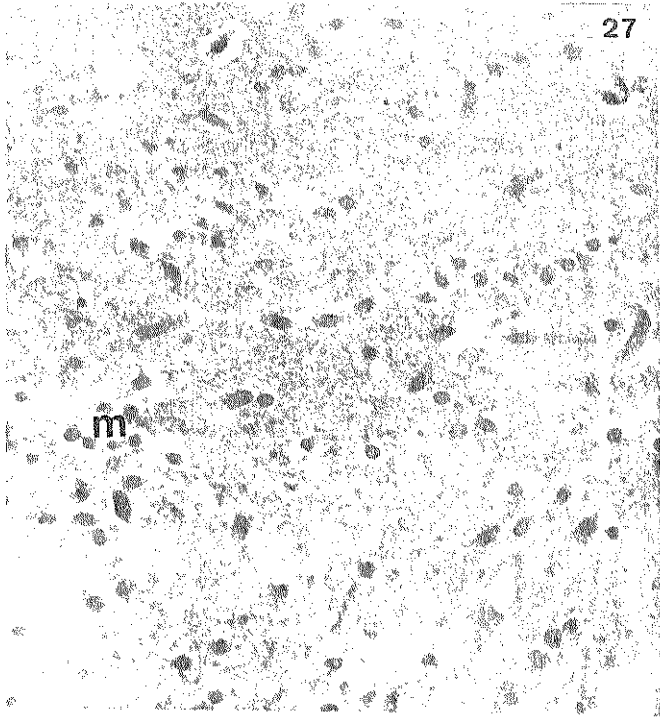
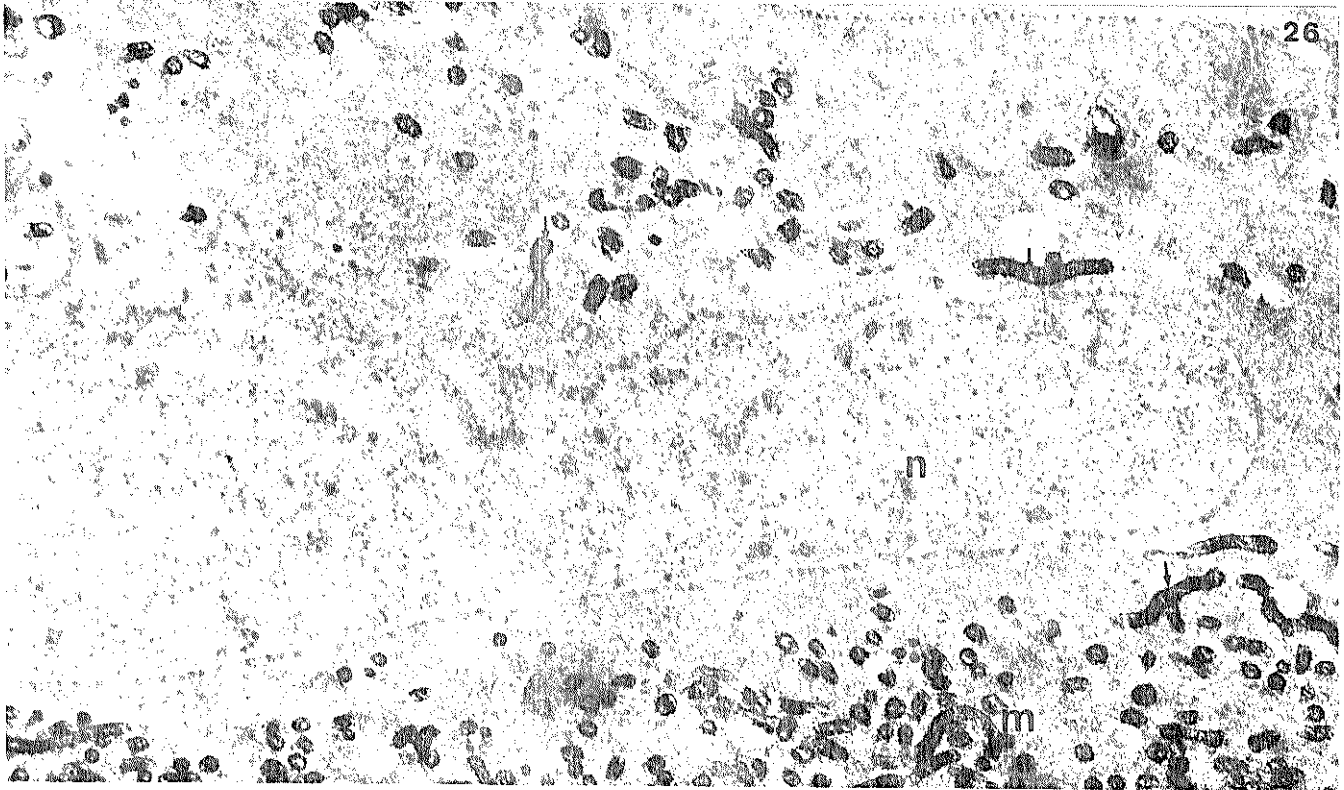


Tabela 1. Respostas ao método de benzidina em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*

Testes citoquímicos	Região dos túbulos de Malpighi	Resposta aos métodos		
		Citoplasma	Núcleo	Material do lúmen
A. Método de SATO (1928), segundo LISON (1960)	distal	+++ (glóbulos)	-	-
	proximal	-	-	+++ (periferia de cristais de urato)
B. A sem fornecimento de benzidina	distal	-	-	-
	proximal	-	-	-
C. A sem fornecimento de H_2O_2	distal	-	-	-
	proximal	-	-	-
D. GRAHAM & KARNOVSKY (1960)	distal	+++ (peroxissomos) ++ (mitocôndrias)	-	-
	proximal	++ (peroxissomos) ++ (mitocôndrias)	-	+++ (periferia de cristais de urato)
E. D sem DAB	distal	-	-	-
	proximal	-	-	-
F. D sem H_2O_2	distal	-	-	-
	proximal	-	-	-
G. D sem DAB e sem H_2O_2	distal	-	-	-
	proximal	-	-	-
H. NOVIKOFF & GOLDFISCHER (1969)	distal	++ (peroxissomos) +++ (mitocôndrias)	-	-
	proximal	+++ (mitocôndrias)	-	++
I. H sem DAB	distal	-	-	-
	proximal	-	-	-
J. H sem H_2O_2	distal	++ (mitocôndrias)	-	-
	proximal	++ (mitocôndrias)	-	-
K. H sem DAB e sem H_2O_2	distal	-	-	-
	proximal	-	-	-

+++ - Resposta altamente positiva

++ - Resposta moderadamente positiva

- - Resposta negativa

incubado na ausência de DAB e presença de peróxido de hidrogênio, assim como na ausência desses dois componentes do meio, não se observou atividade positiva à benzidina em qualquer das organelas de ambas as regiões dos túbulos de Malpighi (Figuras 27 e 28). Os dados relativos à reação à benzidina acham-se resumidos na Tabela I.

2. Desidrogenases succínicas

A atividade desidrogenásica succínica foi observada no citoplasma das células dos túbulos de Malpighi de ninfas recém-alimentadas de 3º e 5º estádios. Foi detectada pela observação a nível fotônico de depósitos microcristalinos azul-violeta de formazana. Tem sido demonstrado que as desidrogenases succínicas situam-se nas mitocôndrias (HOGEBOOM *et alii*, 1946; PALADE, 1952; SJÖSTRAND & RHODIN, 1953; PEARSE & SCARPELLI, 1958; HESS *et alii*, 1958 a, b; SCARPELLI *et alii*, 1958; WEBER, 1980; MARINOS e BILLETT, 1981). Os dados obtidos neste trabalho, portanto, acham-se intimamente relacionados com a presença dessas organelas.

Nas células distais dos túbulos de Malpighi de ninfas de 3º estádio, observou-se uma maior atividade dessa enzima nas porções celulares apicais. Os grânulos de formazana concentraram-se na parte central dos túbulos, formando às vezes, densa massa compacta (Figuras 29 e 30). Essa observação encontra apoio em dados de microscopia eletrônica que salientam uma maior concentração das mitocôndrias nessa região das células distais de ninfas jovens e de 5º estádio de *Triatoma infestans* (MELLO & DOLDER, 1977 e 1979).

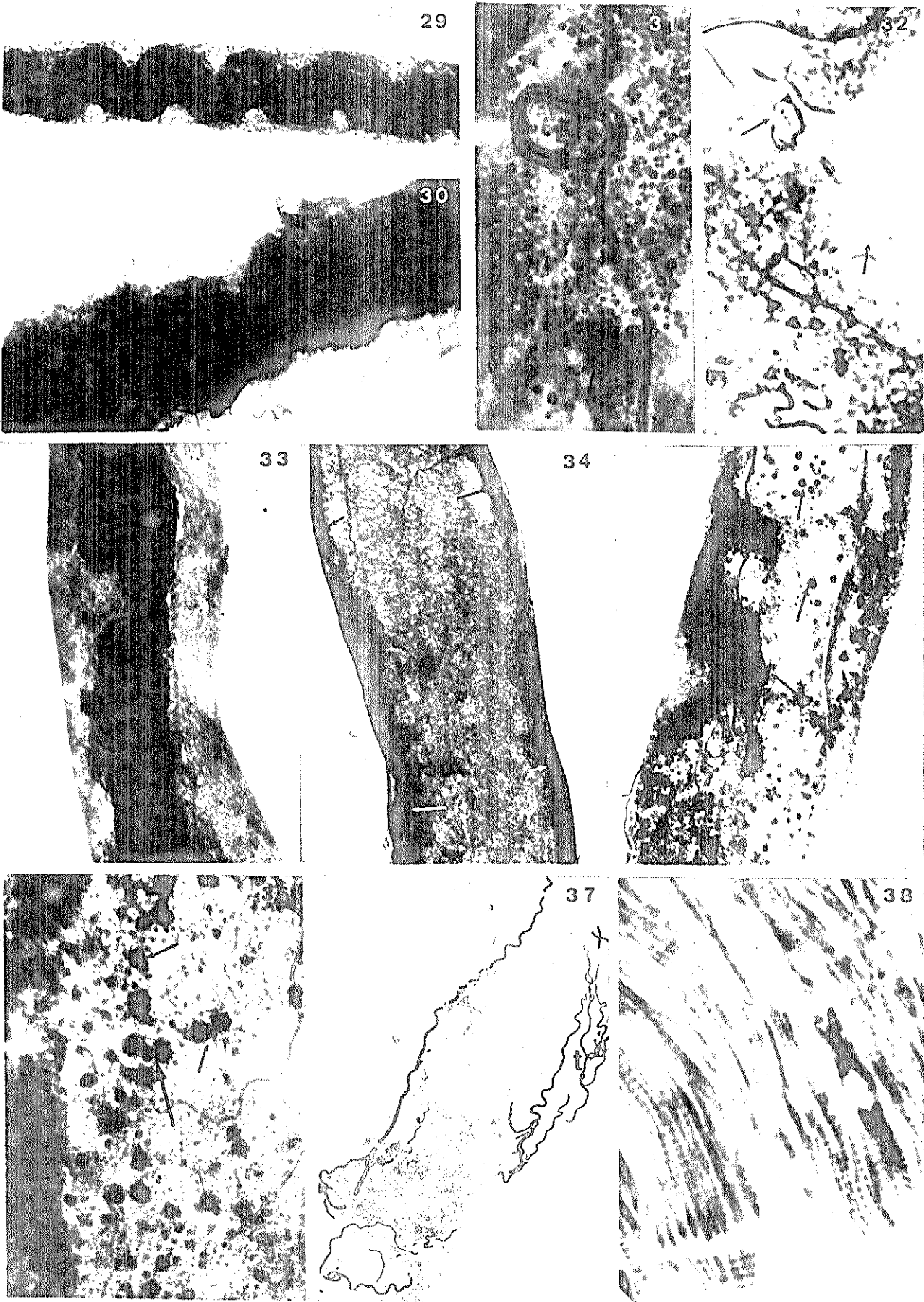
Observou-se também reação positiva em alguns glóbulos citoplasmáticos pequenos, onde o material corado apareceu apenas em sua superfície ou em sua totalidade (Figura

FIGURAS 29 a 33 - Atividade desidrogenásica succínica em células distais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*. Figura 29 - Ninfa de 3º estadio. Reação intensamente positiva na região celular apical. X 300. Figura 30 - Detalhe. X 400. Figura 31 - Reação positiva em glóbulos citoplasmáticos (setas). t = traquéia. X 1500. Figura 32 - Glóbulos citoplasmáticos com resposta negativa ao método citoquímico (setas). X 1300. Figura 33 - Atividade desidrogenásica succínica na região celular apical. Ninfa de 5º estadio. X 300.

FIGURAS 34 a 36 - Atividade desidrogenásica succínica em células proximais dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*. Figura 34 - Ninfa de 3º estadio. Reação mais intensa na porção basal celular (setas). X 240. Figura 35 - Grumos (setas) intensamente corados. X 500. Figura 36 - Detalhe. X 790.

FIGURA 37 - Ausência da atividade desidrogenásica succínica nos túbulos de Malpighi submetidos a controle sem substrato (succinato de sódio). t = traquéia. X 200.

FIGURA 38 - Atividade desidrogenásica succínica em músculo cardíaco de camundongo. X 1300.



31). Outros glóbulos, porém, maiores, não se apresentaram corados (Figura 32).

Nas células distais de ninfas de 5º estadio não foram encontradas diferenças básicas em relação às do 3º estadio (Figura 33).

Nas células proximais dos túbulos de Malpighi de ninfas de 3º estadio, foi observada reação positiva com maior intensidade na região basal celular (Figura 34). Este achado está também de acordo com o fato de que, nessas células, as mitocôndrias estão mais concentradas na porção basal (MELLO & DOLDER, 1977 e 1979). O mesmo tipo de achado foi constatado em ninfas de 5º estadio. Também nas células proximais de ninfas de 3º estadio foi observada, eventualmente, a ocorrência de grumos corados, espalhados no citoplasma (Figuras 35 e 36).

O controle da reação foi realizado na ausência do substrato (succinato de sódio), sendo a atividade desidrogenásica succínica abolida tanto na região proximal como distal dos túbulos, regiões essas onde a localização mitocondrial é mais acentuada. Apenas poucos grânulos dispersos apresentaram coloração (Figura 37).

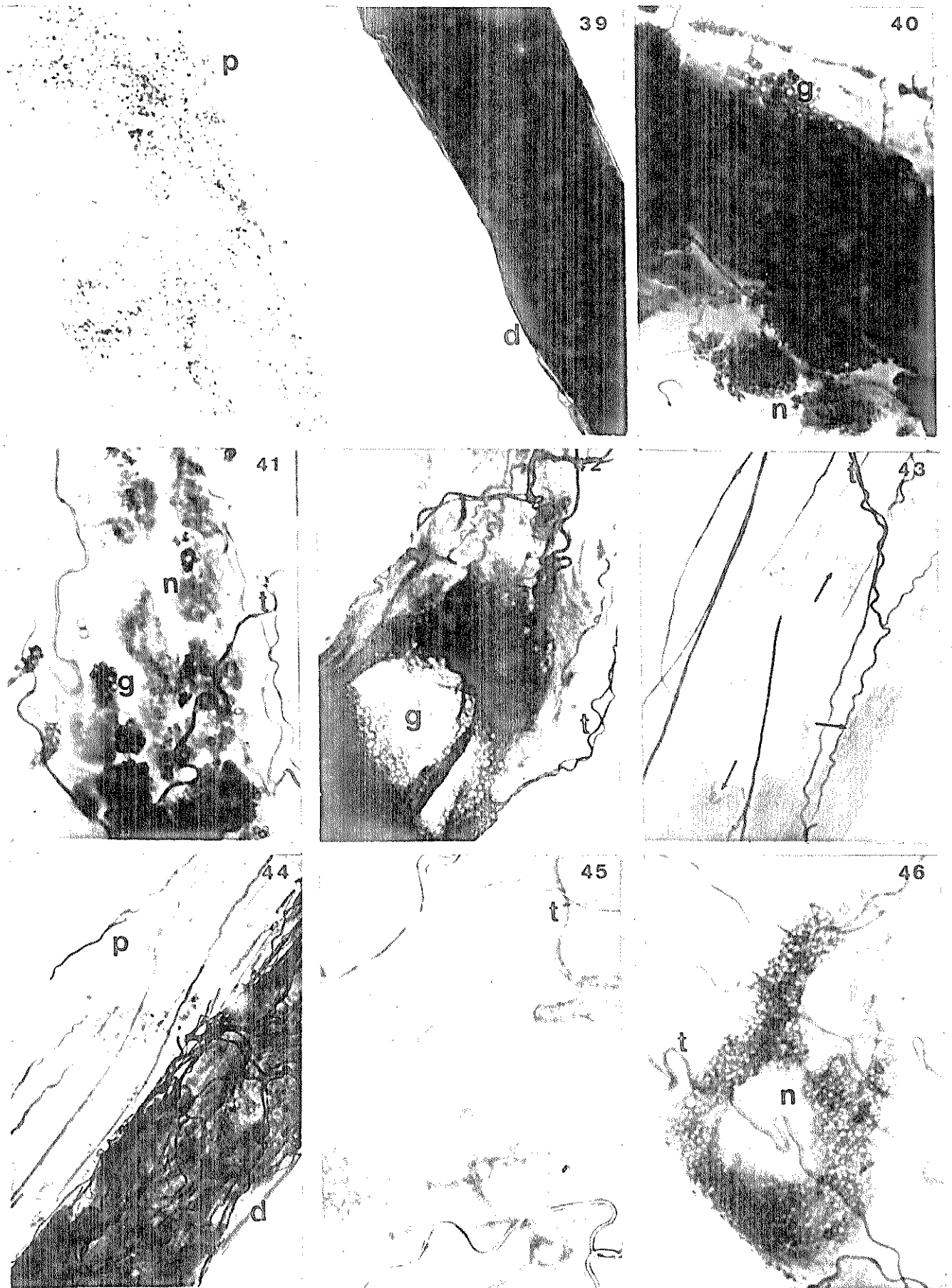
O órgão utilizado como controle, músculo cardíaco de camundongo, apresentou resposta desidrogenásica succínica positiva. Neste caso, foram também observados grânulos de formazana sobre as mitocôndrias características desse órgão (Figura 38).

3. Fosfatases alcalinas

Em ninfas de 3º estadio foi observada distribuição da atividade fosfatásica alcalina no citoplasma das células.

FIGURAS 39 a 44 - Atividade fosfatásica alcalina em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*. Figuras 39 a 41 - Ninfas de 3º estadio. Figuras 42 a 44 - Indivíduos adultos. Figura 39 - Região distal (d) e proximal (p). Notar fina granulação no citoplasma da região proximal. X 570. Figuras 40 e 41 - Células distais com reação positiva em glóbulos citoplasmáticos (g). n = núcleo. t = traquéia. Figura 40, X 740; Figura 41, X 740. Figura 42 - Região distal com parte dos glóbulos não reativos (g). t = traquéia. X 370. Figura 43 - Região proximal com reação citoplasmática negativa. Observar uma ligeira atividade fosfatásica alcalina nos núcleos (setas). X 370. Figura 44 - Região distal (d) e proximal (p). t = traquéia. X 370.

FIGURAS 45 e 46 - Túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* de ninfas de 5º estadio submetidos a controles para a reação fosfatásica alcalina (região distal). Figura 45 - Ausência de resposta positiva quando os preparados foram incubados na ausência de sulfato de magnésio. X 920. Figura 46 - Ausência de resposta positiva (exceto na região limite entre alguns glóbulos) quando os preparados foram incubados na ausência de Beta-glicerofosfato de sódio. n = imagem negativa do núcleo. t = traquéia. X 920.



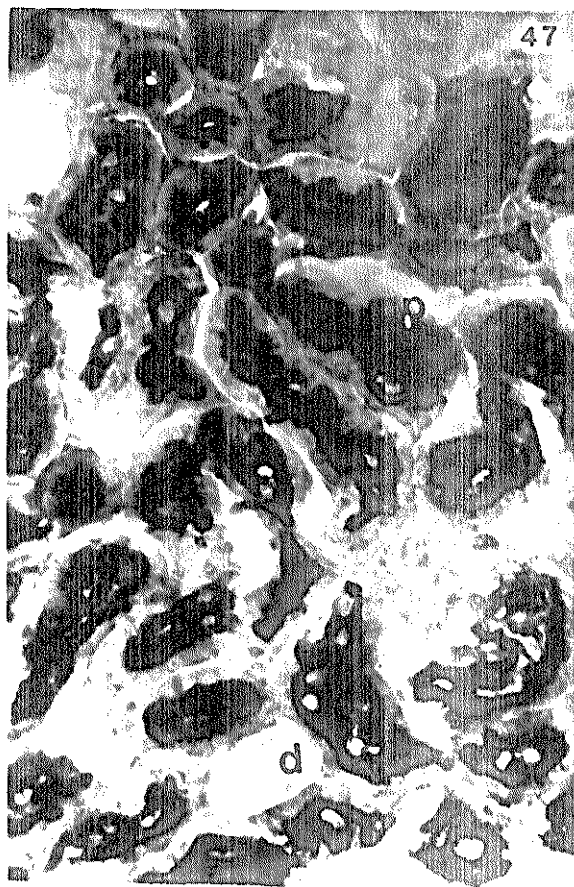
las distais, fazendo parte de glôbulos (Figuras 39, 40 e 41). Alguns destes apareceram totalmente positivos à reação. Outros mostraram reatividade na sua periferia ou ausência de reação. Na sua maioria, os glôbulos citoplasmáticos não reagiram totalmente de modo positivo ao método. As regiões extremamente escuras que aparecem nas Figuras 39 e 40 se devem à sobreposição de material não só citoplasmático, mas também, nuclear. Os núcleos apresentaram geralmente, atividade fosfatásica alcalina positiva, tanto na heterocromatina, como na eucromatina (Figuras 40 e 41).

A região proximal dos túbulos apresentou como resposta uma fina granulação no citoplasma (Figura 39). Não foram observadas imagens nucleares altamente positivas ao método.

Quanto aos túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio e de adultos, os resultados foram semelhantes aos de 3º estadio, no que se refere à presença de glôbulos citoplasmáticos com diferente reação ao método na região distal (Figura 42). Algumas áreas dos túbulos (região proximal) apresentaram um citoplasma homogeneamente não reativo ao método (Figuras 43 e 44). Algumas vezes houve uma fraca sugestão de reatividade nos núcleos das células dessas áreas (Figura 43).

Quando os túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio foram submetidos ao meio incubador na ausência do substrato (Beta-glicerofosfato de sódio) a atividade fosfatásica alcalina presente em parte dos glôbulos citoplasmáticos da região distal do órgão, praticamente foi abolida, se comparada ao controle incubado na presença do substrato. Apenas uma reação levemente positiva apareceu no limite de alguns glôbulos contíguos, sendo nítida a imagem negativa dos núcleos (Figura

FIGURAS 47 e 48 - Atividade fosfatásica alcalina na região celular apical dos túbulos contornados proximais (p) de rim de camundongo, bem como nos nucléolos (setas), das células dessa região. Observa-se também a ausência de tal atividade enzimática nas células dos túbulos contornados distais (d). Figura 47, X 300; Figura 48, X 740.



MF

46). O mesmo resultado foi obtido quando na presença do substrato, mas ausência do sulfato de magnésio (Figura 45).

O órgão utilizado como controle da reação, rim de camundongo, visto em cortes transversais (zona cortical), apresentou reação positiva de aspecto denso e uniforme ao nível do bordo apical das células epiteliais dos túbulos contornados proximais (região próxima à luz dos túbulos) (Figuras 47 e 48). Esta localização se supõe estar vinculada aos intensos processos de absorção que ocorrem na superfície das microvilosidades existentes em grande quantidades nessas células (DI FIORE *et alii*, 1973). Os dados relativos à reação para fosfatases alcalinas acham-se resumidos na Tabela II.

4. Fosfatases ácidas

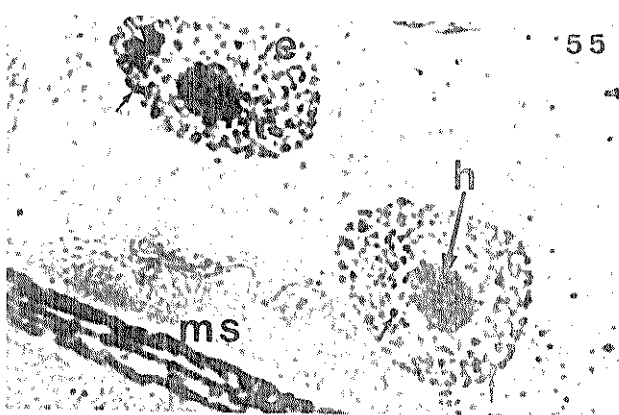
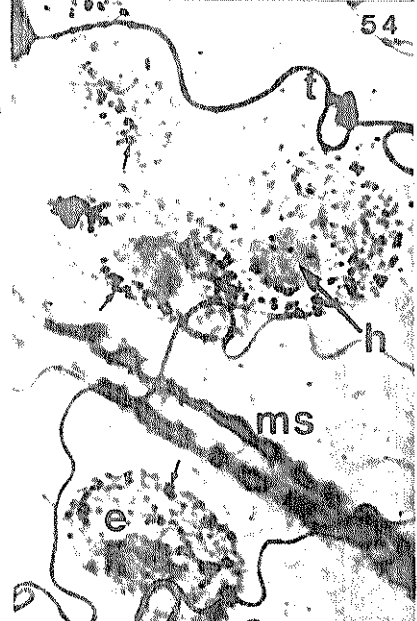
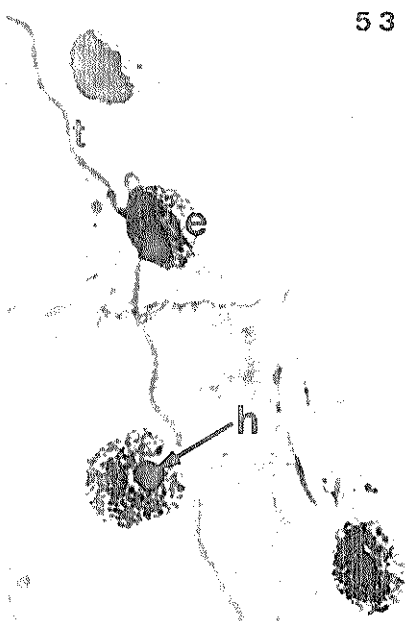
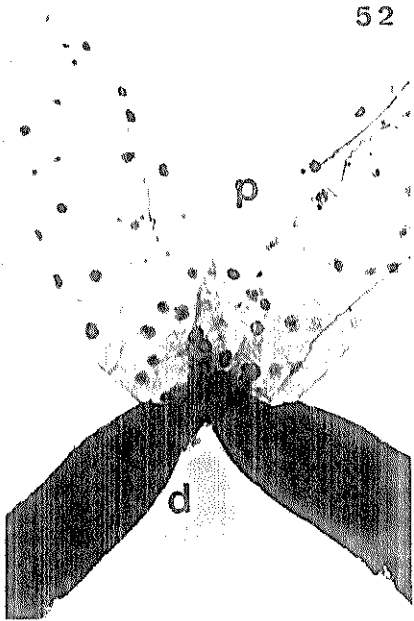
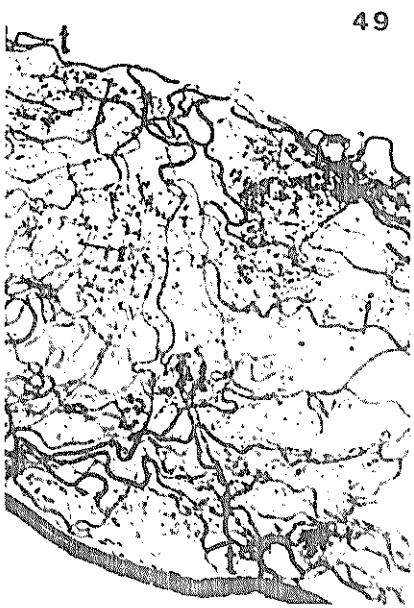
Os túbulos de Malpighi, tanto de ninfas de 3º como de 5º estadio mostraram, a nível de microscopia fotônica, atividade fosfatásica ácida contida em glóbulos ou grânulos citoplasmáticos (Figuras 49, 50 e 51). A concentração dos glóbulos foi sempre maior na região distal dos túbulos, onde inclusive o seu tamanho muitas vezes, mostrou ser variável (Figura 51). Na região proximal dos túbulos observou-se distribuição homogênea de grânulos finos (Figura 50) a qual se estendia através da superfície de todo o túbulo (abrangendo também a sua região distal) ou então total ausência dos mesmos (Figuras 52, 53, 56 e 58). Algumas vezes, a precipitação de sulfeto de chumbo na região distal foi muito intensa praticamente mascarando a individualidade dos glóbulos (Figura 52).

Os núcleos da região proximal sempre apresentaram alguma atividade fosfatásica ácida. Esta foi observada:

1. Predominantemente na região heterocromática (Figuras 52 e 53).

FIGURAS 49 a 52 - Atividade fosfatásica ácida em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*. Figuras 49 e 51 - Região distal de 3º e 5º estadio, respectivamente. Observar grânulos ou glôbulos citoplasmáticos com resposta positiva (setas). n = imagem negativa nuclear. t = traquéia. Figura 49, X 340; Figura 51, X 920. Figura 50 - Região proximal. Fina granulação positiva ao método. 5º estadio. t = traquéia. X 580. Figura 52 - Regiões distal (d) e proximal (p). Na região proximal os núcleos aparecem intensamente reativos. 5º estadio. X 90.

FIGURAS 53 a 56 - Atividade fosfatásica ácida em núcleos de células proximais. Figura 53 - Reação positiva predominantemente na região heterocromática (h). 5º estadio. e = eucromatina. t = traquéia. X 580. Figuras 54, 55 e 56 - Reação positiva predominantemente na região eucromática (setas menores). h = heterocromatina. e = eucromatina. ms = musculatura. t = traquéia. Figuras 54 e 55 - 5º estadio. Figura 56 - 3º estadio. Figura 54, X 920. Figura 55, X 920. Figura 56, X 1050.



MF

2. Predominantemente na região eucromática (Figuras 54, 55 e 56).

3. Tanto na eucromática como na heterocromática (Figuras 57 e 58). Neste caso, às vezes, parece que a reatividade na zona heterocromática está localizada mais em sua periferia.

As observações referentes aos núcleos não se devem à difusão de enzimas citoplasmáticas pois, são também constatadas em núcleos isolados ou em zonas da região proximal em que não se verifica presença de grânulos citoplasmáticos (Figuras 52, 53 e 57).

Próximo à zona de transição distal-proximal, alguns núcleos com morfologia correspondente à da região proximal não se mostraram intensamente reativos (Figura 62).

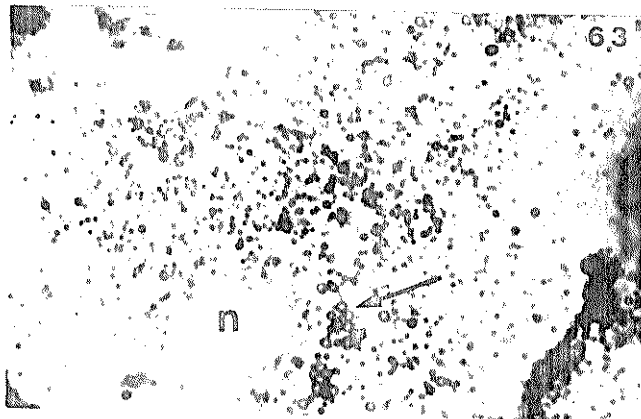
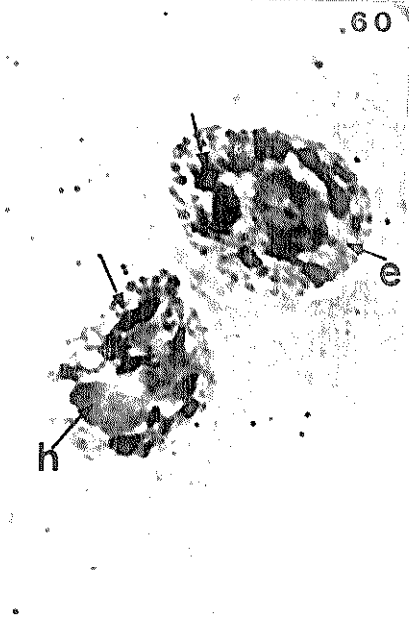
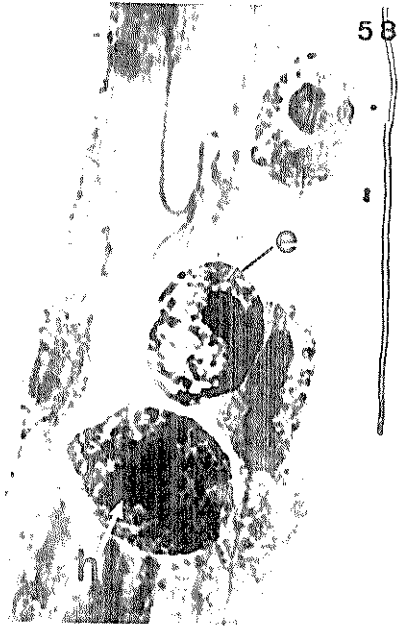
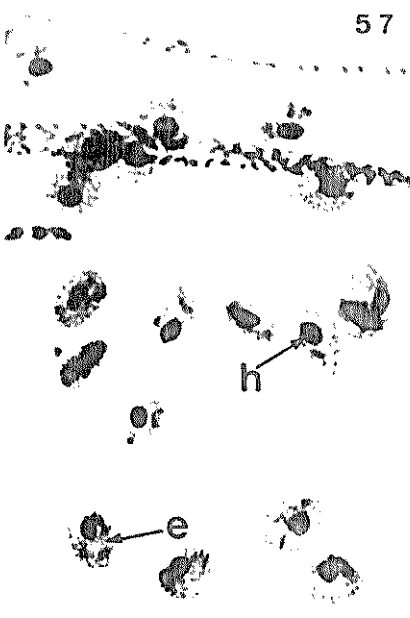
Quanto aos núcleos da região distal das ninfas de 5º estadio, observou-se reação positiva predominantemente na eucromatina, às vezes sob forma de grumos (Figuras 59, 60 e 61). Em alguns casos não se observou reação positiva nos núcleos da região distal (Figura 51).

Os túbulos de Malpighi quando tratados com solução incubadora na ausência de substrato (Beta-glicerofosfato de sódio), não apresentaram resposta positiva para a maioria dos glóbulos e/ou grânulos citoplasmáticos (Figura 63). Apenas alguns poucos glóbulos exibiram uma fraca precipitação de sulfeto de chumbo na sua superfície. Nenhuma precipitação foi encontrada nos núcleos.

O órgão controle, rim de camundongo, visto em corte transversal (zona cortical) apresentou, como para o caso das fosfatases alcalinas, resposta positiva nos túbulos contornados proximais e ausência de atividade enzimática nos

FIGURAS 57 a 62 - Atividade fosfatásica ácida em núcleos de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans*. Figuras 57 e 58 - Núcleos de células proximais de ninfa de 5º estadio. A reatividade nestes casos se apresenta na eucromatina (e) e porção periférica da heterocromatina (h). Figura 57, X 420; Figura 58, X 920. Figuras 59, 60 e 61 - Núcleos de células distais de ninfa de 5º estadio. Reatividade predominante na região eucromática (setas). h = heterocromatina. e = eucromatina. Figura 59, X 920; Figura 60, X 920; Figura 61, X 920. Figura 62 - Núcleos na região de transição distal-proximal. 5º estadio. h = heterocromatina. e = eucromatina. X 580.

FIGURA 63 - Região citoplasmática de células de túbulo de Malpighi de ninfa de 5º estadio de *Triatoma infestans*, incubado na ausência de Beta-glicerofosfato de sódio (controle da reação para fosfatase ácida). Observar ausência de reatividade na maioria dos glóbulos (seta). n = imagem negativa do núcleo. X 920.



MF

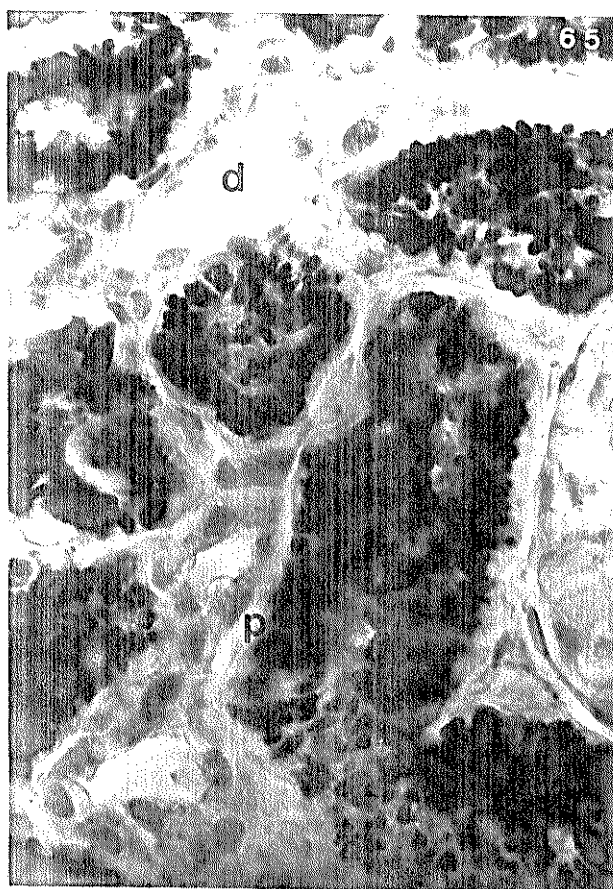
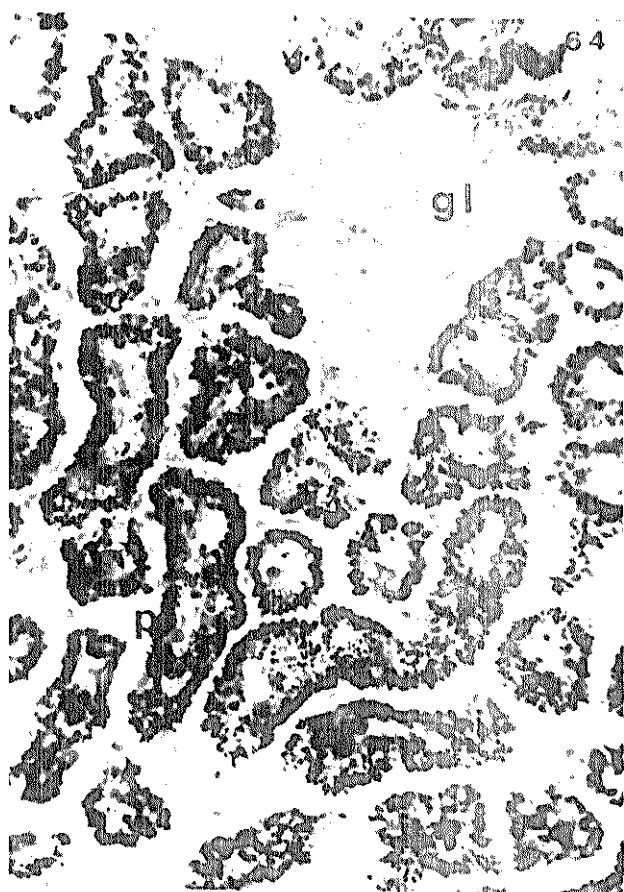
túbulos contornados distais e glomérulos (Figuras 64 e 65). No caso das fosfatases ácidas, porém, há uma distribuição seletiva nos túbulos contornados, mas com uma localização intracelular. Sua presença, relacionada com a existência de lisossomos, considera-se vinculada à degradação dos materiais reabsorvidos como em outros órgãos (GÖMÖRI, 1941; DI FIORE *et alii*, 1973).

Os achados para a atividade fosfatásica ácida a nível de microscopia eletrônica confirmaram os dados da microscopia fotônica.

Na região distal, as "concreções" laminares apresentaram nítida resposta ao método (Figuras 66, 67 e 79) variando apenas quanto ao grau de intensidade. Lisossomos foram também detectados nessa região (Figuras 68 e 69). Na maioria das vezes a lâmina basal da região distal bem como as invaginações do plasmalema apresentaram também nítida atividade enzimática (Figuras 70, 71 e 72). Algumas áreas dessa região, no entanto, não mostraram atividade na lâmina basal e invaginações do plasmalema (Figuras 66 e 79). Células de traquêias em contato com os túbulos também mostraram atividade enzimática (Figuras 70 e 71), confirmando as observações a nível fotônico (Figuras 49 e 50).

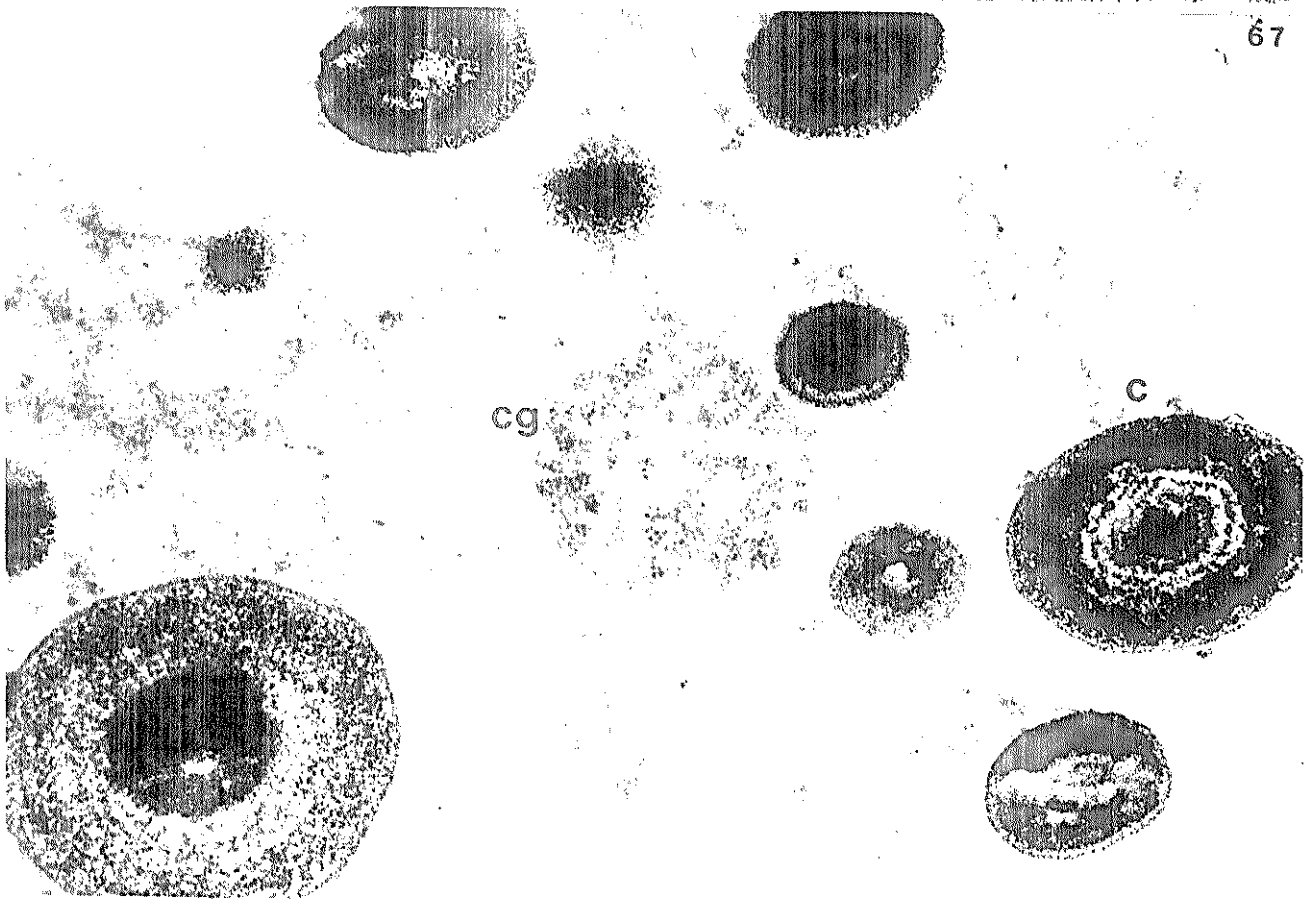
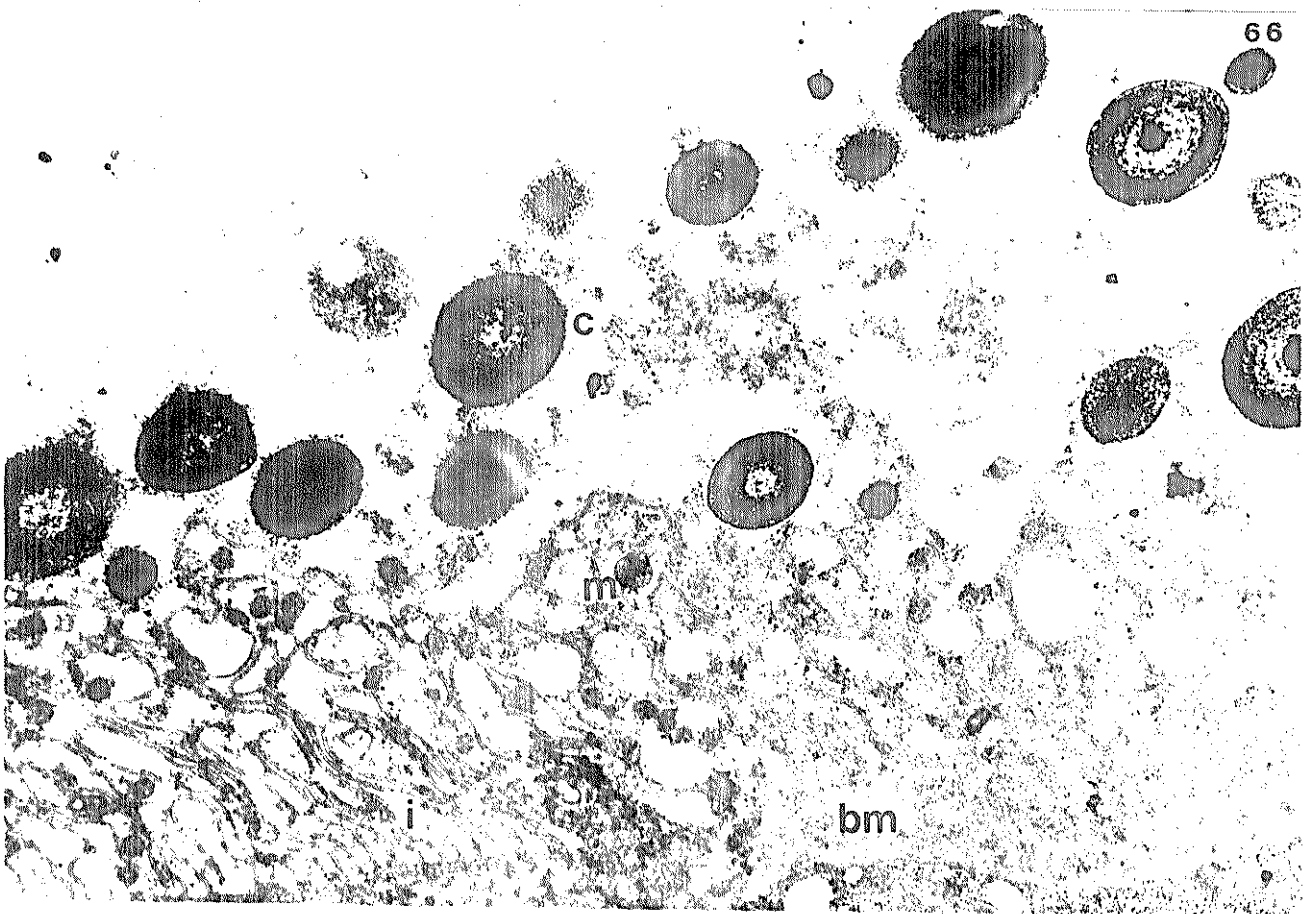
Foi também demonstrada atividade fosfatásica ácida nos núcleos das células da região proximal dos túbulos. Esta foi observada predominantemente em toda a região heterocromática, no nucléolo e em parte da eucromatina (Figuras 73, 74 e 75). No nucléolo o precipitado foi muito fino, nem sempre presente em toda sua extensão (Figuras 74 e 75). Foi observada uma menor atividade na cromatina compacta próxima ao envólucro nuclear principalmente quando esses núcleos aparecem cortados

FIGURAS 64 e 65 - Atividade fosfatásica ácida positiva em túbulos contornados proximais (p) e negativa em túbulos contornados distais (d) e glomérulos (gl) de rim de camundongo. Figura 64, X 300; Figura 65, X 740.

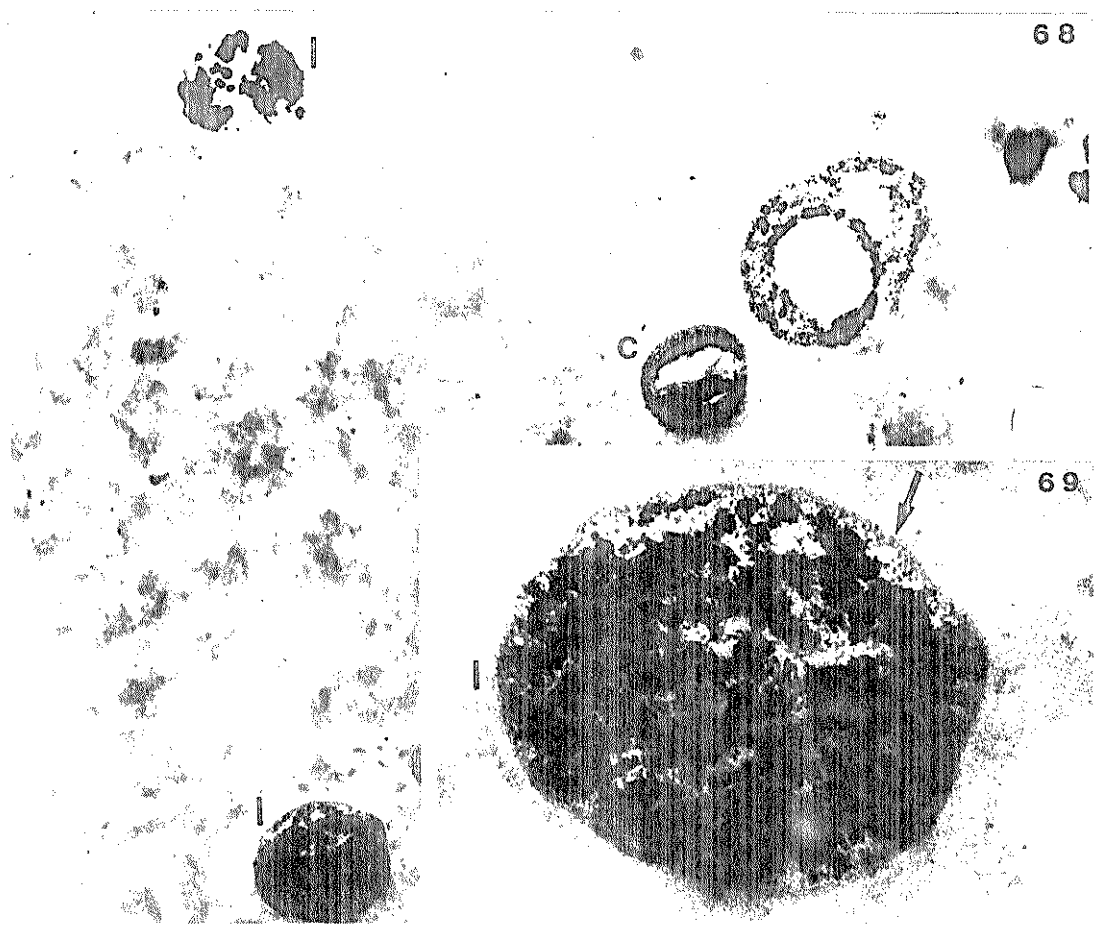


MF

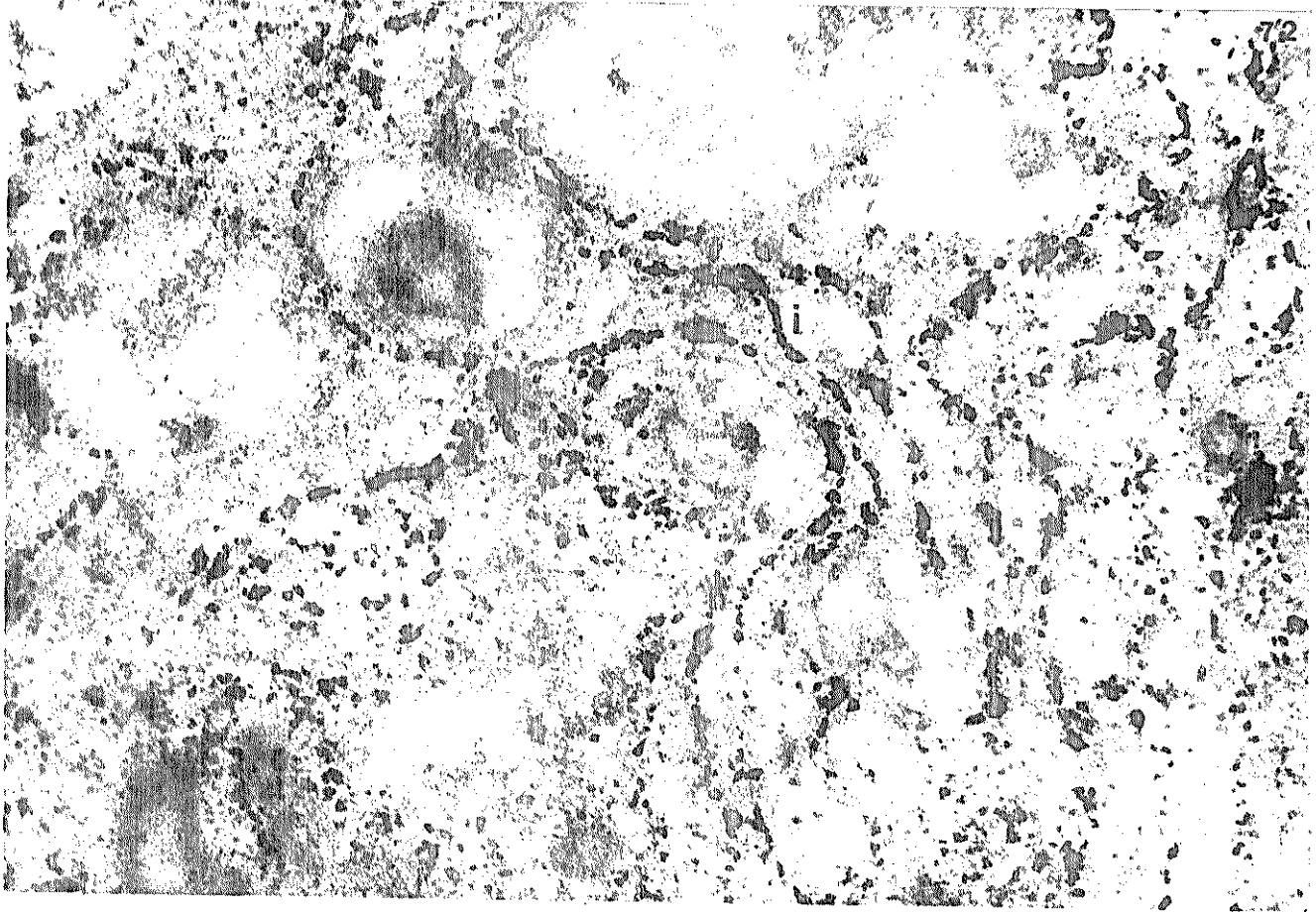
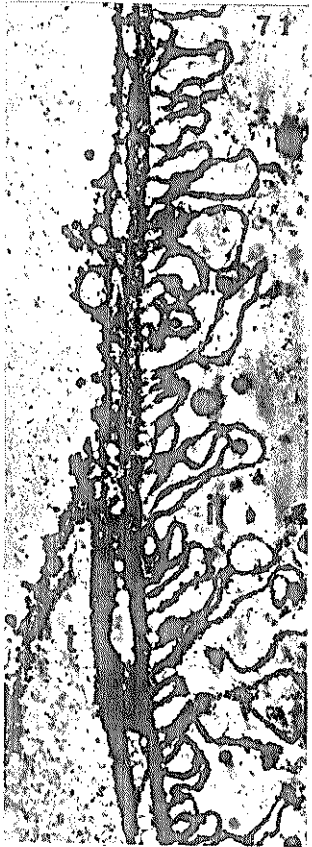
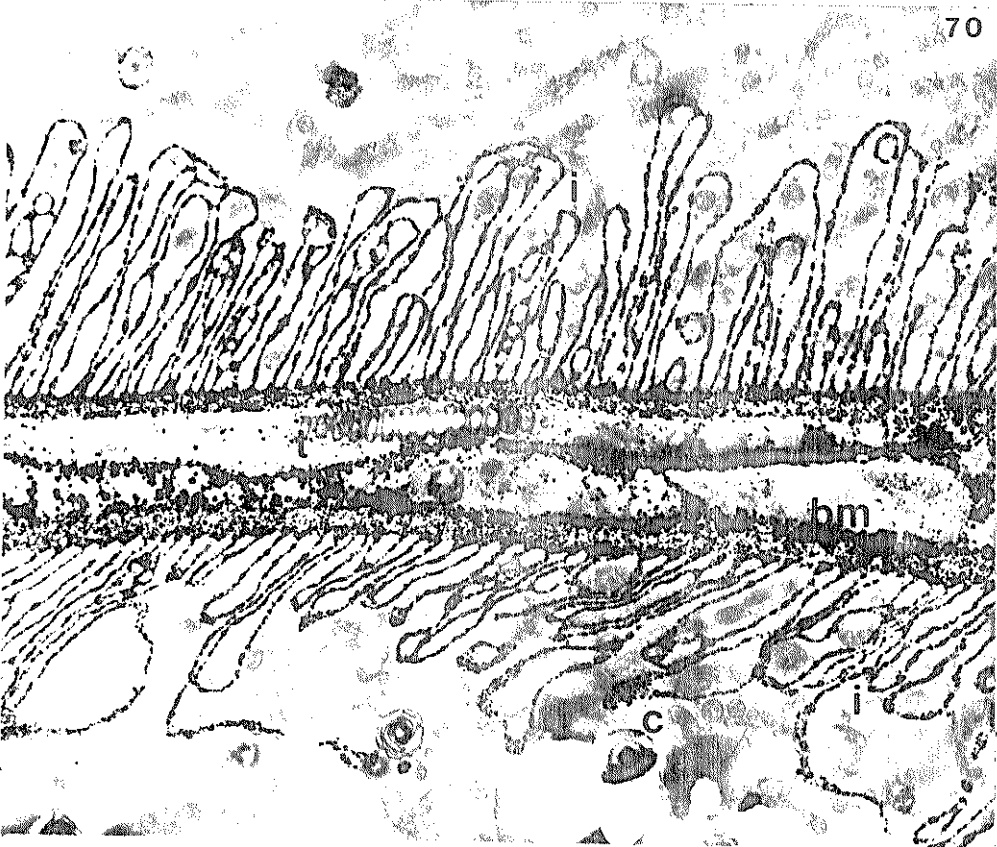
FIGURAS 66 e 67 - Reação fortemente positiva para fosfatase ácida em "concreções" laminares da região distal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans*. c = "concreções". bm = lâmina basal. i = invaginações do plasmalema. m = mitocôndrias. cg = glôbulos citoplasmático com vírus descritos por DOLDER & MELLO, 1978a, b. Figura 66, X 17200; Figura 67, X 29600.



FIGURAS 68 e 69 - Atividade fosfatásica ácida em lisossomos da região distal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans*. c = "concreção". l = lissosomo. seta = membrana lisossomal . Figura 68, X 18200. Figura 69, X 60200.



FIGURAS 70 a 72 - Atividade fosfatásica ácida na lâmina basal e invaginações do plasmalema da região distal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans*. i = invaginação do plasmalema. bm = lâmina basal. c = "concreções". t = célula da traquéia. Figura 70, X 11700; Figura 71, X 6800. Figura 72, X 53700.



em nível mais superficial. Esse é o caso da Figura 76 que é o mesmo núcleo localizado à direita da Figura 73, num diferente plano de corte. Em todos os núcleos encontrados nessa região sempre foi observada atividade enzimática na região citoplasmática que envolve a carioteca (Figuras 73 a 76).

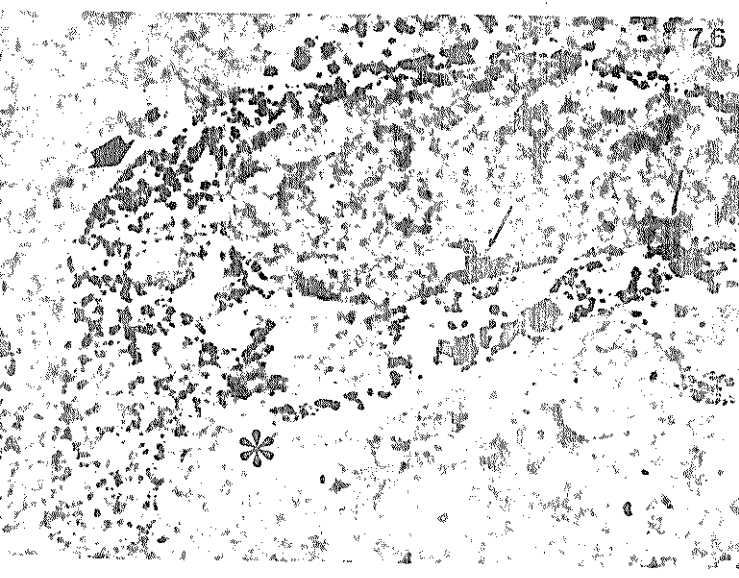
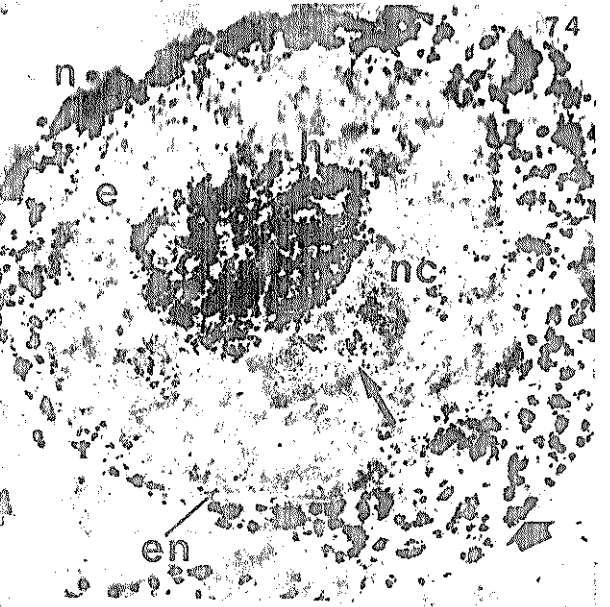
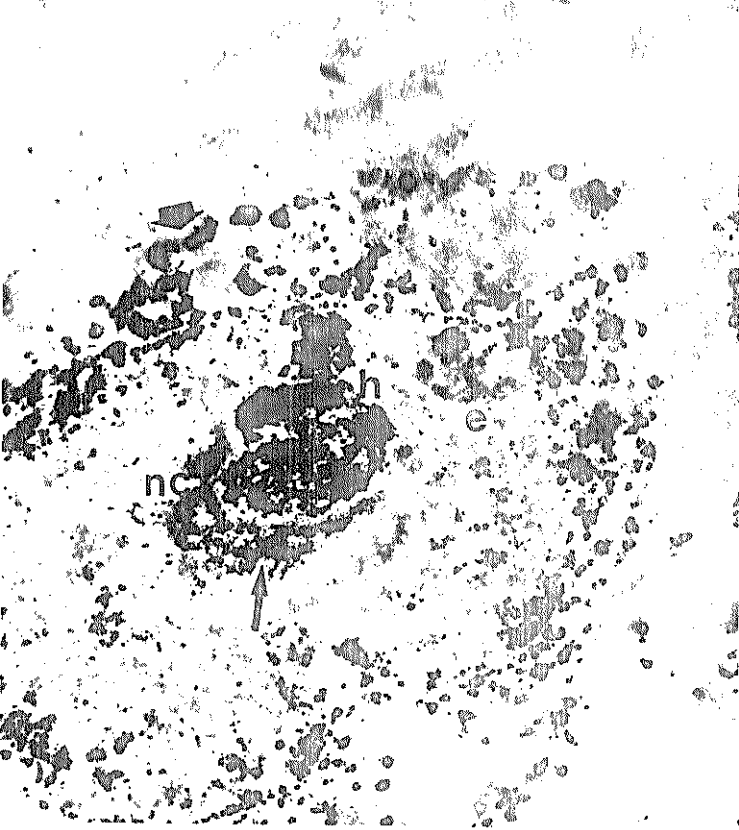
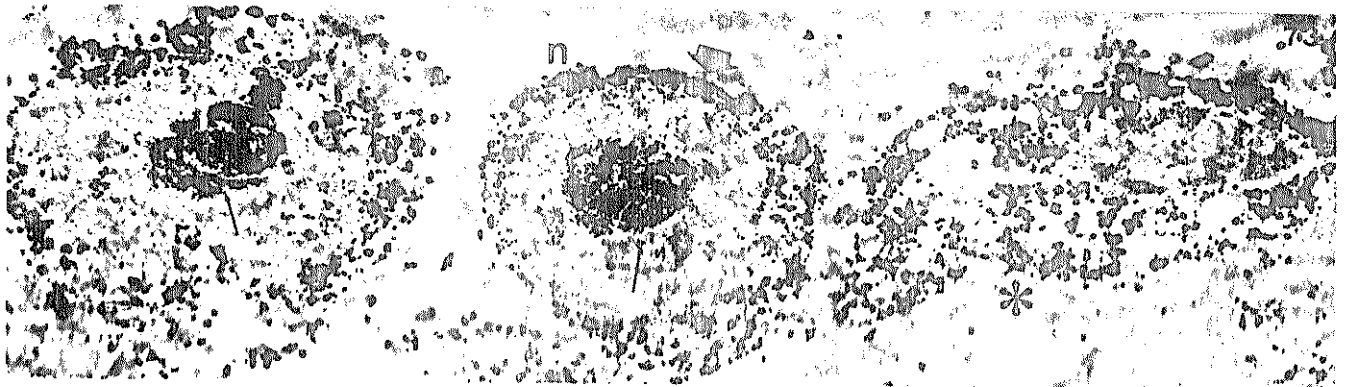
Nos núcleos das células da região distal, a reação positiva predominante foi constatada na região eucromática (Figura 77) e algumas vezes também na heterocromática (Figura 78). Núcleos de células da traquéia também mostraram atividade predominante na região eucromática (Figura 79). Novamente constatou-se atividade enzimática próxima ao envólucro nuclear e região citoplasmática, porém, não tão intensa como nas células proximais (Figuras 77, 78 e 79).

Quando os túbulos de Malpighi foram submetidos ao meio incubador na ausência de substrato (Beta-glicerofosfato de sódio) a reatividade desse grupo enzimático ou foi totalmente abolida ou sensivelmente diminuída. As "concreções" laminares bem como os lisossomos da região distal não apresentaram a forte marcação característica da fase experimental dessa reação (Figuras 80 e 81). A lâmina basal das células distais não apresentou resposta positiva (Figuras 82, 83 e 84). Já as invaginações do plasmalema dessa região mostraram apenas uma leve marcação (Figuras 82, 83 e 84), com exceção de uma única área onde pôde-se observar uma maior reatividade (Figura 82).

Quanto à marcação nuclear, essa mostrou-se totalmente abolida, na heterocromatina, eucromatina, nucléolo, proximidade do envólucro nuclear tanto de núcleos da região distal (Figura 85) como nos da região proximal (Figura 86).

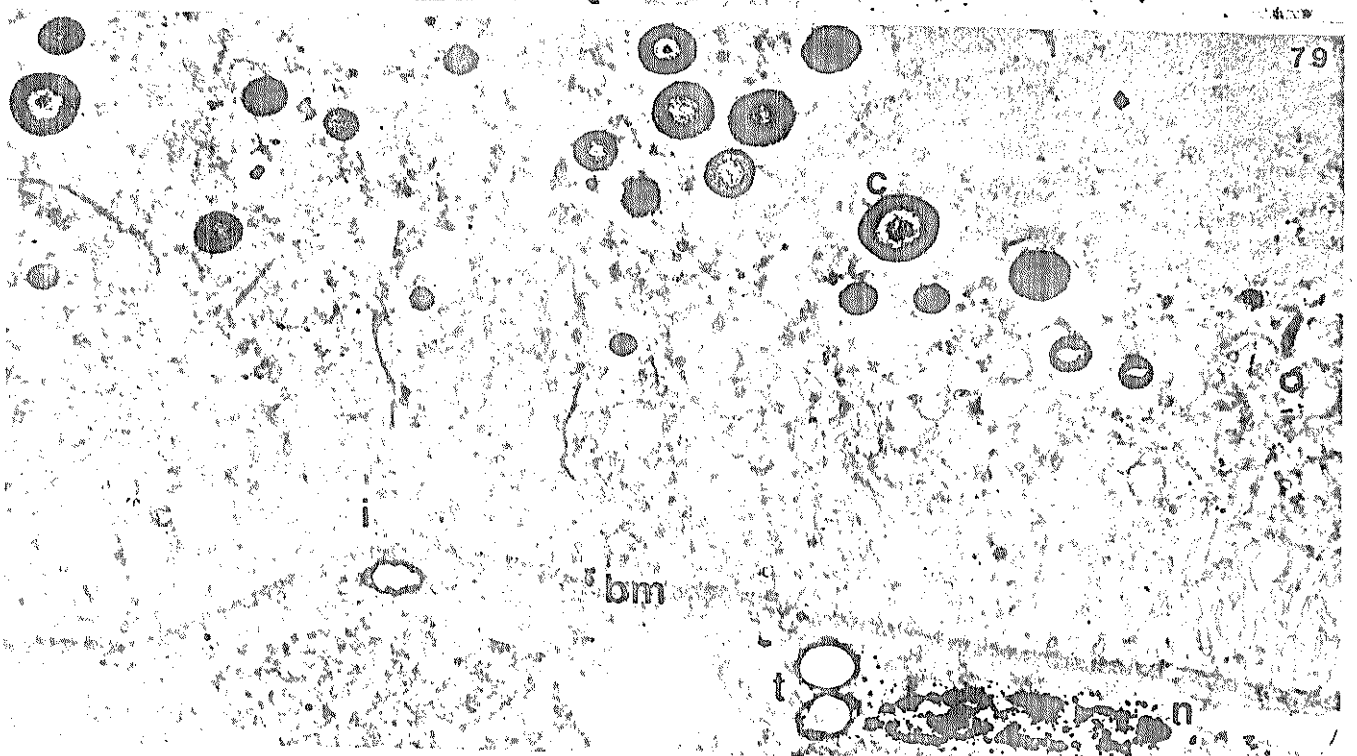
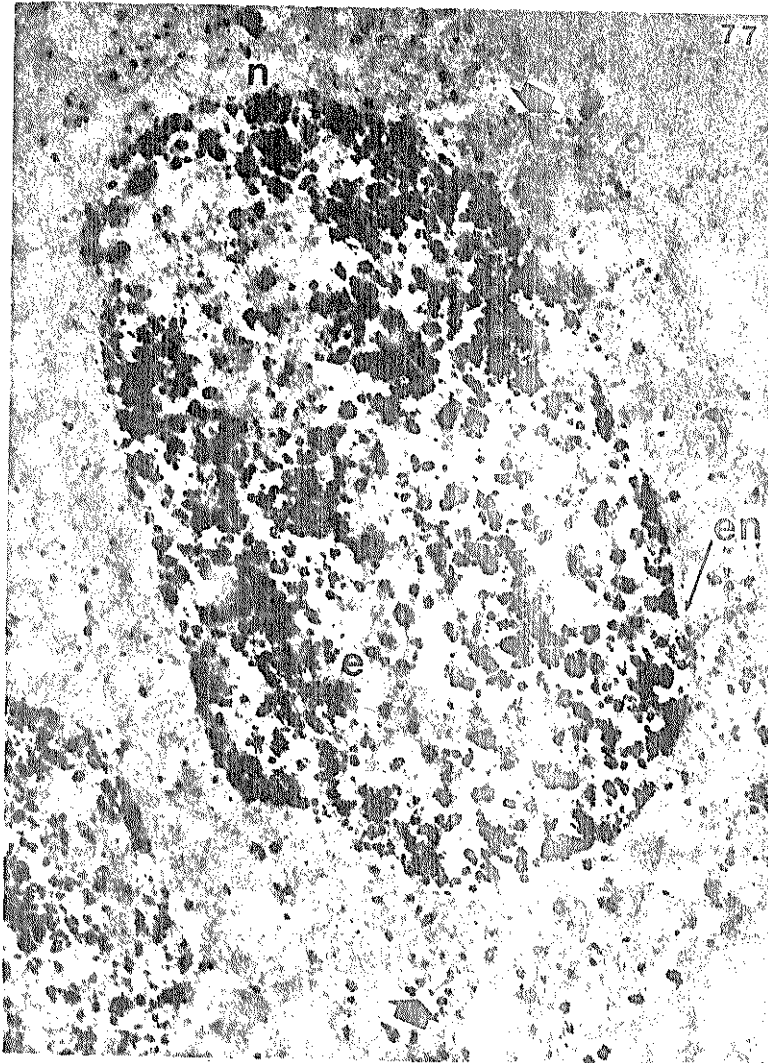
O uso do inibidor fluoreto de sódio no meio incu

FIGURAS 73 a 76 - Atividade fosfatásica ácida em núcleos de células da região proximal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans*. Figuras 74 e 75 - Detalhe da Figura 73, mostrando atividade fosfatásica ácida na heterocromatina e fino precipitado no nucléolo (setas). Figura 76 - Mesmo núcleo da direita da Figura 73^(*), mostrando menor atividade nas áreas de cromatina condensada junto ao envólucro nuclear (setas). n = núcleo. nc = nucléolo. en = envólucro nuclear. h = heterocromatina. e = eucromatina. Seta larga = atividade enzimática na região citoplasmática que envolve a carioteca. Figura 73, X 8700. Figura 74, X 17200; Figura 75, X 45400; Figura 76, X 10800.

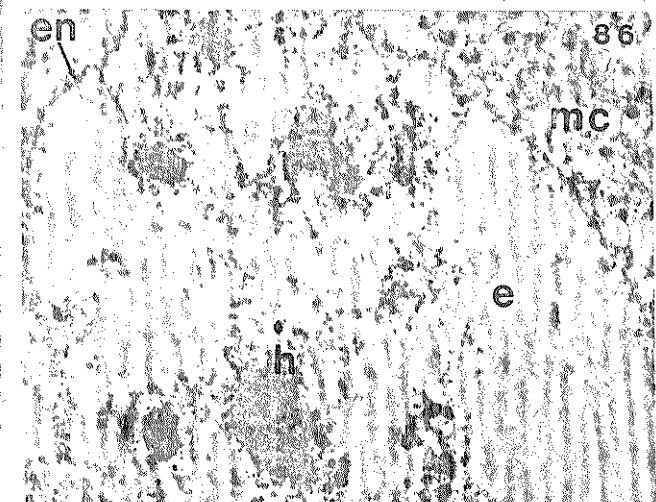
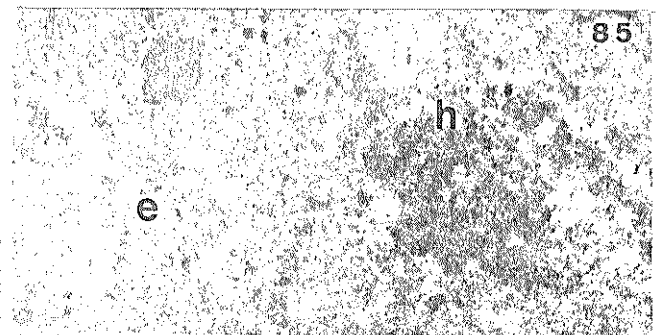
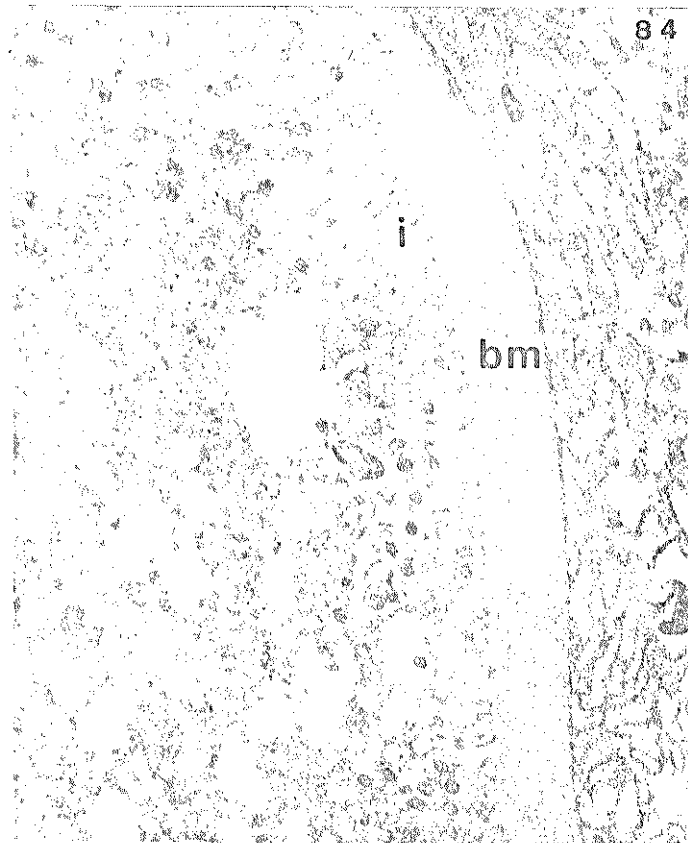
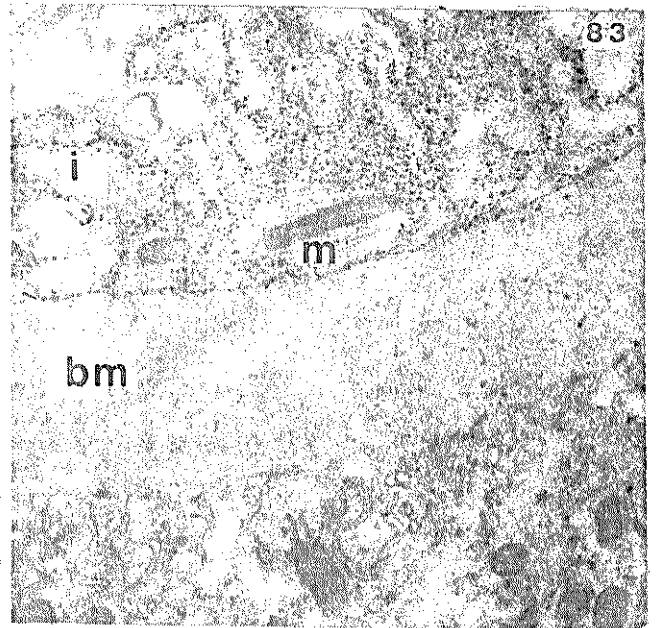
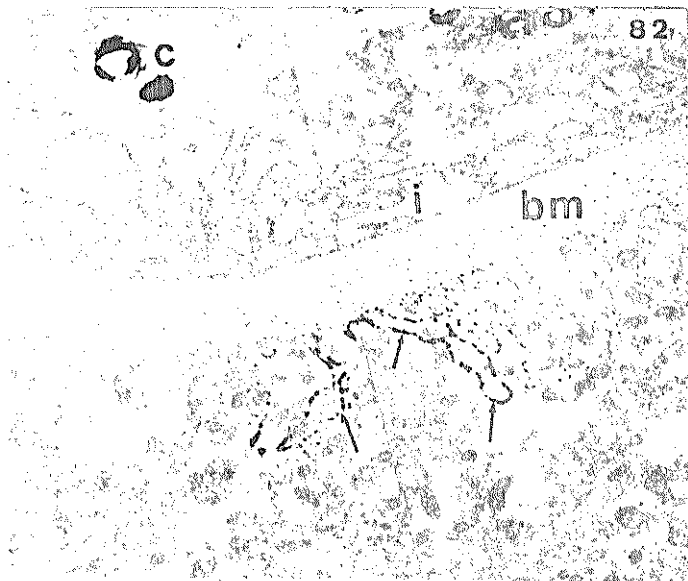
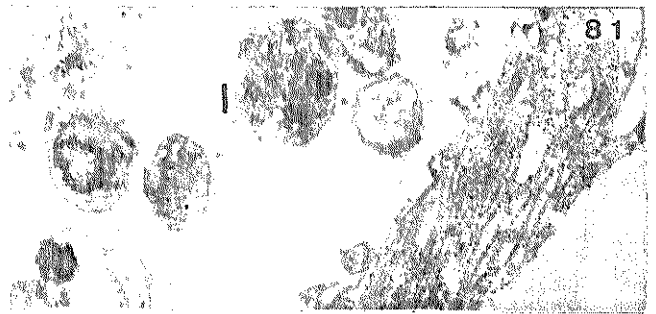
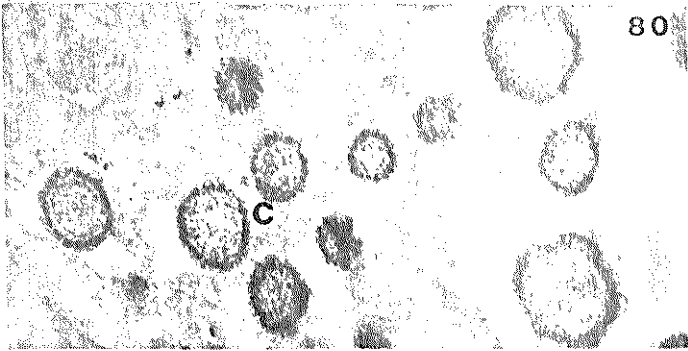


FIGURAS 77 e 78 - Atividade fosfatásica ácida em núcleos da região distal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans*. n = núcleo. en = envólucro nuclear. e = eucromatina. h = heterocromatina. Setas = Atividade enzimática na região citoplasmática que envolve a carioteca. Figura 77, X 16700; Figura 78, X 14800.

FIGURA 79 - Atividade fosfatásica ácida em núcleo de célula de traquéia (t) contígua ao túbulo de Malpighi. Forte resposta ao método é também vista nas "concreções" laminares (c) da região distal do túbulo. n = núcleo. bm = lâmina basal. i = invaginações do plasmalema. X 8500.



FIGURAS 80 a 86 - Túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* incubados na ausência do substrato (Beta-glicerofosfato de sódio) mostrando reatividade totalmente abolida ou diminuída. Figura 80 - "Concreções" laminares características do citoplasma celular da região distal não apresentando depósitos de fosfato de chumbo. Figura 81 - Lisossomos da região distal com reatividade praticamente abolida. Figuras 82, 83 e 84 - Lâmina basal sem reatividade e invaginações do plasmalema da região distal com leve marcação, excetuando-se uma área de maior reatividade (setas). Figura 85 - Núcleo da região distal sem reatividade. Figura 86 - Núcleo da região proximal sem reatividade. c = "concreções". l = lisossomo. bm = lâmina basal. i = invaginações do plasmalema. m = mitocôndrias. h = heterocromatina. e = eucromatina. en = envólucro nuclear. mc = microvilosidades. Figura 80, X 20400; Figura 81, X 13500; Figura 82, X 10000; Figura 83, X 25000; Figura 84, X 10000; Figura 85, X 9700; Figura 86, X 7600.



FIGURAS 87 a 90 - Túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* incubados na presença de fluoreto de sódio (NaF). Figuras 87 e 88 - "Concreções" (c) laminares da região distal com menor reatividade se comparada aos achados experimentais. Plasmalema com nítida marcação (setas). Figura 89 - Invaginações do plasmalema e membrana basal da região distal mostrando ainda uma certa reatividade. Figura 90 - Núcleo da região proximal sem deposição de fosfato de chumbo. pl = plasmalema. i = invaginações. bm = lâmina basal. t = traquéia. e = eucromatina. h = heterocromatina. nc = nucléolo. en = envólucro nuclear. m = mitocôndrias. mc = microvilosidades. Figura 87, X 18000; Figura 88, X 26200; Figura 89, X 11300; Figura 90, X 7300.

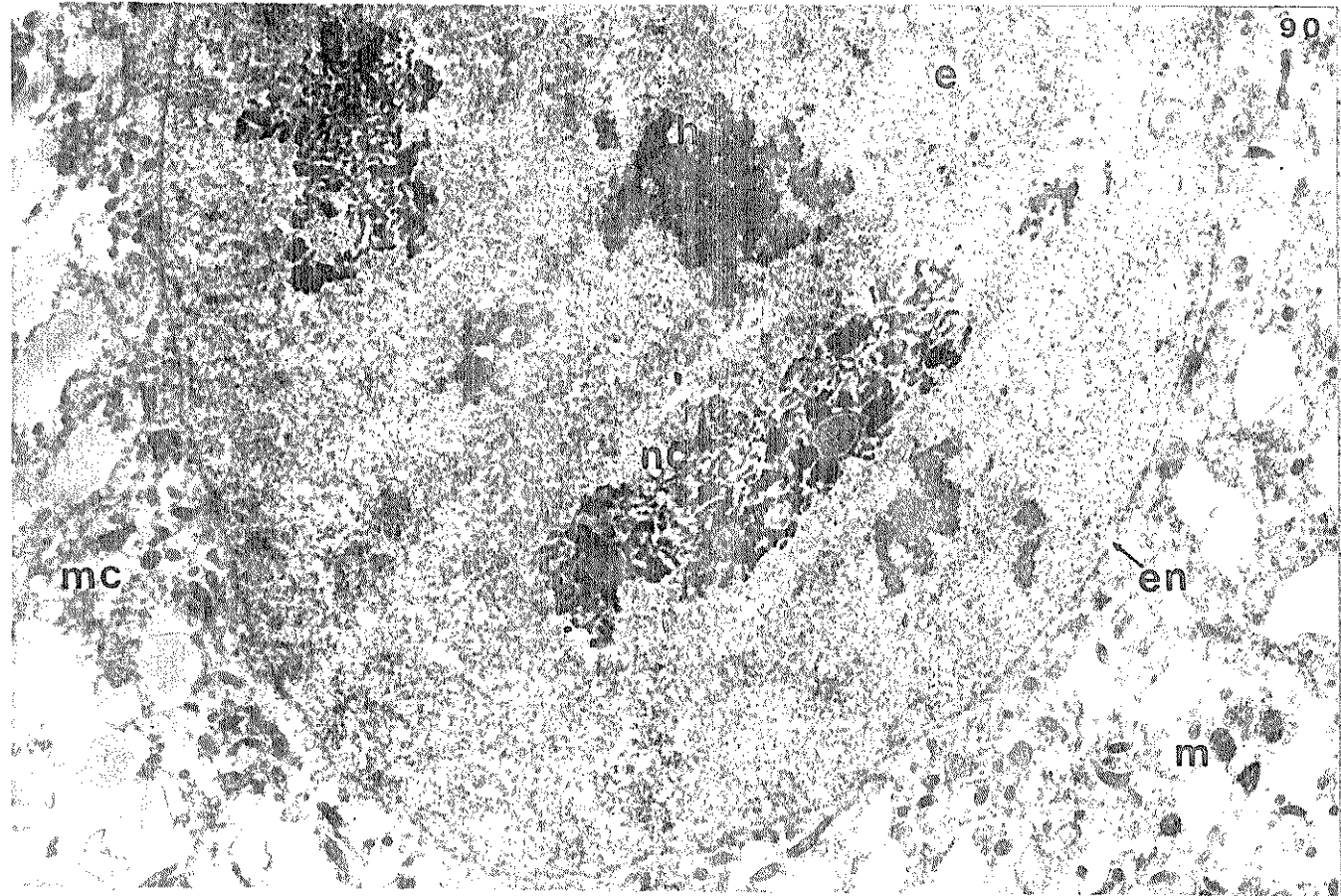
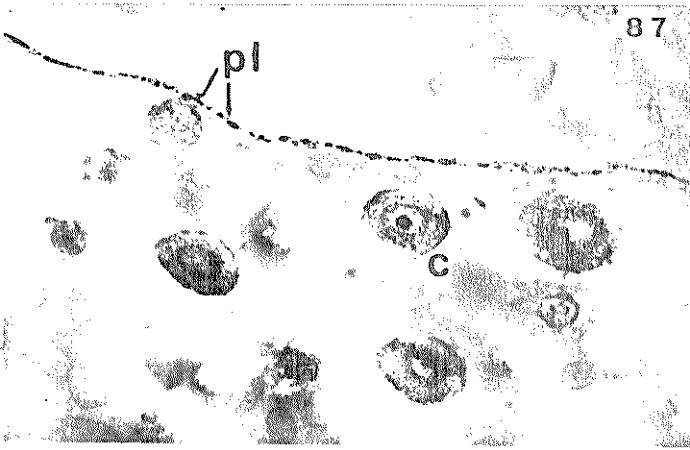


Tabela III. Respostas aos testes citoquímicos para fosfatases ácidas em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*

Testes citoquímicos	Regiões dos túbulos de Malpighi	Resposta aos métodos					Material do lúmen
		Citoplasma		Núcleo		Hetero- cromatina e/ou nucléolo	
		Granulação fina	Glóbulos				
A. Variação da técnica de GOMORI (1950)	distal	++	+++	++	+++	-	-
	proximal	+++	-	+++	+++	+++	N. O.
B. A sem Beta- glicero fosfato de sódio	distal	-	-a ++	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	N. O.
C. GOMORI (1952)	distal	+++	+++	-a +++	-a +++	++	+++
	proximal	-	++	-a ++	-a ++	+++	++
D. C sem Beta-glicero fosfato de sódio	distal	-	-	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	-
E. C + NaF	distal	+	-	+	+	-	-
	proximal	-	-	+	+	-	-
							N. O.

N. O.

-

Não Observado

-a +++

-

Resposta negativa a altamente positiva

+++

-

Resposta altamente positiva

-a ++

-

Resposta negativa a moderadamente positiva

++

-

Resposta moderadamente positiva

-

-

Resposta negativa

+

-

Resposta fracamente positiva

bador completo não aboliu totalmente a atividade enzimática do plasmalema (Figura 87), "concreções" (Figuras 87 e 88), invaginações do plasmalema e lâmina basal (Figura 89) das células distais dos túbulos. No entanto, ocorreu uma menor deposição do produto da reação (fosfato de chumbo) quando comparado com os resultados experimentais. A atividade nuclear, das duas regiões, no entanto, pode ser considerada totalmente nula quando na presença desse inibidor (Figura 90). Os dados relativos à região para fosfatases ácidas acham-se resumidos na Tabela III.

5. ATPases dependentes de Mg^{++}

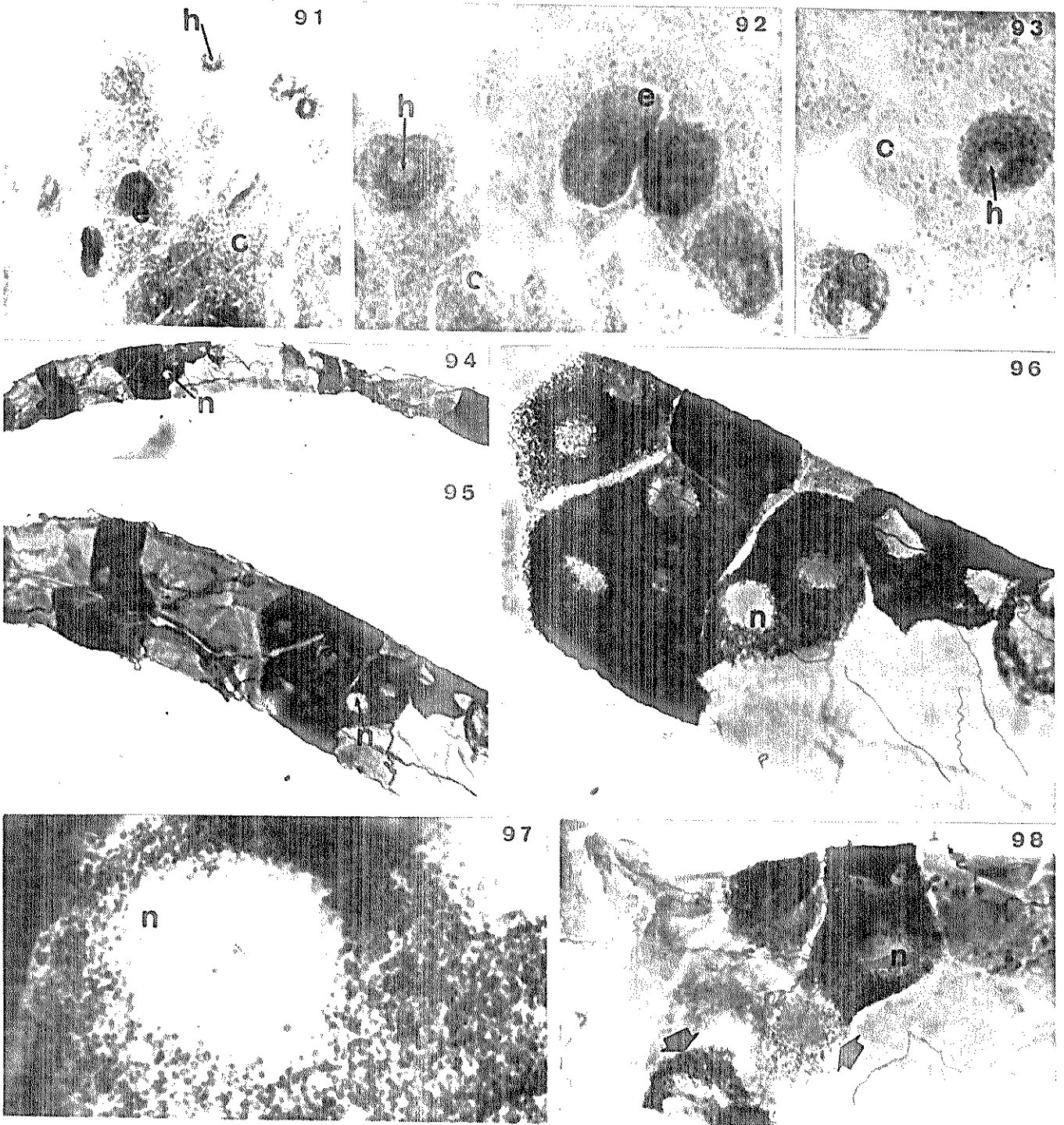
Os túbulos de Malpighi tanto de ninfas de 5º estágio, como de 3º e início de 4º estádios apresentaram resposta positiva ao método citoquímico para ATPases a nível fotônico.

Nas ninfas de 3º e início de 4º estádios a resposta ao método no citoplasma das células dos túbulos de Malpighi foi geralmente fraca e relativamente homogênea (Figura 91). Quanto aos seus núcleos, observou-se nítida resposta positiva na região eucromática e negativa na região heterocromática dos mesmos (Figuras 91 a 93).

Na região distal dos túbulos observou-se que grupos de células apresentavam resposta positiva alternados por grupos celulares com resposta negativa. Neste caso, apenas a região citoplasmática das células é que se apresentava fortemente destacada, sendo que seus núcleos mostraram uma imagem negativa (Figuras 94 a 98). Neste citoplasma foram observados glóbulos e grânulos com diferente intensidade e localização de resposta, ou seja, na totalidade do glóbulo ou em sua região periférica (Figuras 97, 99 e 100). A densidade da população de glóbulos e a sua localização foram variadas. Células

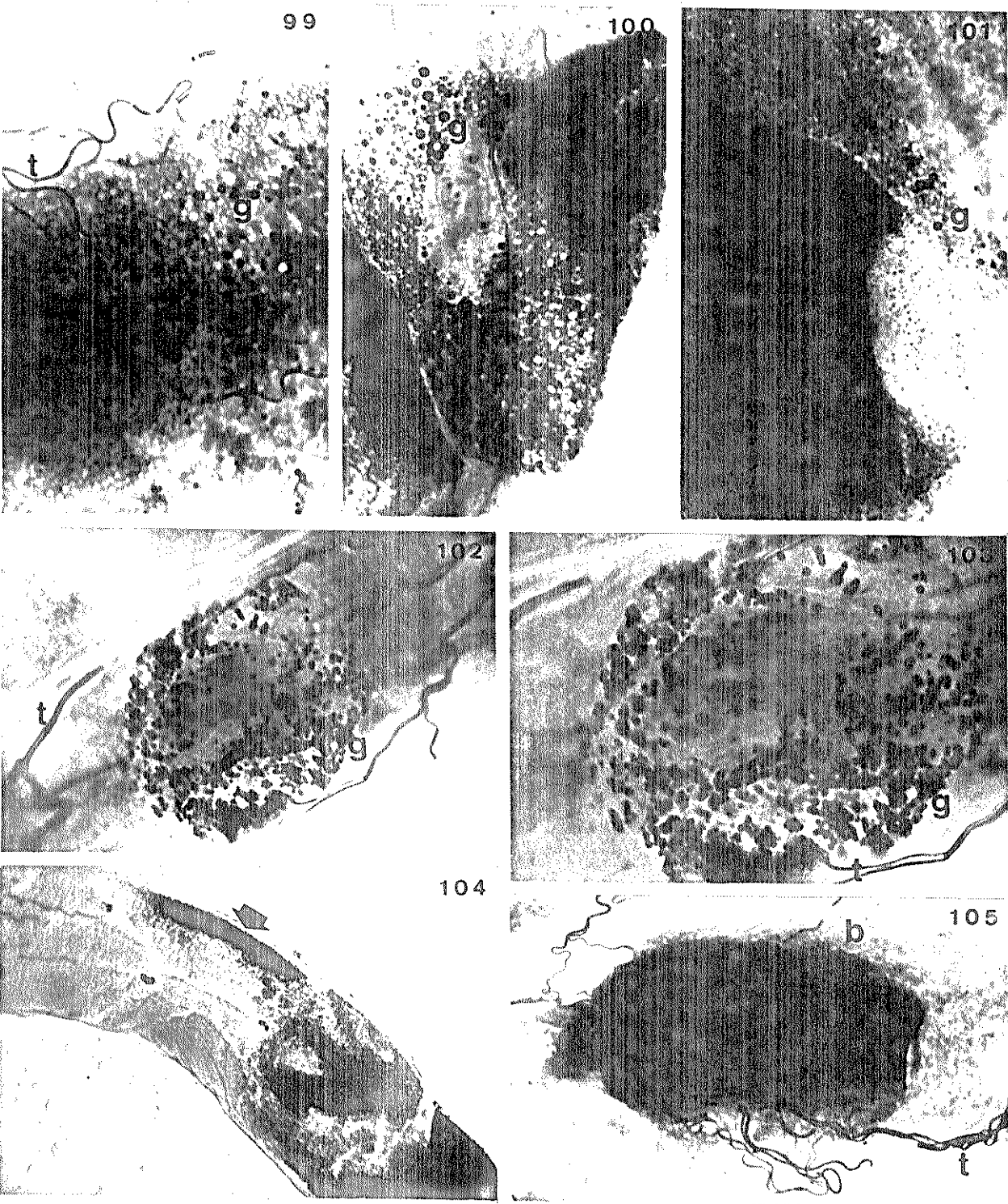
FIGURAS 91 a 93 - Atividade ATPásica em células da região proximal de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* de 3º estadio. A atividade ATPásica mostrou-se fraca e razoavelmente homogênea no citoplasma (c) e intensa, na região eucromática (e) de seus núcleos. A heterocromatina (h) não apresentou atividade ATPásica. Figura 91, X 320; Figura 92, X 800; Figura 93, X 800.

FIGURAS 94 a 98 - Atividade ATPásica no citoplasma de células distais dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* de 3º estadio. Observar a imagem negativa dos núcleos (n). Figura 98 - Variação na densidade de glóbulos citoplasmáticos com atividade ATPásica (setas). Figura 94, X 50; Figura 95, X 120; Figura 96, X 300; Figura 97, X 1200; Figura 98, X 350.



MF

FIGURAS 99 a 105 - Variação na densidade da população de glóbulos (g) citoplasmáticos das células distais dos túbulos de Malpighi de 3º estadio, com atividade ATPásica. Na Figura 101 observa-se uma célula densamente povoada com esses glóbulos. Figuras 102 e 103 - Célula cujo citoplasma apresenta uma distribuição de glóbulos com atividade ATPásica. Figura 104 - Glóbulos com atividade ATPásica localizados na porção basal de uma das células (seta). Intensa resposta positiva ao método no bordo apical (b) de uma célula distal. t = traquéia. Figura 99, X 860; Figura 100, X 670; Figura 100, X 670; Figura 100, X 670; Figura 100, X 1060; Figura 104, X 270; Figura 105, X 440.



MF

densamente povoadas bem como células com poucos glóbulos foram observadas (Figuras 98, 99, 101 a 103). Geralmente os glóbulos se distribuem por todo citoplasma, porém, em alguns casos foi observada concentração dos mesmos na porção basal celular (Figura 104).

Uma intensa resposta positiva ao método foi observada no bordo apical de algumas poucas células (Figura 105).

Na região de transição distal-proximal dos túbulos de Malpighi de ninfas de início de 4º estadio, em células cujo citoplasma praticamente não apresentava precipitado de sulfeto de cobalto, observou-se alguma resposta positiva nos núcleos, numa estreita zona em contato com as heterocromatinas (Figuras 106 a 108).

Quanto às células proximais e distais dos túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio, estas apresentaram respostas semelhantes em relação às aquelas de 3º estadio. A atividade enzimática detectável pelo método mostrou-se sempre ausente nas áreas heterocromáticas de células proximais e distais (Figuras 109 a 111) e presente com diversos graus de intensidade na eucromatina mesmo de células distais. Neste último caso, parecia estar quase que exclusivamente ligada a restritas regiões em torno de alguns cromocentros (Figura 109).

Em algumas regiões da porção proximal foram observados cristais de urato com reação intensamente positiva, principalmente na sua periferia (Figuras 113 e 114).

A fim de se demonstrar que a resposta positiva ao método citoquímico utilizado era devida à atividade ATPásica, uma série de controles foram utilizados, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados acham-se sumarizados

FIGURAS 106 a 108 - Atividade ATPásica em núcleos de células da região de transição distal-proximal de túbulos de Malpighi de ninfas de início de 4º estadio de *Triatoma infestans*. Esta atividade parece se restringir exclusivamente a uma estreita região (setas) em contato com a heterocromatina. h = heterocromatina. e = eucromatina. t = traquéia. Figura 106, X 1100; Figura 107, X 690; Figura 108, X 670.

FIGURAS 109 a 112 - Atividade ATPásica nuclear em túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio, sempre ausente nas regiões heterocromáticas e presente com intensidade variada nas áreas eucromáticas (setas). Figuras 109 e 110 - Região distal. Figuras 111 e 112 - Núcleos da região de transição distal-proximal. h = heterocromatina. e = eucromatina. t = traquéia. Figura 109, X 740; Figura 110, X 740; Figura 111, X 920; Figura 112, X 920.

FIGURAS 113 e 114 - Cristais de urato presentes no lúmen da região proximal de um túbulo de Malpighi de 5º estadio com resposta positiva ao método citoquímico para ATPase (setas) u = cristal de urato. t = traquéia. Figura 113, X 300; Figura 114, X 740.

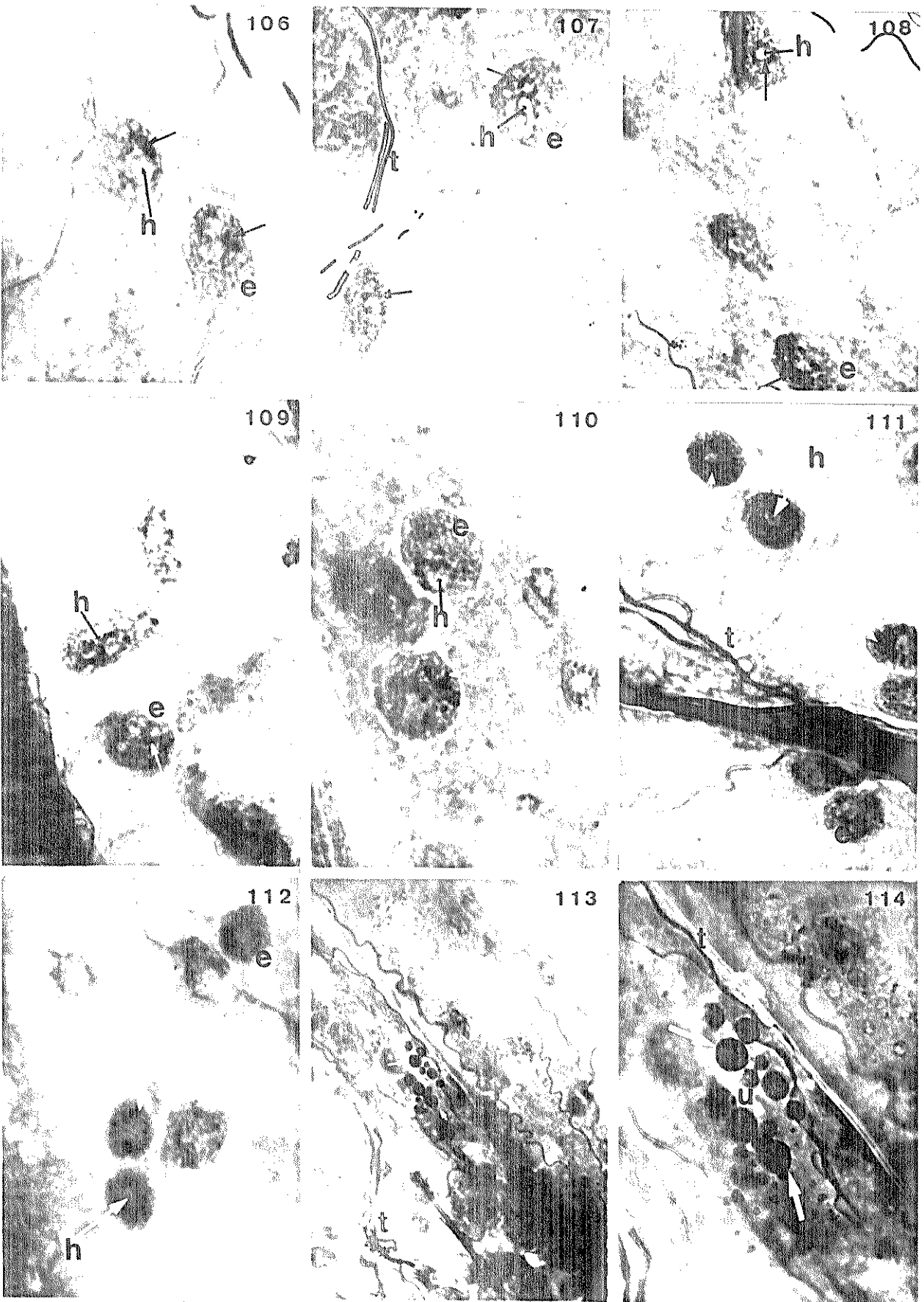


Tabela IV. Respostas aos testes citoquímicos para ATPase em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* (microscopia fotônica)

Testes citoquímicos	Regiões dos túbulos de Malpighi	Resposta aos métodos					
		Citoplasma		Núcleo			Material no lúmen
		Granulação fina	Glôbulos	Bordo celular	Hetero-cromatina	Eucromatina e/ou nucléolo	
A. Método de WEGMAN & RANKINSKY (1960)	distal	- a ++	- a ++	+++ (eventual)	-	- a ++	-
	proximal	-	-	-	-	+++	++ (periferia de esférulas de urato)
B. A sem fornecimento de ATP	distal	+(eventual)	+(eventual)	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	-
C. A sem fornecimento de ATP e MgCl ₂	distal	-	-	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	Não observado
D. A sem fornecimento de MgCl ₂	distal	-	-	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	Não observado
E. A + NaF	distal	-	-	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	-
F. A + NaF	distal	-	-	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	-
G. A + oligomicina	distal	-	-	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	Não observado
H. B + oligomicina	distal	-	-	-	-	+(eventual)	-
	proximal	-	-	-	-	-	Não observado
I. A precedido de fixação em formol a 10%	distal	- a +++	- a +++	-	-	- a ++	-
	proximal	-	-	-	-	+++	Não observado
J. A sem fornecimento de ATP e MgCl ₂	distal	-	-	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	Não observado
K. A precedida de fixação em etanol acético	distal	-	-	-	-	-	-
	proximal	-	-	-	-	-	Não observado

+++	Resposta altamente positiva
+++ (eventual)	Resposta altamente positiva
++	Resposta moderadamente positiva
+ (eventual)	Resposta moderadamente positiva
- a ++	Resposta negativa a moderadamente positiva
- a +++	Resposta negativa a altamente positiva
-	Resposta negativa

na Tabela IV.

Encontrou-se que mesmo em preparados tratados com meio incubador sem ATP havia alguns glóbulos citoplasmáticos com resposta positiva na sua periferia (células distais) (Figura 115). As respostas nucleares, no entanto, foram completamente abolidas. O mesmo parece ter acontecido com a granulação citoplasmática mais fina. Na ausência de ATP e de cloreto de magnésio, as respostas foram totalmente abolidas, inclusive aquela verificada na parte periférica de corpos de urato (Figura 116). Nos preparados tratados com oligomicina (inibidor), na presença ou ausência de ATP, foi abolida a reação, inclusive dos glóbulos citoplasmáticos de células distais (Figuras 117 a 121). Apenas, numa das preparações tratadas com oligomicina, na ausência de ATP, algumas poucas granulações apareceram levemente positivas em núcleos de células distais próximo às massas heterocromáticas (Figura 119). Em túbulos de Malpighi tratados com fluoreto de sódio (inibidor) e na presença ou ausência de ATP toda e qualquer resposta foi abolida (Figuras 122 e 123).

A fixação dos túbulos em formol a 10%, por outro lado, parece não interferir na resposta esperada para as suas células distais, desde que se forneça ATP e cloreto de magnésio no meio incubador (Figuras 124 e 125). Túbulos de Malpighi fixados em etanol acético 3:1 não apresentaram resposta positiva para ATPases (Figura 126).

O órgão utilizado como controle, rim de camundongo, visto em corte transversal (zona cortical), apresentou resposta fortemente positiva nos glomérulos (Figura 127). Alguns túbulos contornados proximais apresentaram densa resposta em oposição aos túbulos contornados distais que não apre-

- FIGURA 115 - Alguns glóbulos citoplasmáticos (g) de uma célula distal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* mostrando precipitação de sulfato de cobalto (setas). Neste preparado a incubação se processou sem o fornecimento de ATP e sem cloreto de magnésio. X 920.
- FIGURA 116 - Cristal de urato (u) presente no lúmen da região proximal de um túbulo de Malpighi. Neste preparado a reação se processou sem o fornecimento de ATP e sem cloreto de magnésio. X 1200.
- FIGURAS 117 a 119 - Células distais dos túbulos submetidos ao método para ATPase, mas simultaneamente tratados com oligomicina na ausência do substrato (ATP). A reação foi abolida totalmente, exceto em alguns minúsculos grânulos circundando as áreas heterocromáticas (setas) da Figura 119. g = glóbulos. t = traquéia. Figura 117, X 740; Figura 118, X 740; Figura 119, X 740.
- FIGURAS 120 e 121 - Células distais dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetidos ao método para ATPase, mas simultaneamente tratados com oligomicina na presença do substrato (ATP). t = traquéia. Figura 120, X 920; Figura 121, X 740.
- FIGURAS 122 e 123 - Resposta negativa ao método para ATPase simultâneo ao tratamento com fluoreto de sódio na região distal (d) (Figura 122) e proximal (p) (Figura 123) dos túbulos. t = traquéia. Figura 122, X 740; Figura 123, X 740.

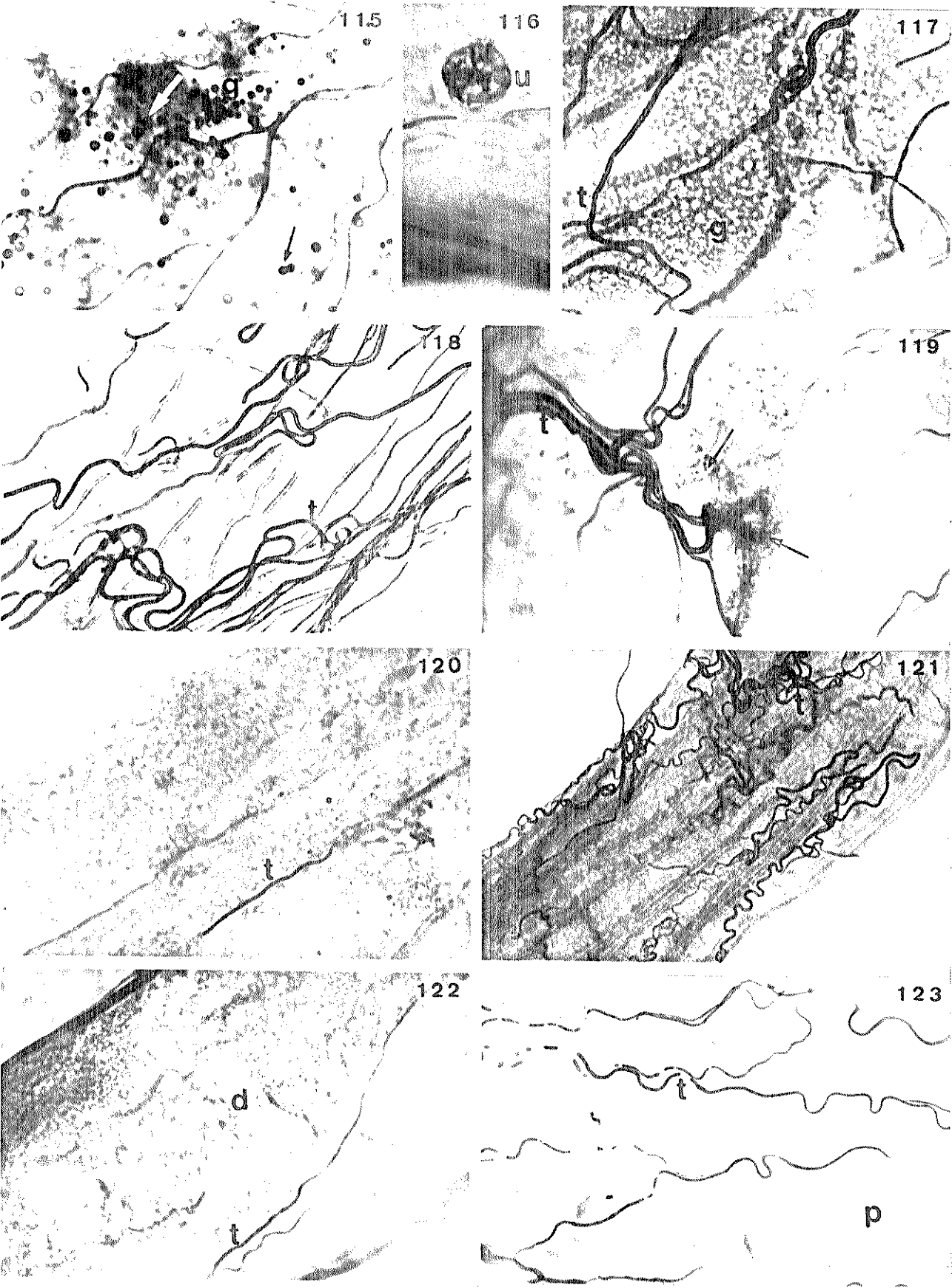


FIGURA 124

- Atividade ATPásica nos glóbulos citoplasmáticos de células distais (d) de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* fixados em formol a 10% e incubados na presença de ATP e cloreto de magnésio. p = região proximal. t = traquéia. X 370.

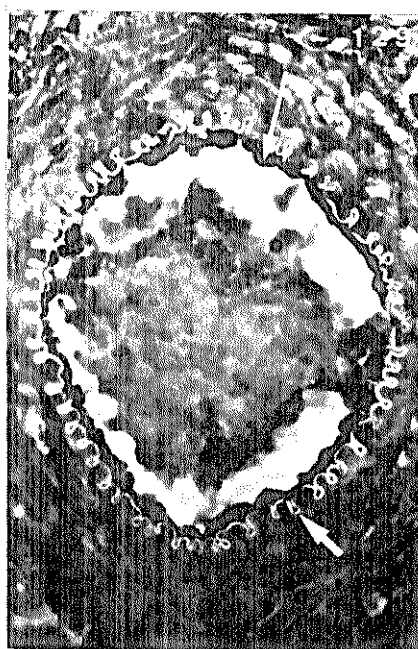
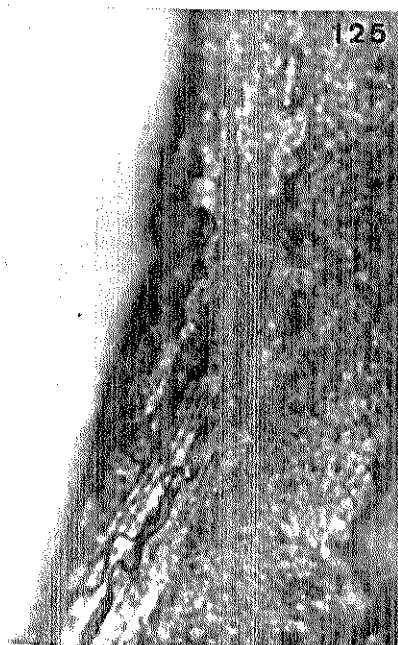
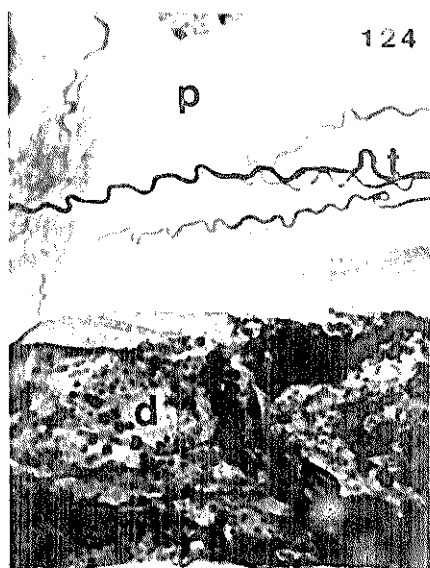
FIGURA 125

- A atividade ATPásica nos glóbulos citoplasmáticos de células distais de túbulos de Malpighi fixados em formol a 10% é abolida quando o preparado é incubado na ausência de ATP e cloreto de magnésio. X 740.

FIGURA 126

- Atividade ATPásica negativa na região distal de um túbulo de Malpighi fixado em etanol acético 3:1. X 300.

FIGURAS 127 a 129 - Atividade ATPásica em rim de camundongo. Esta atividade é intensa nos glomérulos (gl). Aparece também no citoplasma das células dos túbulos contornados proximais (p) em contraposição ao dos túbulos contornados distais (d). Observar a resposta positiva ao método nos núcleos de células de ambas regiões (setas). O corte de uma artéria renal (Figura 129) mostra atividade ATPásica intensamente positiva no endotélio da íntima (seta longa) e negativa na lâmina elástica interna (seta curta). Figura 127, X 320; Figura 128, X 320; Figura 129, X 320.



MF

sentaram essa resposta, os núcleos de ambos, no entanto, apresentaram resposta positiva (Figuras 127 e 128). Numa artéria, resposta intensamente positiva foi observada no endotélio da íntima e negativa na lâmina elástica interna (Figura 129).

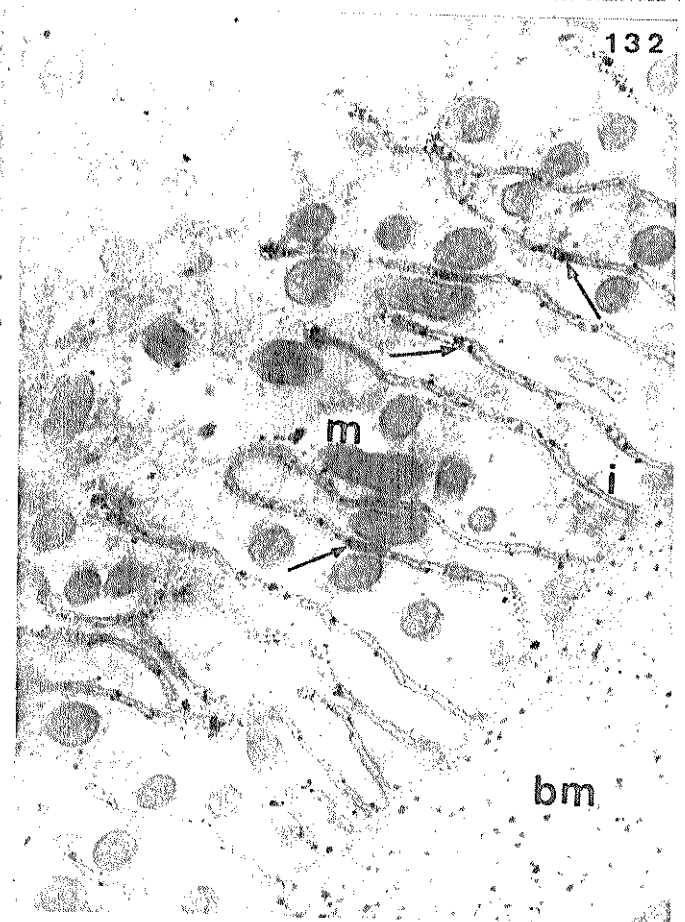
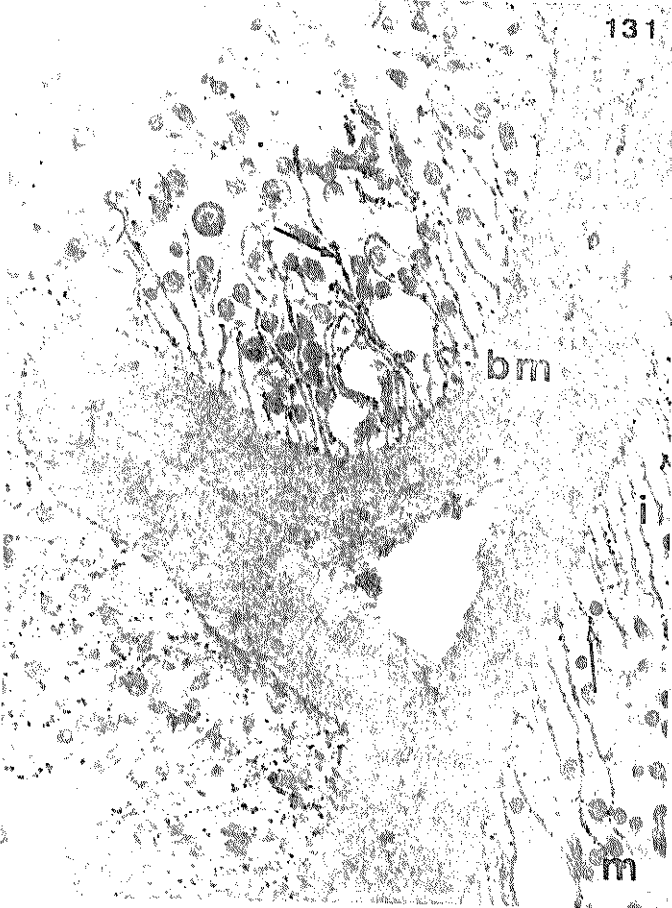
A pesquisa de ATPases a nível de microscopia eletrônica confirmou algumas observações fotônicas além de trazer outras informações com respeito à localização da atividade desse grupo de enzimas.

Na região proximal, precipitados de fosfato de chumbo foram abundantemente observados na lâmina basal (Figuras 130 e 132) e invaginações do plasmalema (Figuras 130 a 134 e 150). Muitas vezes esses depósitos eram localizados nitidamente entre o espaço interno das invaginações do plasmalema (Figura 132). Porém, nem sempre a lâmina basal mostrou reatividade (Figuras 131, 133 e 134). Precipitações inespecíficas ocorreram em algumas áreas, não invalidando, no entanto, a clareza da resposta ao longo das invaginações próximas à lâmina basal e no plasmalema entre células vizinhas (Figuras 133 e 134). Não foram observados cristais de urato nas preparações para a citoquímica ultraestrutural.

Com relação à região distal, a reatividade nas invaginações do plasmalema foi forte em algumas regiões, sendo alternada por áreas sem ou com muito pouca resposta ao método. Neste caso, a membrana basal não apresentou deposição dos íons fosfato de chumbo. O plasmalema entre células contíguas mostrou forte reatividade enzimática (Figuras 135 e 136).

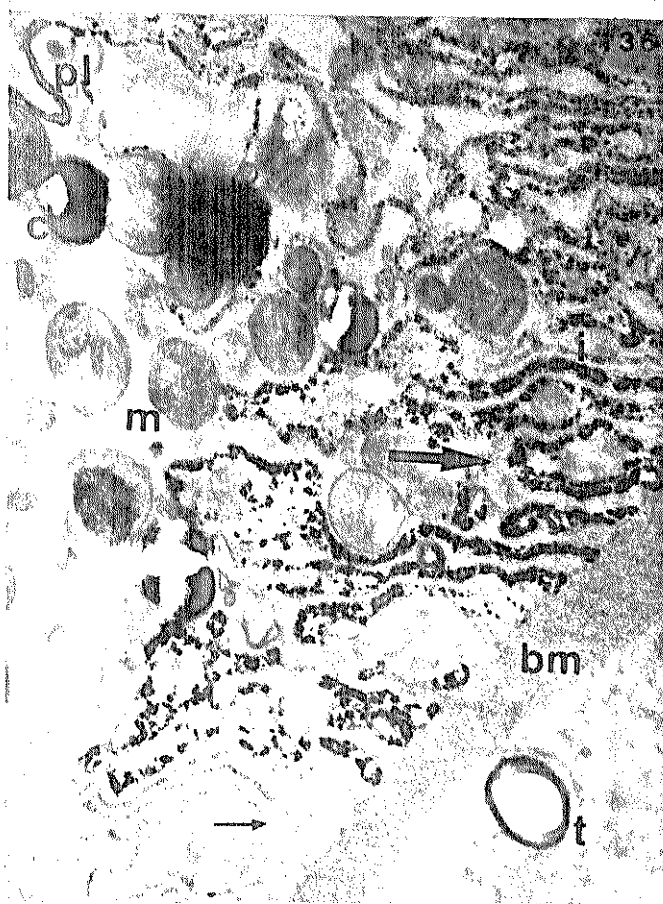
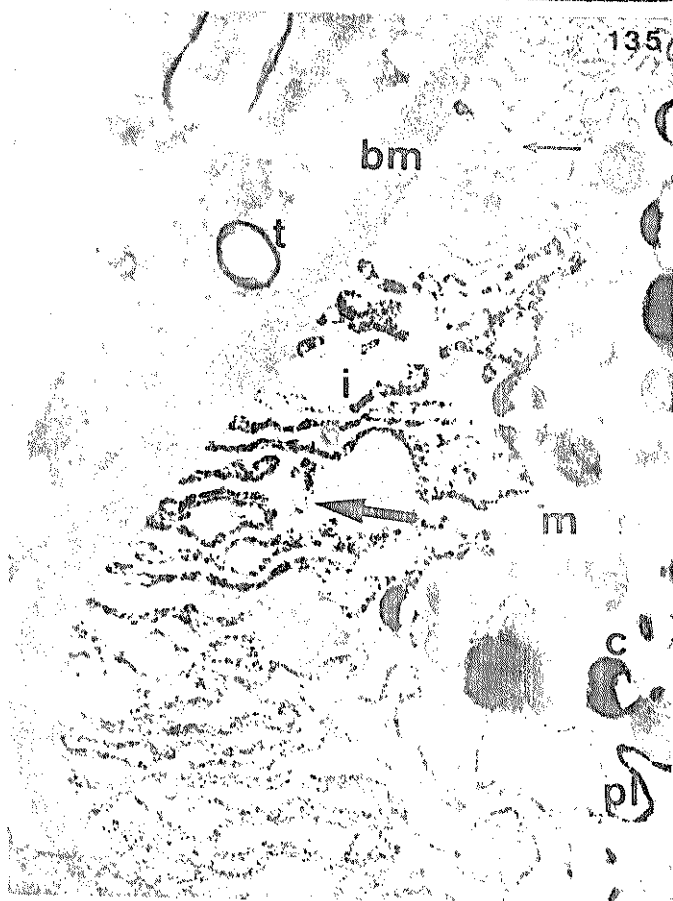
As "concreções" laminares caracteristicamente presentes nesta região apresentaram resposta positiva à reação, variando apenas quanto ao grau de intensidade entre uma e ou-

FIGURAS 130 a 132 - Atividade ATPásica na lâmina basal (bm) e invaginações (i) do plasmalema da região proximal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* (5º estadio). Figura 130 - Forte reatividade na lâmina basal (setas maiores) e moderada nas invaginações (setas menores). Figura 131 - Ausência da reatividade na lâmina basal e presença nas invaginações (setas). Figura 132 - Depósitos localizados entre o espaço interno das invaginações do plasmalema (setas). t = traquéia. m = mitocôndrias. Figura 130, X 10000; Figura 131, X 12200; Figura 132, X 28200.

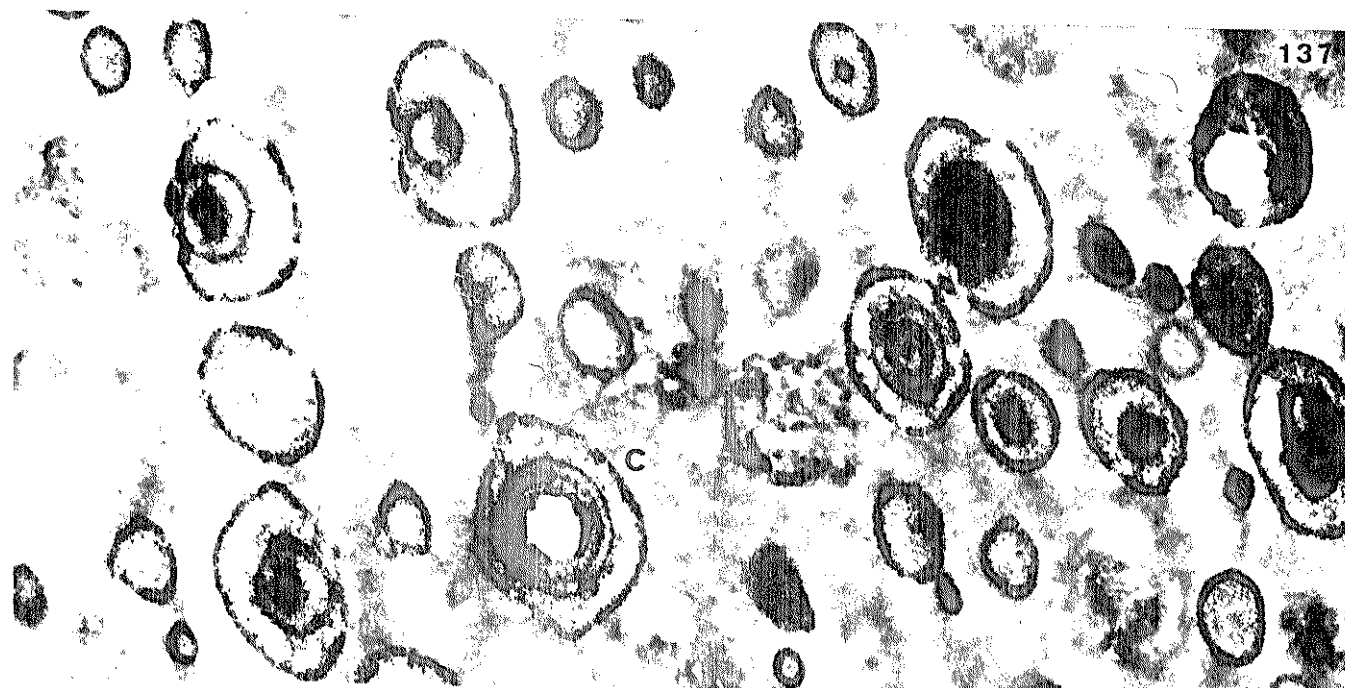


FIGURAS 133 e 134 - Atividade ATPásica na lâmina basal (bm) e invaginações (i) do plasmalema da região proximal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* (5º estadio). Figura 133 - Observar precipitado inespecífico (setas menores) e marcação nas invaginações (setas maiores). Figura 134 - Reatividade presente no plasmalema (pl) entre células contíguas. m = mitocôndrias. Figura 133, X 11300; Figura 134, X 4300.

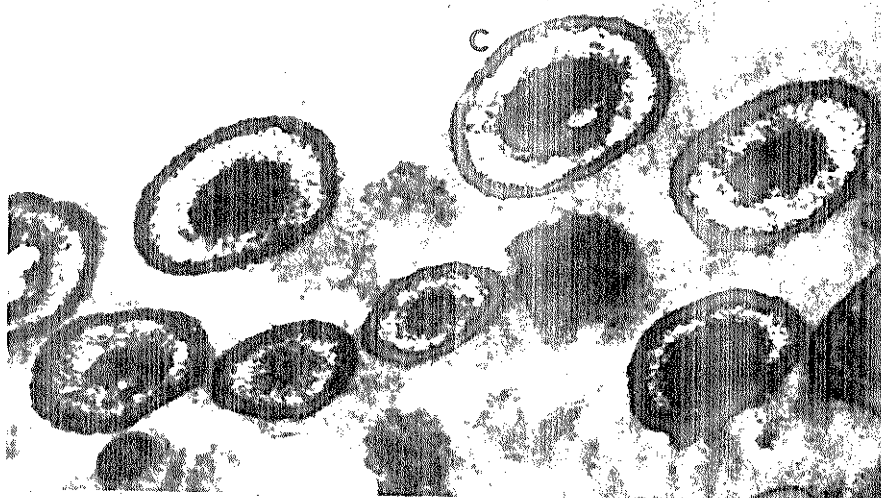
FIGURAS 135 e 136 - Atividade ATPásica em invaginações (i) do plasmalema de célula distal. Figura 135 - Regiões de invaginações do plasmalema com forte reatividade (setas maiores) alternadas por áreas sem resposta (setas menores). Figura 136 - Detalhe da Figura 135. bm = lâmina basal. c = "concreções". m = mitocôndrias. pl = plasmalema. t = traquéia. Figura 135, X 17200; Figura 136, X 23000.



FIGURAS 137 a 140 - "Concreções" laminares (c) da região distal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* com resposta positiva ao método para ATPases. Figura 137, X 19000; Figura 138, X 27000; Figura 139, X 46700; Figura 140, X 21200.



138



139



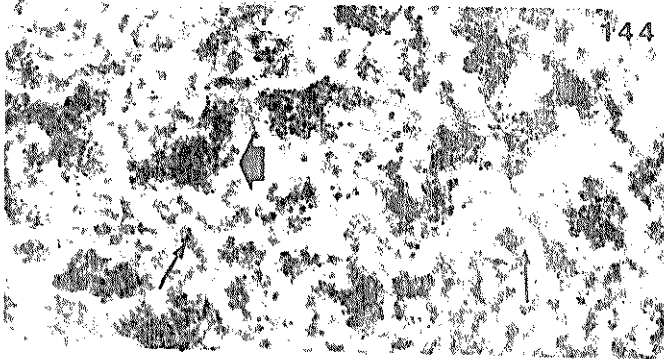
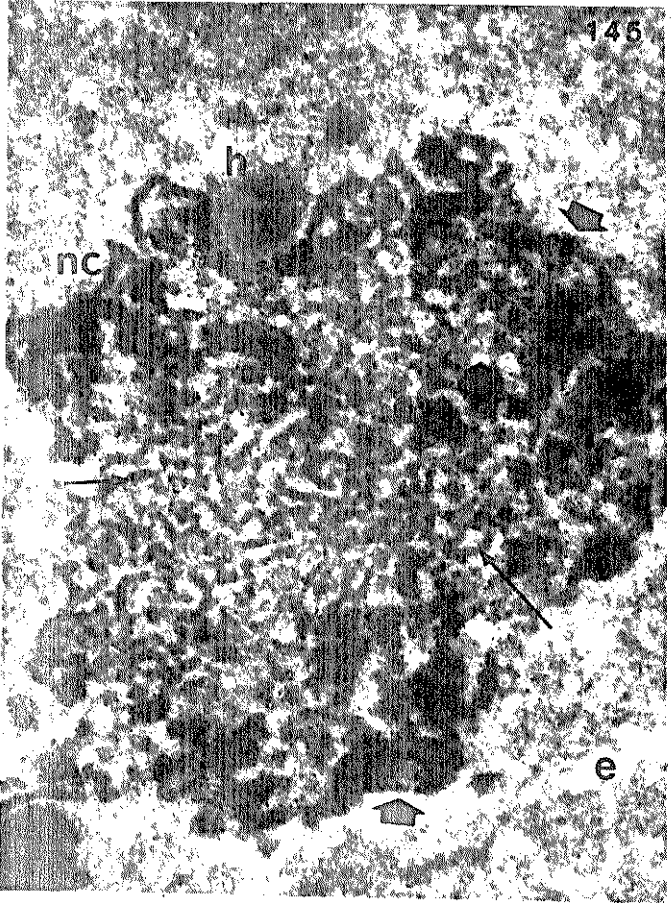
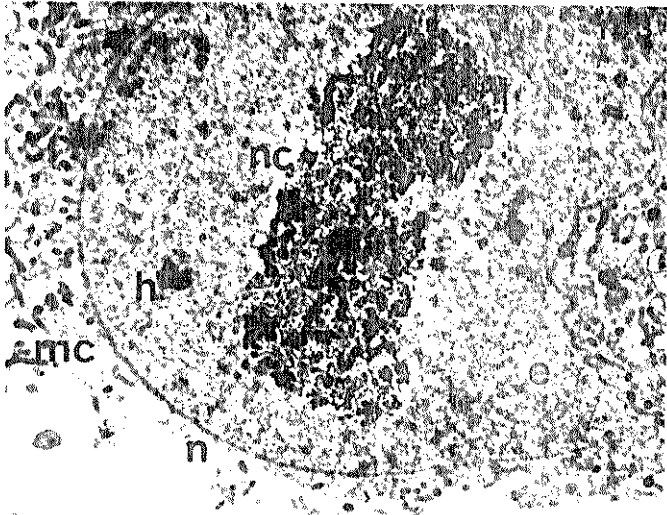
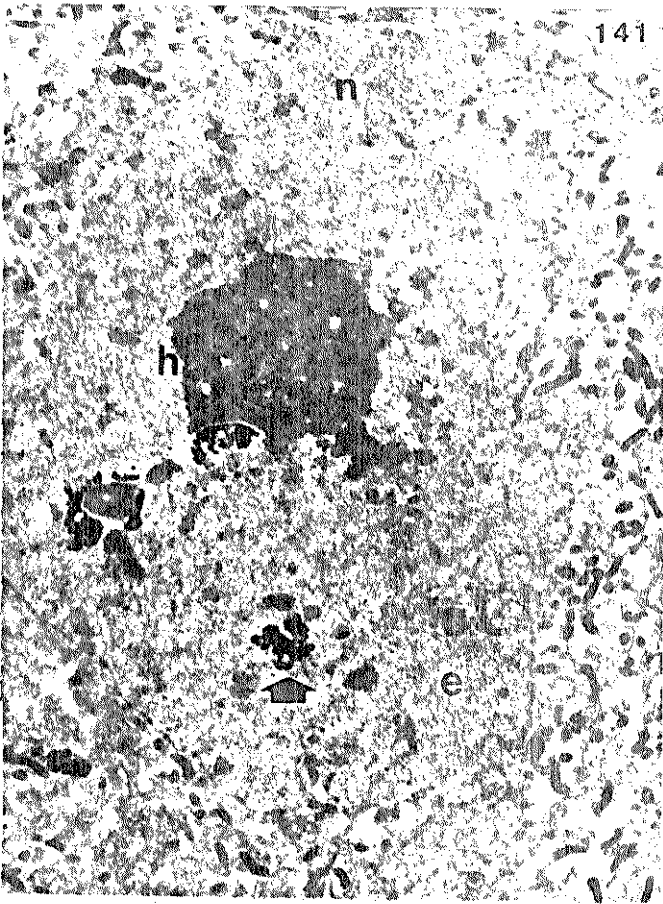
ME

tra ou mesmo com relação à parte periférica ou interna de cada uma (Figuras 135 a 140).

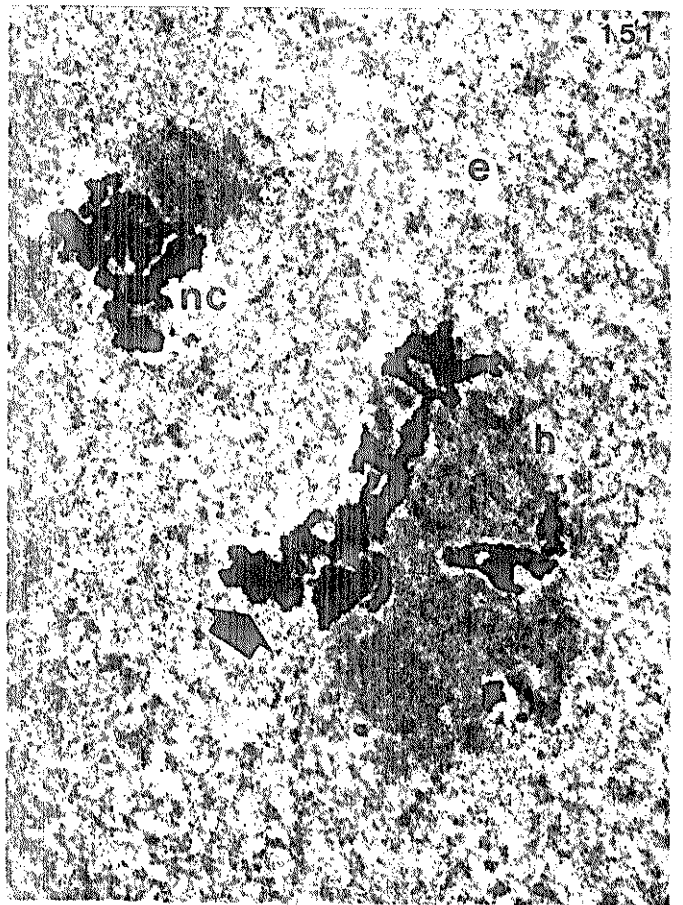
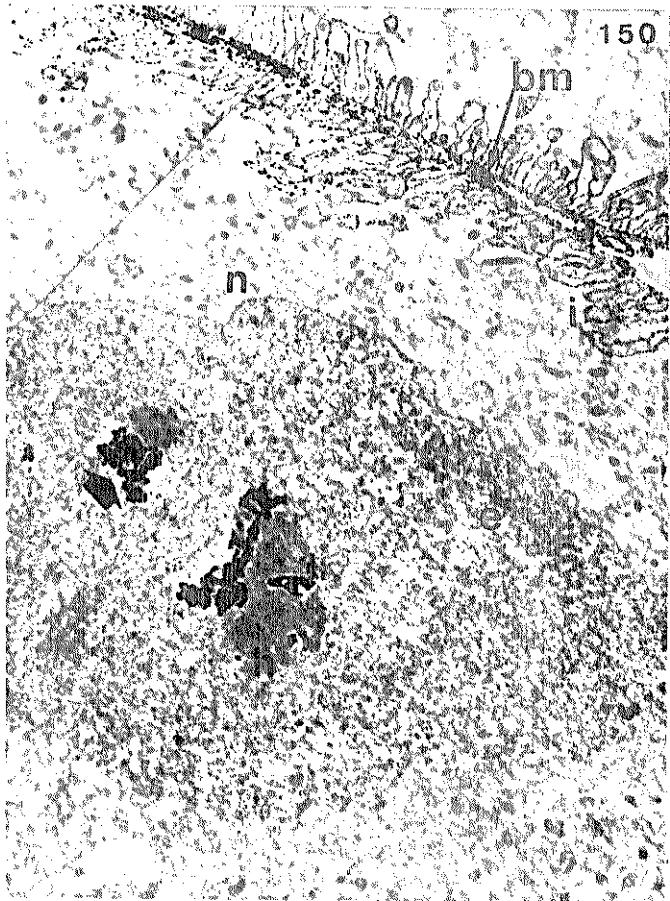
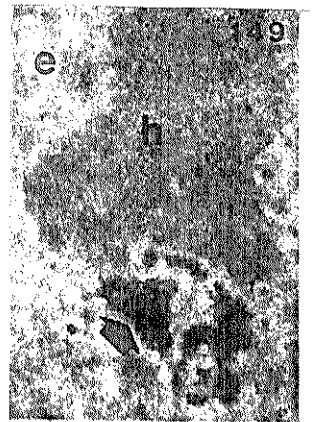
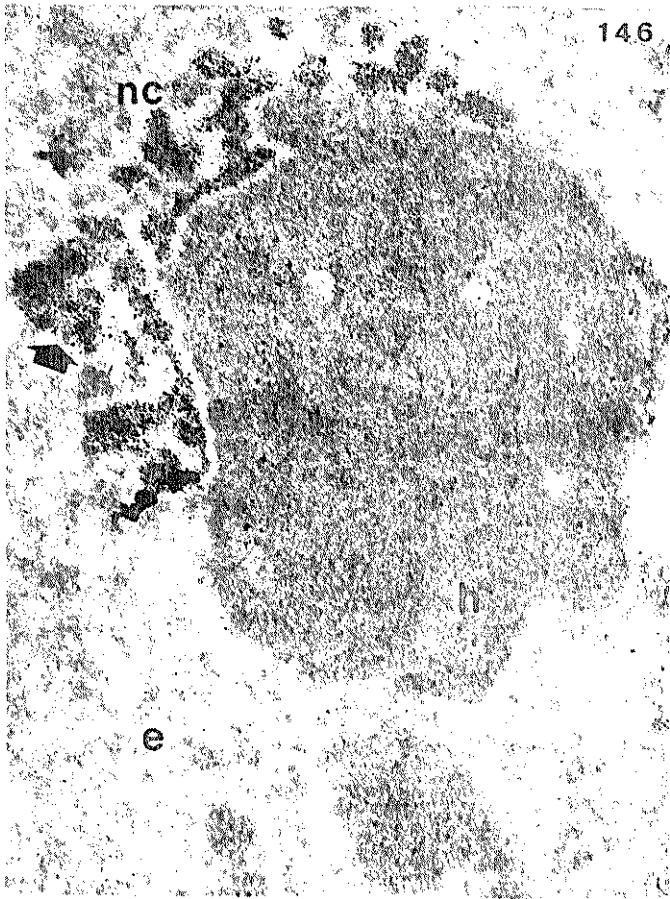
Os núcleos tanto da região distal (Figura 145) quanto da proximal (Figuras 141 a 144 e 146 a 151) tiveram resposta semelhante. Nos núcleos examinados a heterocromatina, eucromatina e envólucro nuclear geralmente não apresentaram marcação. Quando esta se achava presente na cromatina, era sob a forma de um fino precipitado de fosfato de chumbo tanto sobre a hetero como sobre a eucromatina (Figuras 150 e 151). Em todos os núcleos observados sem exceção, o nucléolo sempre apresentou reatividade ao método para ATPases, variando apenas quanto à intensidade. Foi detectada nesses, desde uma suave marcação (Figuras 141 a 149) à forte intensidade de resposta (Figuras 150 e 151). As áreas mais condensadas do nucléolo apresentaram mais depósitos do que as fibrilares (Figuras 144, 145, 147 e 148).

Os túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* quando submetidos ao meio incubador, na ausência de sulfato de magnésio, apresentaram tanto as "concreções" laminares da região distal como as invaginações do plasmalema e a lâmina basal das duas regiões ainda respondendo positivamente ao método (Figuras 152 a 155). Nos núcleos de ambas as regiões não foi observado qualquer tipo de marcação. Os túbulos de Malpighi incubados na ausência de ATP não apresentaram resposta na lâmina basal e invaginações do plasmalema das células da região proximal (Figura 156). Nas células da região distal, porém, foi detectada reatividade na lâmina basal, invaginações do plasmalema (Figura 157) e "concreções". No entanto, essa reatividade foi muito menor do que a detectada nos túbulos submetidos à reação na presença do substrato (Fi

FIGURAS 141 a 145 - Núcleos de células de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* com forte atividade nucleolar. Notar maior reatividade nas porções mais compactas (setas largas) e menor nas fibrilares (setas finas) dos nucléolos. n = núcleo. nc = nucléolo. h = heterocromatina. e = eucromatina. mc = microvilosidades. Figura 141, X 6000; Figura 142, X 12600; Figura 143, X 3800; Figura 144, X 20000; Figura 145, X 17600.



FIGURAS 146 a 151 - Atividade ATPásica em núcleos de células proximais de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans*. Figuras 146 a 149 - Maior atividade nas porções nucleolares compactas (setas largas) e menor nas porções fibrilares (setas finas). Figuras 150 e 151 - Forte e homogênea reatividade nucleolar (seta larga) e fino precipitado nas áreas hetero e eucromáticas. n = núcleo. nc = nucléolo. h = heterocromatina. e = eucromatina. bm = lâmina basal. i = invaginações do plasmalema. Figura 146, X 22600; Figura 147, X 10000; Figura 148, X 19400; Figura 149, X 19600; Figura 150, X 4300; Figura 151, X 10000.



FIGURAS 152 a 155 - Túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* incubado na ausência de sulfato de magnésio mostrando ainda reatividade nas "concreções" (c), lâmina basal (bm) e invaginações (i). Figura 152, X 16000. Figura 153, X 9000; Figura 154, X 26500; Figura 155, X 19500.

FIGURAS 156 e 157 - Túbulo de Malpighi incubado na ausência do substrato (ATP). Figura 156 - Lâmina basal (bm) e invaginações (i) do plasmalema sem resposta enzimática na região proximal. Figura 157 - Lâmina basal (bm) e invaginações (i) com tênue reatividade na região distal. c = "concreções". cg = glóbulo citoplasmático contendo vírus descritos por DOLDER & MELLO (1978a, b). t = traquéia. Figura 156, X 9500; Figura 157, X 10000.

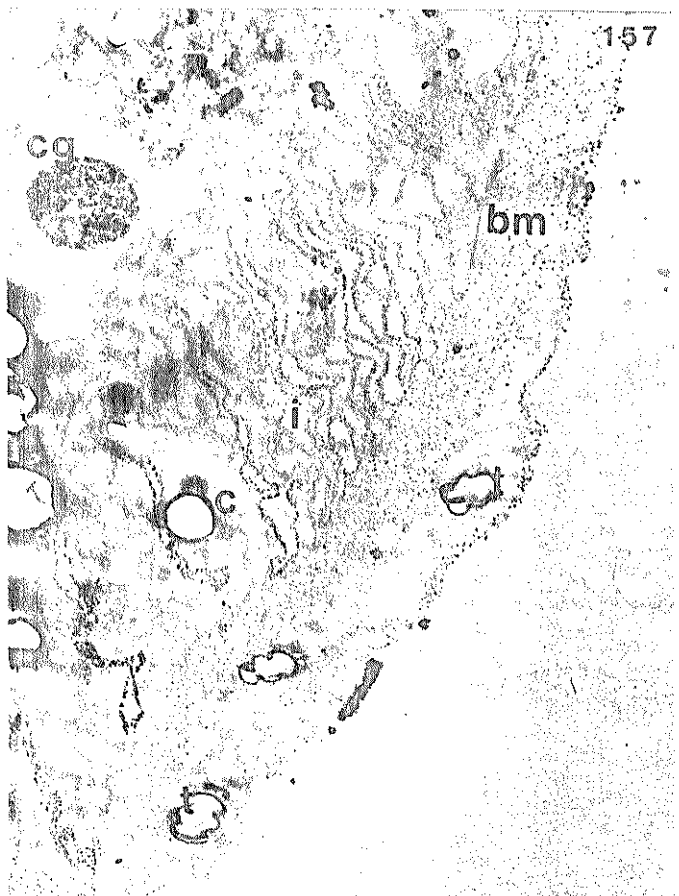
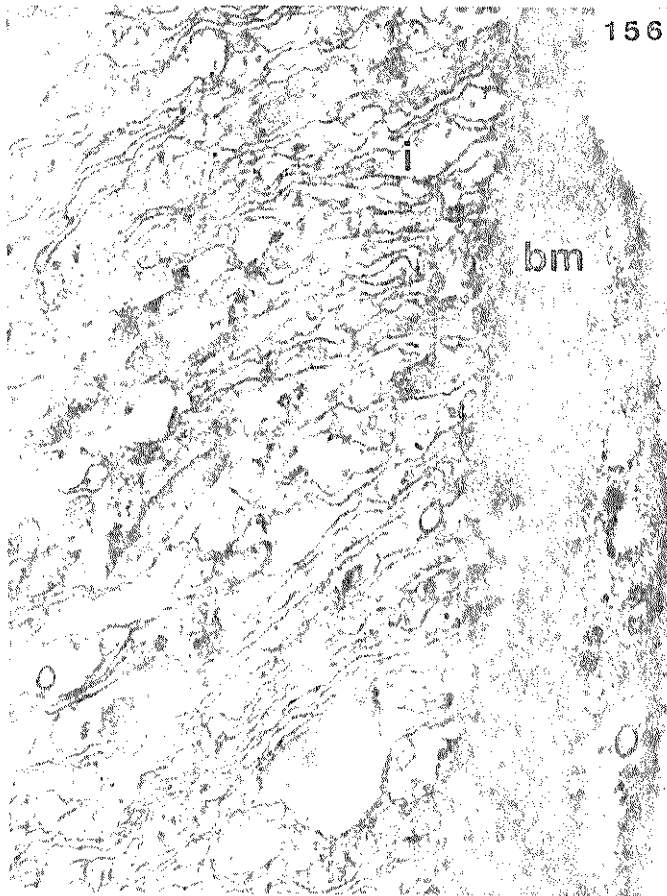
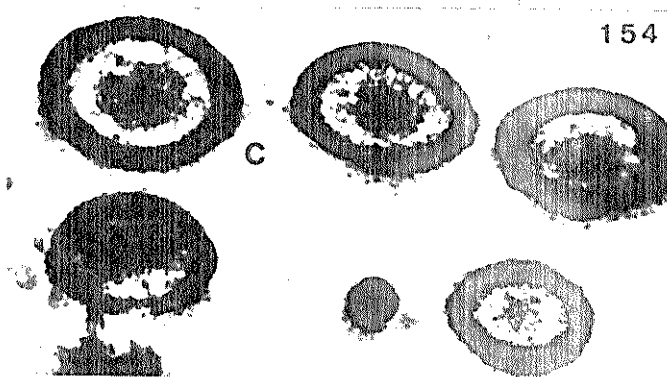
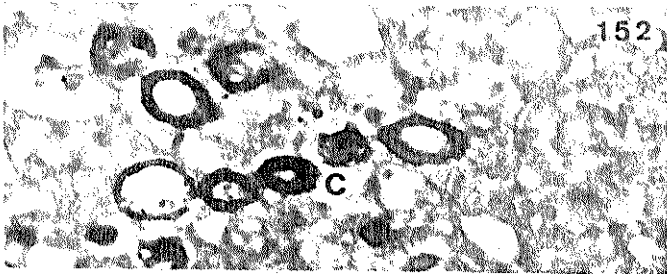
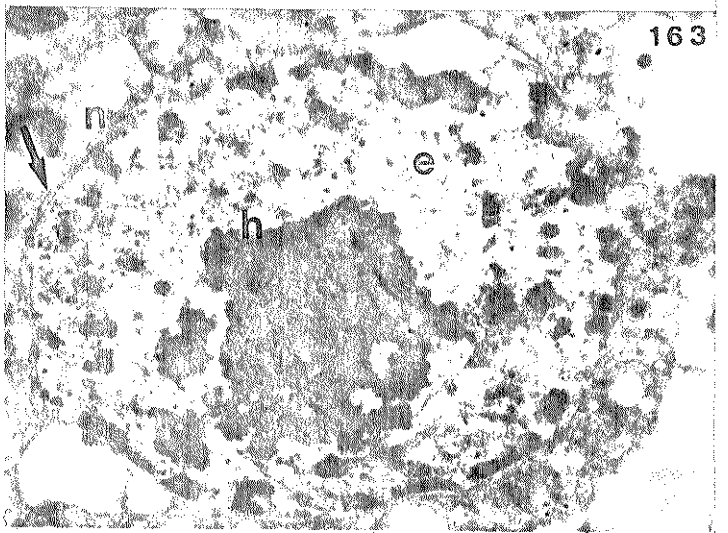
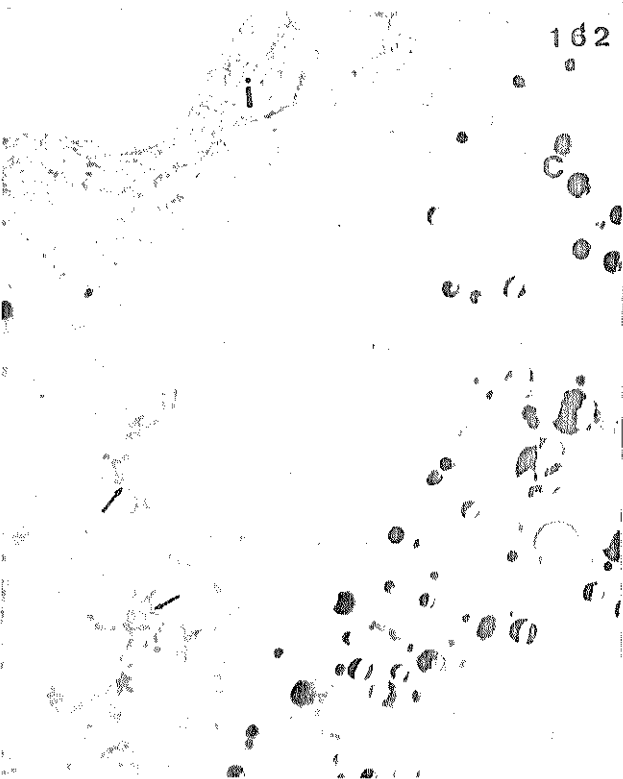
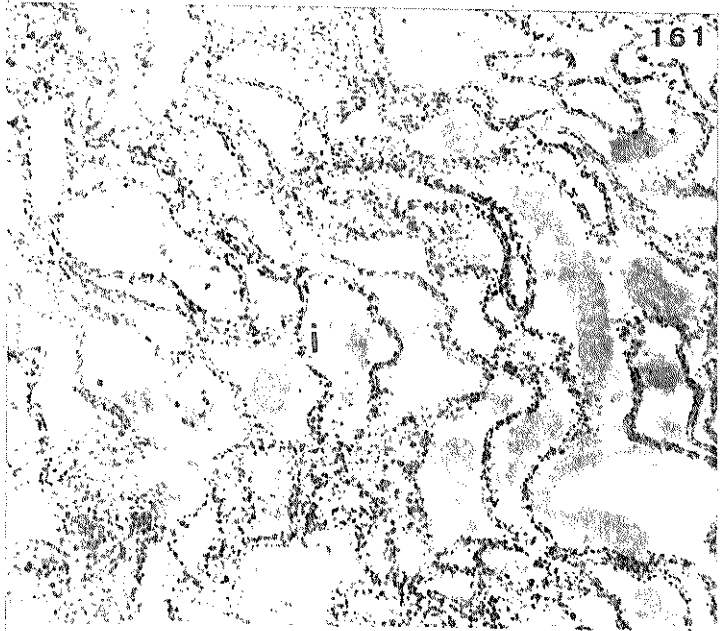
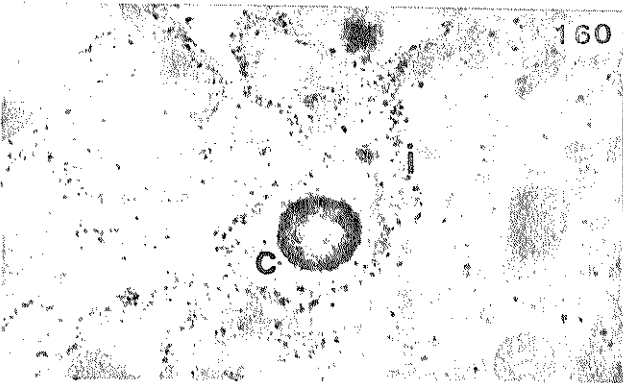
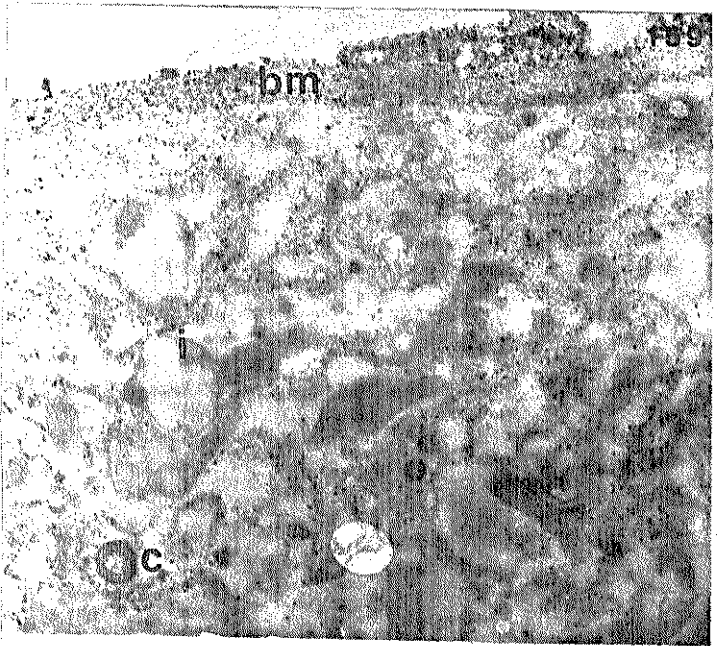
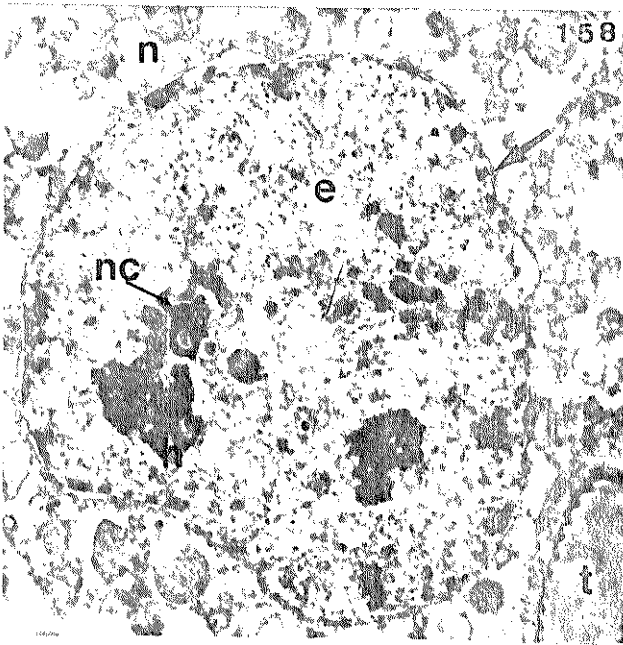


FIGURA 158 - Núcleo (n) da região proximal de túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* incubado na ausência de ATP. Resposta negativa. nc = nucléolo. h = heterocromatina. e = eucromatina. t = traquéia. seta = envólucro nuclear. X 7800.

FIGURAS 159 e 160 - Célula distal de túbulo de Malpighi incubado na presença de fluoreto de sódio (NaF). Notar fraca reatividade na lâmina basal (bm), invaginações (i) e "concreções" (c). Figura 159, X 6000; Figura 160, X 9500.

FIGURAS 161 a 163 - Túbulo de Malpighi incubado na presença de oligomicina. Figura 161 - Invaginações (i) do plasmalema basal com resposta ATP_âsica. Figura 162 - Célula da região distal mostrando reatividade em concreções (c), invaginações (i) e tênue marcação nucleolar (setas). Figura 163 - Núcleo (n) da região proximal com resposta negativa. h = heterocromatina. e = eucromatina. seta = envólucro nuclear. Figura 161, X 22000; Figura 162, X 5000; Figura 163, X 14500.



guras 135 e 136) e ausência de sulfato de magnésio (Figura 155). Os núcleos das duas regiões não mostraram resposta positiva (Figura 158).

O uso de fluoreto de sódio no meio incubador apenas atenuou a reatividade na lâmina basal, invaginações do plasmalema e "concreções" (Figuras 159 e 160). Núcleos da região distal e proximal não apresentaram reatividade.

Os túbulos de Malpighi incubados na presença de oligomicina mostraram reatividade apenas pouco inibida nas invaginações do plasmalema, membrana basal e "concreções" (Figuras 161 e 162). Alguns núcleos não apresentaram deposições (Figura 163), embora outros tenham mostrado leve marcação nucleolar (Figura 162).

A nível ultraestrutural todos os dados obtidos se referem a tubulos de Malpighi de *Triatoma infestans* de 5º estadio.

IV - DISCUSSÃO

Os dados do presente trabalho demonstram ocorrência de peroxidases, desidrogenases succínicas, fosfatases ácidas e alcalinas e ATPases sensíveis a Mg^{++} nos túbulos de Malpighi de ninfas jovens e de 5º estadio e também de adultos de *Triatoma infestans*. Essa conclusão se apoia na especificidade dos métodos citoquímicos utilizados, principalmente quando acompanhados dos respectivos controles, e de resultados paralelos obtidos em outros materiais para os quais se conhece de longa data o tipo de resposta citoquímica esperada para as diversas enzimas pesquisadas tanto a nível fotônico como a nível ultraestrutural.

1. Peroxidases

Atividade peroxidásica foi observada nas células da região distal dos túbulos de Malpighi confinada principalmente a corpos semelhantes a peroxissomos. Estes, observados à microscopia eletrônica, foram muito mais reativos à diamino

benzidina quando submetidos ao meio de incubação a pH 7,6 do que a pH 9,0. Deve-se salientar que o método para evidenciação de peroxidases a pH 7,6 (GRAHAM & KARNOVSKY, 1966) foi mo dificado por NOVIKOFF & GOLDFISCHER (1969) (pH 8-9) para melhor visualização dos peroxissomos em rim e fígado. No entanto, à semelhança do que se observou nos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, GREEN (1979c) não conseguiu também, com o método de NOVIKOFF & GOLDFISCHER (1969), melhor evidenciação de catalase em peroxissomos dos túbulos de Malpighi de *Arachnocampa luminosa*. O mesmo ocorreu com HIRAI (1974) e STELLY *et alii* (1975) que não conseguiram uma apreciável colo ração pela DAB em peroxissomos do protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis*. DANNEN & BEARD (1977) também não encontraram reação positiva em peroxissomos de rim do gastrópodo terrestre *Ariolimax columbianus*, apesar de terem efetuado um grande número de variações da metodologia de NOVIKOFF & GOLDFISCHER (1969), variações essas que envolveram principalmente pH (7 a 10), tempo de incubação, concentração de DAB e peróxido de hidrogênio. Simultaneamente, pesquisando essa ati vidade em peroxissomos de rim de outro gastrópodo, *Arion ater*, DANNEN & BEARD (1977) encontraram neste resposta positi va. Atribuíram, então, a ausência de coloração nos peroxissomos de *Ariolimax* à não penetração dos reagentes até a enzima, por esse tecido ter sido pré-incubado em meio com DAB sem peróxido de hidrogênio antes de ser transferido ao meio completo recém-preparado.

No presente trabalho foi utilizada tal pré-incubação, seguindo a sugestão de ESSNER (1973b), de que esse com posto ^(DAB) tem lenta penetração nos tecidos e dessa forma haveria mais uniformidade na coloração. Possivelmente, no caso dos tú

bulos de Malpighi de *Triatoma infestans* os peroxissomos requieram tempo de incubação e concentração de DAB e peróxido de hidrogênio diferentes dos normalmente utilizados para outros tecidos para serem melhor evidenciados.

Também deve ser mencionado que fixação com aldeídos causa uma inibição marcante da atividade catalítica da catalase, enquanto aumenta sua atividade peroxidásica (HERZOG & FAHIMI, 1974). No presente trabalho foi utilizada uma fixação com glutaraldeído a 2,5% durante 2 horas, o que pode ter sido motivo para inibição da atividade catalítica da catalase.

Além das clássicas funções admitidas para os peroxissomos (DE DUVE & BAUDHUIN, 1966; TOLBERT, 1981), especialmente de órgãos excretores (PITTS, 1973 e 1974), é possível que tais organelas nos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, como em outros insetos, estejam relacionadas com metabolismo de nitrogênio (SHNITKA, 1966; WALL *et alii*, 1975; GREEN, 1979c).

É interessante observar que na proximidade dos cristais de urato, no lúmen da região proximal dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, foram frequentemente observadas estruturas filamentosas reativas à DAB. Talvez sejam elas remanescentes de peroxissomos, onde ao lado de catalases enzimas envolvidas no metabolismo de ácido úrico estejam também presentes.

R. WEGMANN (informação pessoal, 1981) sugere que se coloquem sais de urato no meio de incubação, sendo que se for constatado um aumento da coloração, essa resposta provavelmente será devida à presença de urato-oxidase nessas estruturas e não a uma atividade peroxidásica.

Embora em túbulos de Malpighi de *Arachnocampa*

luminosa, GREEN (1979c) sugira a participação de peroxissomos na formação de "esferitos", em *Triatoma infestans* tal tipo de relação não pôde ser encontrada especialmente porque nestas "concreções" laminares não ocorreu reação positiva para peroxidases nas duas condições metodológicas utilizadas.

Diferindo do que vem sendo relatado para os túbulos renais de vertebrados (ESSNER, 1970; GOECKERMANN & VIGIL, 1975), não se detectou nos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* variação na ocorrência de corpos com atividade peroxidásica em função do desenvolvimento.

Resposta positiva aos dois métodos utilizados (mais acentuadamente a pH 9,0), nas mitocôndrias tanto da região distal como da proximal dos túbulos de Malpighi encontra apoio em observações semelhantes em muitos tipos de células de plantas e animais (BEARD & NOVIKOFF, 1969; NOVIKOFF & GOLDFISCHER, 1969; STELLY *et alii*, 1975). Essa oxidação da DAB em mitocôndrias tem levantado dúvidas: se devida a artefato, presença de citocromo *c* ou peroxidase específica dessa organela. A intensidade da reação parece variar de um tipo de célula a outro e mesmo entre mitocôndrias da mesma célula. Alguns autores interpretam seus achados como sendo indicativos da existência de uma verdadeira peroxidase mitocondrial (ROTHMAN, 1968; THREADGOLD & READ, 1968; HALTON, 1969). No entanto, LUMSDEN *et alii* (1969) consideram essa resposta como sendo devida à estrutura dos citocromos favorável em reagir com a DAB. Deve-se acrescentar que, por adição de citocromo *c* ao meio, há aumento da reação das mitocôndrias em células do rim (BEARD & NOVIKOFF, 1969). Além disso, a "coloração" mitocondrial está caracterizada pelo acúmulo do produto da reação no espaço interno às cristas (intracristas) e no espaço entre

as membranas internas e externas, coincidindo com a localização do citocromo *c*. Ainda não está claro se o acúmulo nas membranas das cristas é devido a um simples aumento no comprimento do polímero de DAB oxidado (NOVIKOFF *et alii*, 1972) ou a um espalhamento do produto da reação na superfície das membranas (SELIGMAN *et alii*, 1973). AL-ALI e ROBINSON (1979), sugerem que a oxidação mitocondrial da DAB localiza citocromo *c*, mas como os citocromos *a* e *a₃* estão envolvidos na reação (reoxidam o citocromo *c*), o produto da reação é a demonstração de todos eles. A reação ao nível da membrana interna não pode ser considerada como devida à atividade de citocromo oxidase, pelo menos em tecidos fixados com glutaraldeído, já que tal enzima é marcadamente inibida por esse fixador (SABATINI *et alii*, 1963; NOVIKOFF *et alii*, 1972). No caso dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, no entanto, a coloração mitocondrial mostrou-se mais forte justamente quando a concentração do glutaraldeído foi menor. Ainda mais, mesmo na ausência de peróxido de hidrogênio, houve reação mitocondrial a pH 9,0, embora menos acentuada, à semelhança do que ocorre em protozoários, inclusive em mutantes deficientes em citocromo oxidase (STELLY *et alii*, 1975). Levanta-se, assim, a hipótese da existência de uma peroxidase mitocondrial, possivelmente, até, uma citocromo *c* peroxidase, como sugerido por HIRAI (1974).

2. Desidrogenases succínicas

MELLO & DOLDER (1977 e 1980) estudando aspectos ultraestruturais dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* em ninfas jovens e de 5º estadio, encontraram densa concentração de mitocôndrias próxima à parte apical das células.

las distais e à lâmina basal das células proximais. Esta foi a mesma localização dos grânulos de formazana que identificam a atividade SDH das mitocôndrias (NACHLAS, *et alii*, 1957).

Essa localização preferencial das mitocôndrias pode ser tentativamente correlacionada com as funções específicas das diferentes regiões do órgão. As células distais estão relacionadas com eliminação de potássio e água enquanto as células proximais reabsorvem as substâncias do lúmen (WIGGLESWORTH, 1931b). WIGGLESWORTH & SALPETER (1962) sugeriram que a distribuição mitocondrial nos túbulos de Malpighi indica "o sítio de máxima necessidade de energia nas células", e isso torna-se um modelo de gradiente osmótico para o transporte de fluido já que as mitocôndrias são encontradas em íntima associação com bombas de soluto para dar um caminho mínimo de difusão para ATP (BERRIDGE & OSCHMAN, 1972).

As mitocôndrias dos túbulos de Malpighi são encontradas em íntima associação com as microvilosidades e invaginações da membrana plasmática basal, sugerindo portanto alta atividade metabólica nesses locais, possivelmente transporte de íons (MATHEW & RAI, 1975).

A associação mitocondrial com invaginações da membrana basal e com o bordo celular apical são aspectos característicos de epitélio de transporte, não só de túbulos de Malpighi, mas também de glândulas salivares de insetos (BERRIDGE & OSCHMAN, 1969; OSCHMAN & BERRIDGE, 1970) e túbulos proximal e distal de rim de mamíferos (TISHER *et alii*, 1971).

O achado a nível fotônico, portanto, confirmou a localização mitocondrial já descrita, revelando topograficamente a presença de SDH e dispensando a pesquisa da mesma em

nível ultraestrutural.

3. Fosfatases alcalinas

O método escolhido para detecção de fosfatases alcalinas, enzimas com atividade ótima a pH 9,0 - 9,6, nos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, foi uma variação do método de fosfato de cálcio de GÖMÖRI (1952). O meio de incubação no método original inclui Beta-glicerofosfato de sódio, nitrato de cálcio e cloreto de magnésio (ativador). Neste trabalho utilizou-se cloreto de cálcio e sulfato de magnésio (a-tivador). As fosfatases alcalinas liberam fosfato do Beta-glicerofosfato de sódio, o qual se combina com íons cálcio, formando fosfato de cálcio. O precipitado de fosfato de cálcio, tratado com nitrato de cobalto, produz fosfato de cobalto. Este, na presença de sulfeto de amônia diluído leva à formação de sulfeto de cobalto, que é visível ao microscópio fotônico como um depósito escuro.

A resposta positiva ao método de Gömöri encontrada nas células distais de túbulos de Malpighi de ninfas (39 e 59 estadio) e adultos foi detectada em parte dos glóbulos citoplasmáticos que se supõe sejam as "concreções" laminares, características dessa região do órgão. Este achado estaria de acordo com dados de GOURANTON (1968b) sobre forte atividade fosfatásica alcalina nos túbulos de Malpighi de homópteros, justamente numa região onde havia maior quantidade de "concreções" ou de "esferitos" minerais. A atividade enzimática, segundo esse autor, desaparecia nas proximidades da região onde ocorria degradação dessas "concreções". Também, BERKALOFF (1959) detectou tal atividade enzimática nos "esferitos" dos túbulos de Malpighi de *Gryllus domesticus*.

A dificuldade em se estabelecer a composição química das "concreções" ou "esferitos" é que essas estruturas

tão frequentes em insetos são solúveis em fluidos ácidos, impedindo a aplicação de um número relevante de métodos citoquímicos (TURBECK, 1974). Mesmo assim, alguns pesquisadores já determinaram que tais estruturas em várias espécies de insetos são compostas principalmente de carbonatos e fosfatos geralmente de cálcio e magnésio (BERKALOFF, 1959; GOURANTON, 1968a; HEVERT *et alii*, 1974; WALL *et alii*, 1975; MELLO & VIANA, 1977; GREEN, 1979c). No caso particular de *Triatoma infestans*, as "concreções" contêm cálcio e RNA (MELLO & VIANA, 1977).

A precipitação nas "concreções" após o método de Gömöri poderia, pois, ser explicada pelo seu conteúdo em fosfato ou carbonato de cálcio (TURBECK, 1974), o que acarretaria uma falsa resposta positiva com relação ao grupo enzimático pesquisado.

No entanto, já foi descrito nos vertebrados, que fosfomonoesterases (fosfatases alcalinas) estão relacionadas com a calcificação (MOOG, 1946). Altas atividades dessas enzimas têm sido constantemente encontradas em vários locais de calcificação e suas possíveis funções neste processo têm sido discutidas. LINDE & MAGNUSSON (1975), encontraram duas fosfatases ativas a pH alcalino capazes de degradar ATP, em células formadoras de tecido duro, no caso, odontoblastos de ratos. Uma delas é uma fosfatase alcalina não específica que é ativa contra pNPP, PPi, AMP, ATP e glicerofosfato entre outros substratos. A outra fosfatase é uma verdadeira ATPase- Ca^{2+} que não somente é dependente mas também é ativada por esses íons. Esses autores concluíram que a fosfatase alcalina não específica poderia funcionar na remoção de alguns compostos fosfatados da área de mineralização, já que esses são ini

bidores desse processo (por exemplo, PPI) e aumentar a concentração do fosfato na área de calcificação. A ATPase- Ca^{2+} poderia primariamente funcionar como uma enzima transportadora de íons Ca^{2+} para o sítio de mineralização, provavelmente pelo acúmulo de íons Ca^{2+} nas células formadoras do tecido duro. GRANSTRÖM *et alii* (1978), encontraram semelhança na localização de ATP- Ca^{2+} e fosfatase alcalina em odontoblastos de incisivos de ratos, utilizando-se tanto de citoquímica para essas enzimas a nível de ultraestrutura como de técnica de fracionamento celular em combinação com ensaios bioquímicos para essas fosfatases.

Além disso, fala em favor de uma atividade fosfatásica alcalina nas "concreções", o fato da maioria das mesmas não mostrar precipitado quando os preparados foram incubados na ausência de substrato.

Atividade fosfatásica alcalina em animais tem sido também relacionada com depleção de reservas de glicogênio (GOURANTON *et alii*, 1968a; YADAV & KARYAKARTE, 1980).

TURBECK (1974) sugere uma relação entre glicogênio e "esferitos" ("concreções"). Durante a diferenciação de células regenerativas do intestino médio de larvas de lepidópteros, a maior parte dos "esferitos" estão localizados na região apical celular, justamente onde os grânulos de glicogênio são encontrados. A deposição de glicogênio na matriz de "esferitos", mesmo após a ruptura da membrana, é sugestivo de uma interação entre esses constituintes citoplasmáticos. Na quebra de glicogênio, ortofosfato é usado e este é muito provavelmente um constituinte aniônico dos "esferitos" (TURBECK, 1974). MELLO & DOLDER (1977) observaram nos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* áreas envoltas por glicogê-

nio que pareciam ter seu conteúdo parcialmente removido durante a desidratação dos espécimens, aspecto esse semelhante ao das células de intestino médio de larva de lepidóptero (TURBECK, 1974). Considerando-se que nos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* maiores áreas de depósito de glicogênio ocorrem justamente nas células que contêm "concreções" (MELLO & DOLDER, 1977) e que nestas estruturas, ou ao seu redor, se detectam fosfatases alcalinas, pode-se levantar a hipótese de que essas enzimas possam aí participar no mecanismo de depleção de glicogênio quando seriam utilizados ortofosfatos liberados das "concreções".

Na região proximal dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* também foi detectada atividade fosfatásica alcalina, embora menos intensa do que a da região distal, devido provavelmente à ausência de "concreções" na primeira.

JOHNSON & RIEGEL (1977) observaram a nível de microscopia eletrônica uma combinação de finos depósitos intracelulares, principalmente no retículo endoplasmático liso, e fortes depósitos extracelulares nas invaginações do plasmalema da região proximal de túbulo de Malpighi de *Glomeris marginata* quando da pesquisa de fosfatase alcalina; de modo semelhante à localização de atividade fosfatásica alcalina encontrada a nível fotônico também no bordo das células da região proximal dos túbulos de Malpighi dos homópteros estudados por GOURANTON (1968b). No caso de *Triatoma infestans* não foi possível detectar atividade fosfatásica alcalina junto à região apical celular provavelmente devido ao tipo de preparado utilizado (montagens totais). Tenciona-se no entanto, no futuro, pesquisar-se esse grupo enzimático a nível ultraestrutural.

A presença da fosfatase alcalina nos túbulos de Malpighi pode também estar relacionada com o transporte de fosfatos ou de cálcio (HAUSSLER *et alii*, 1970). Essa hipótese encontra apoio em dados de NAGODE *et alii* (1966) que detectaram abundância dessa enzima em intestino, rim e osso, justamente envolvidos no transporte de cálcio. É conhecido, por exemplo, que animais raquíticos, portanto deficientes em vitamina D, possuem uma atividade fosfatásica alcalina menor do que a normal, simultaneamente à pouca absorção de cálcio (PILEGGI, 1955). Calcificação metastática renal muito semelhante às "concreções" observadas nos túbulos de Malpighi de insetos, por outro lado, é induzida em ratos submetidos a dietas com altas doses de vitamina D (GIACOMELLI *et alii*, 1964). Sabe-se que o transporte de cálcio é um processo ativo nos túbulos contorcidos de rim (CHEN & NEUMAN, 1955); no entanto a participação estrutural celular nesse processo, não está ainda definida. Alterações ultraestruturais sugerem diversos mecanismos para reabsorção de cálcio pelos túbulos contorcidos proximais. Cálcio e talvez fosfato possam ser reabsorvidos no lúmen dos mesmos e transportados dentro de vacúolos por mecanismo pinocitótico. Como um processo alternado, o cálcio poderia passar através da superfície da membrana celular diretamente ao citoplasma e subsequentemente acumular-se dentro de vacúolos intracelulares (GIACOMELLI *et alii*, 1964).

Atividade fosfatásica alcalina como a observada nos núcleos das duas regiões dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, mais acentuadamente nos da região distal, foi já observada em alguns outros materiais. Foi sugerido um possível papel dessa enzima na transcrição gênica e metabolismo celular (HUANG *et alii*, 1976).

GÖMÖRI já em 1941 havia encontrado atividade fos

fosfatásica alcalina em núcleos de diferentes tecidos de várias espécies animais estudadas. VINCENT (1952) detectou atividade fosfatásica alcalina em nucléolos de oócitos de *estrela-do-mar*. SIEBERT (1966) narra também a presença dessas enzimas no nucleólo de células de fígado de rato.

Já foi também demonstrada atividade fosfatásica alcalina em membranas nucleares de leucócitos eosinófilos de intestino de rato (SANDBORN & MAKITA, 1969) e em complexos de poro nucleares de tecidos normais e neoplásicos de glândulas salivares (CUTLER, 1974).

Em células HeLa os trabalhos sobre a localização de fosfatase alcalina em núcleos são conflitantes. GRIFFIN *et alii* (1967) afirmaram que acima de 75% da atividade enzimática estava localizada no núcleo, sendo confirmado pelo trabalho de SPENCER & MACRAE (1972). Por outro lado, HUGON *et alii* (1967) observaram que, citoquimicamente a membrana celular era o sítio de intensa atividade da fosfatase alcalina e nenhum precipitado da reação havia sido observado na membrana nuclear ou no interior do núcleo.

LIN *et alii* (1976) examinaram a localização da atividade fosfatásica alcalina através de técnicas de fracionamento celular e citoquímica ultraestrutural em células HeLa. Não encontraram depósitos nucleares ao nível ultraestrutural e atribuíram a significativa atividade encontrada na fração nuclear a uma provável contaminação por células não rompidas. Uma maior atividade, no entanto, foi detectada na membrana plasmática. GRANSTRÖM *et alii* (1978) também atribuem a atividade fosfatásica alcalina encontrada na fração nuclear de odontoblastos de ratos a uma eventual contaminação ou de restos celulares, células inteiras, ou ainda por membranas mito-

condriais.

No caso presente não se pode concordar com a idéia de ser artefactual a atividade nuclear detectada, já que nos controles utilizados não foi observada nenhuma resposta nuclear. Sabe-se que em *Triatoma infestans* o nucléolo acha-se intimamente associado ao corpo heterocromático, às vezes formando um anel em torno dele (MELLO & DOLDER, 1978). É possível que a atividade fosfatásica alcalina aparentemente associada à heterocromatina ocorra em realidade no nucléolo e que as variações da atividade enzimática detectada se liguem a diferentes etapas das funções do mesmo.

4. Fosfatases ácidas

A atividade fosfatásica ácida (fosfatases com atividade a pH ótimo de 4,5 - 6,0) detectada no citoplasma dos túbulos de Malpighi de ninfas de 3º e 5º estádios apresentou localização igual à da atividade fosfatásica alcalina. É de se esperar, portanto, que esteja contida nos lisossomos (células proximais e distais) e "concreções" laminares (células distais) desse órgão.

Convém ressaltar que pela técnica de Gömöri para fosfatases ácidas o material é incubado em um meio contendo Beta-glicerofosfato de sódio, como substrato e nitrato de chumbo. As enzimas liberam fosfato do substrato e dessa forma um precipitado insolúvel de fosfato de chumbo fica no sítio da atividade enzimática. Esse precipitado tratado com solução diluída de sulfeto de amônia é convertido em sulfeto de chumbo, visível ao microscópio como um depósito granular denso e escuro.

A atividade fosfatásica ácida detectada nas "con

creções" laminares tanto a nível fotônico como eletrônico é forte argumento sugestivo de natureza ou origem lisossomal para essas estruturas. Baseando-se em observações ultraestruturais, MELLO & DOLDER (1977) sugeriram que as "concreções" dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* estariam envolvidas na excreção de substâncias e também no mecanismo pelo qual as células se livrariam de organelas em desuso. Emitiram opinião semelhante à de WIGGLESWORTH & SALPETER (1962), os quais estudaram túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*, de que essas "concreções" poderiam se originar de mitocôndrias lisadas ou de sua mineralização.

SOHAL *et alii* (1976) determinaram diferentes origens para os três tipos de "concreções" detectadas nos túbulos de Malpighi de *Musca domestica*. Essas poderiam aparentemente ser formadas pelo seqüestro de materiais dentro de vacúolos envoltos por membrana originados da membrana basal (Tipo A), corpos multivesiculares relacionados com seqüestro de material denso que eventualmente resultaria em sua transformação em estruturas concrecionadas (Tipo B) e lisossomos secundários ou corpos residuais (Tipo C). Concreções do tipo C mostraram uma localização positiva para o produto da reação da atividade Beta-glicerofosfatásica sugerindo também sua natureza lisossomial. Esse tipo de "concreção" é acumulado progressivamente no citoplasma com o avanço da idade do organismo. Há ainda fortes sugestões que essas concreções representariam corpos residuais derivados de corpos multivesiculares assim como citolisossomos. Ainda segundo Sohal *et alii* (1976) essas estruturas poderiam corresponder a futuros estágios da evolução lisossomal.

Também RIEGEL (1971), estudando estruturas esfê-

ricas denominadas por ele de "corpos formados" em túbulos de Malpighi de "bicho pau" sugere serem as mesmas originadas de vesículas pinocitóticas contendo enzimas hidrolíticas (lisossomais) relacionadas com a digestão de material inútil ao organismo.

BEADLE & GAHAN (1969), por outro lado, detectaram atividade Beta-glicerofosfatásica nos "esferitos" do intestino médio de *Carausius morosus*, semelhante ao observado nas "concreções" de *Triatoma infestans*.

Uma vez que os fosfatos de cálcio são solúveis a pH ácidos (BANCROFT, 1967), não poderiam ser eles responsabilizados pela resposta positiva ao método utilizado, mesmo na ausência de substrato.

Parece razoável concluir, portanto, que a semelhança com as "concreções" do tipo C detectadas por SOHAL *et alii* (1976) que atuariam inclusive como sítio de depósito de minerais, as "concreções" dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* possam se originar do aparelho lisossomal e estar envolvidas na excreção de substâncias e mecanismo de depuração celular, como previamente sugerido por MELLO & DOLDER (1977). Poderiam também estar envolvidas no movimento transepitelial de substâncias, como já mencionado por WESSING & EICHELBERG (1975).

A nítida atividade fosfatásica ácida observada nas invaginações do plasmalema e na lâmina basal principalmente das células distais não era esperada, já que essa localização é típica de fosfatases alcalinas e ATPases (HUGON *et alii*, 1967; JOHNSON & RIEGEL, 1977). No entanto, na literatura, conforme descrito a seguir, há vários relatos de atividade fosfatásica ácida nesses locais da célula. Observações des

se tipo foram, por exemplo, constatadas em células da placenta humana (HOFFMAN & DI PIETRO, 1972), em levedura (*Paracoccidioides brasiliensis*) (CAMPO-AASEN & YARZÁBAL, 1981), e em *Candida albicans* (TRONCHIN *et alii*, 1980).

SASAKI & FISHMAN (1973) demonstraram sítios extralisossomais positivos para fosfatase ácida em rim de rato. Esses sítios envolvem lâmina basal e invaginações do plasmalema basal e apical. A fim de se confirmar se essa reação seria devida à fosfatase ácida e não à alcalina ou à ATPase, MIYAYAMA *et alii* (1975) utilizaram-se de um número de experimentos bioquímicos e citoquímicos com inibidores específicos e ativadores para fosfatase alcalina (cianeto e cloreto de magnésio, respectivamente) e ATPase dependente de Na^+ e K^+ , especialmente, neste último caso ouabaína como inibidor. Ainda assim detectaram sítios de atividade enzimática. Estes apareceram proeminentes nas microvilosidades dos túbulos proximais e áreas da lâmina basal de ambas regiões dos túbulos (proximais e distais) a nível de microscopia fotônica bem como em organelas citoplasmáticas (a nível de microscopia eletrônica). MIYAYAMA *et alii* (1975) acharam notável o resultado da localização enzimática no "bordo em escova" e na membrana plasmática das células epiteliais do túbulo proximal e distal (a nível ultraestrutural). Como os resultados com inibidores e ativadores não demonstraram ser a fosfatase alcalina ou ATPase- Na^+ - K^+ responsáveis pela reação, concluíram que a enzima visualizada era uma fosfatase ácida não específica, podendo ser associação de duas ou mais isoenzimas desta.

Deve ser ressaltado que Beta-glicerofosfato de sódio pode ser hidrolisado por todas as isoenzimas da fosfatase ácida e que até presentemente não há substrato para essa

enzima totalmente específico para determinados tecidos. Ainda há necessidade de cuidadosa seleção de substratos para se permitir localização exclusiva de isoenzimas individuais (MCDONALD *et alii*, 1980).

Segundo FRANZI *et alii* (1980), simultâneo à ativação do sistema lisossomal, durante a transformação de monócitos em macrófagos, haveria um aumento significativo na taxa de renovação da membrana plasmática pela internalização da mesma como constituinte de pinocitossomos e fagossomos. Estes autores sugerem que ambos fenômenos possam ser avaliados pela medida da atividade de fosfatase ácida nos lisossomos e na membrana plasmática.

Quanto à atividade fosfatásica ácida em núcleos, como a verificada em *Triatoma infestans*, dados da literatura indicam ter sido ela detectada em alguns outros sistemas. SIEBERT (1966) encontrou essa atividade em células de fígado de rato, porém a nível bioquímico. A nível ultraestrutural fosfatases ácidas têm sido reportadas em nucléolos de células humanas (SORIANO & LOVE, 1971) e em nucléolos de *Allium cepa* (SANCHES-PINA *et alii*, 1978). Neste último material, a localização foi obtida preferencialmente no componente fibrilar do nucléolo e principalmente próximo a região do organizador nucleolar.

MIYAYAMA *et alii* (1975) detectaram precipitados de fosfato de chumbo na cromatina nuclear condensada de algumas células dos túbulos contorcidos de rim de rato. A quantidade e a densidade do depósito frequentemente variavam de um núcleo para outro. O substrato utilizado por esses autores, contudo, não foi Beta-glicerofosfato de sódio e sim p-nitrofenilfosfato (pNPP).

No entanto, a questão de real atividade fosfatásica ácida nuclear é muito controvertida, pois enquanto alguns pesquisadores não hesitam sobre a possibilidade de existirem sítios enzimáticos autênticos no núcleo (LOVE *et alii*, 1969; SORIANO & LOVE, 1971; DELTOUR *et alii*, 1981) outros acreditam que haja uma afinidade particular da cromatina pelos íons chumbo (DEANE, 1963; REMY *et alii*, 1975) ou difusão da fosfatase lisossomal para o núcleo (ANASTASIA-SAWICKI & MACINTYRE, 1976; WASHITANI & SATO, 1976).

BARKA & ANDERSON (1962) fazem uma análise sobre a validade da coloração nuclear com o método de nitrato de chumbo de Gömöri e sugerem possíveis modificações para o mesmo, a fim de diminuir a coloração nuclear, já que esses autores consideram artefactual esse dado. Segundo eles, as fontes mais comuns de erros poderiam estar relacionadas à composição imprópria do meio de incubação (que promoveria difusão do produto de hidrólise) e à natureza particulada do produto final da reação (que é associado com precipitados granulares e cristalinos). Ainda, segundo esses autores, a concentração de nitrato de chumbo poderia ser reduzida sem afetar a distribuição e intensidade da reação, o que minimizaria a coloração nuclear e a formação de precipitados. No entanto, observaram também, que abaixo de uma certa concentração crítica, a intensa coloração nuclear reaparece.

Para outros autores, a presença dos precipitados de chumbo no núcleo seria devida ou ao prolongamento da fixação em glutaraldeído, o qual provocaria a difusão da enzima, ou a um desequilíbrio chumbo-substrato (REMY *et alii*, 1975). PRIESTER (1972), investigando lisossomos no intestino médio de *Calliphora erythrocephala* notou que durante incubação em

meio com concentração de íons chumbo muito baixa, ocorria uma forte reação nuclear e drástica redução da quantidade de precipitado lisossomal. É interessante notar, no entanto, que os precipitados não estavam presentes no meio sem Beta-glicero-fosfato de sódio.

Por outro lado, a validade da resposta enzimática às fosfatases ácidas em núcleos é defendida com ênfase por DELTOUR *et alii* (1981), os quais trabalharam com células de raiz de milho e estudaram a presença dessas enzimas em nível citoquímico, com o microscópio eletrônico, e em nível bioquímico. Sugerem estes autores uma correlação entre a taxa de transcrição nuclear, o nível de atividade fosfatásica ácida e o acúmulo de fosfato inorgânico nuclear. Alta atividade fosfatásica ácida foi justamente encontrada nos núcleos com metabolismo elevado.

No caso dos resultados referentes aos núcleos de *Triatoma infestans*, parecem também não serem eles artefatuais. A presença de fosfato inorgânico nos sítios da reação é descartada, considerando-se que a fixação do tecido com glutaraldeído o elimina (TANDLER & SOLARI, 1969). A reação positiva, por outro lado, é abolida na ausência do substrato ou com o uso de fluoreto de sódio. Nos mesmos preparados não parece ter ocorrido difusão do produto da reação dos lisossomos, "concreções" e lâmina basal. Além disso, muita da atividade enzimática se localiza sobre a heterocromatina e nucléolo, supostos como interrelacionados em fenômenos de transcrição nesse material (MELLO & DOLDER, 1978). Essa atividade varia conforme a região dos túbulos assim como também varia a localização, forma e número dos corpos heterocromáticos (MELLO, 1971) e a morfologia nucleolar (MELLO, 1980 - informa

ção pessoal). Melhor comprovação da hipótese dessa atividade enzimática relacionada ao mecanismo de transcrição poderá ser estudada no futuro, utilizando-se insetos submetidos a jejum prolongado, com sensível declínio de transcrição de RNA_r (MELLO *et alii*, 1981) ou a tratamento com Actinomicina D (AMD) e efetuando-se a reação para fosfatases ácidas em núcleos isolados.

5. ATPases dependentes de Mg⁺⁺

As ATPases aqui referidas, dadas as condições do método, são aquelas dependentes de magnésio (WACHSTEIN & MEISEL, 1957; WEGMANN, 1968). A atividade dessas ATPases, observada a nível fotônico foi inibida por fluoreto de sódio e oligomicina, ausência de Mg⁺⁺ e geralmente ausência de ATP. A nível ultraestrutural não se observou inibição tão acentuada, a não ser na ausência do substrato.

O método empregado para a pesquisa a nível da microscopia fotônica (SLATER, 1958, modificado segundo WEGMANN & BANKOWSKY, 1960) utiliza nitrato de cobalto como íon precipitador no lugar de nitrato de chumbo, usado na metodologia para microscopia eletrônica (WACHSTEIN & MEISEL, 1957). Resultados obtidos com ambos os métodos terão maior aceitabilidade, uma vez que a reação que utiliza nitrato de chumbo tem sido criticada por alguns autores como artefactual (MOSES & ROSENTHAL, 1968; VAN STEVENINCK, 1979). Mesmo assim, os resultados ao nível de microscopia eletrônica encontram apoio na literatura.

A nível fotônico, a região distal dos túbulos de Malpighi apresentou larga variação na resposta ao método citoquímico para as ATPases, o que é sugestivo de variações celu-

lares metabólicas. Observou-se que a atividade ATPásica nessas células além de aparecer em granulações finas que possivelmente representem mitocôndrias, é detectável também nos glôbulos correspondentes às "concreções" laminares. A nível de microscopia eletrônica a presença dessa enzima em "concreções" é também sugerida, porém não o foi detectável nas mitocôndrias.

Atividade ATPásica junto a cristais de urato, no lúmen da região proximal dos túbulos de Malpighi, só pôde ser constatada a nível de microscopia fotônica. Estes cristais não foram observados a nível de microscopia eletrônica, provavelmente devido à alta solubilidade dos mesmos no fixador tetróxido de ósmio (MELLO & DOLDER, 1977; DOLDER & MELLO, 1979). Uma explicação para essa atividade no entanto, não foi encontrada.

O significado dos achados a nível de membrana plasmática e lâmina basal por outro lado, pode ser alvo de várias interpretações. Segundo ESSNER (1973a), essa atividade tem sido demonstrada na membrana plasmática de uma variedade de tipos celulares. Entretanto, em muitos tecidos, a atividade enzimática na membrana plasmática exibiria especificidade maior, frequentemente hidrolisando todos nucleosídeos trifosfatos e, em poucas vezes (isto é, em certos neurônios) nucleosídios difosfatos.

A exata relação entre a ATPase dependente de Mg^{++} , demonstrável citoquimicamente e a chamada ATPase de transporte de membrana ($ATPase\ Na^+-K^+$) identificada bioquimicamente, e que participa no transporte ativo de cátions (SKOU, 1962), não está ainda clara.

Segundo BONTING *et alii* (1962) o meio de

Wachstein-Meisel, baseado na técnica de Gömöri, não pode ser usado para se demonstrar a bomba de sódio (ATPase - $\text{Na}^+\text{-K}^+$). Essa conclusão foi obtida através de experimentos em que a adição de $0,01\text{M Pb}^{++}$ à mistura usada para o ensaio biológico da ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ causou quase 100% de inibição da enzima.

Resta, ainda a possibilidade que a atividade demonstrada por esse método de precipitação seja relacionada a uma atividade ATPásica dependente de magnésio que não funciona no transporte ativo mas em alguma atividade desconhecida (NOVIKOFF, 1967; MARCHESI & PALADE, 1967).

Ainda segundo ESSNER (1973a), a precisa localização do produto da reação de ATPase nas membranas plasmáticas não pôde ser estabelecida conclusivamente. Muitas vezes, os depósitos ocorrem sobre a superfície livre das membranas plasmáticas e não do lado citoplasmático. Em células isoladas, o produto também se acumula na superfície livre, e pode se difundir desse sítio para o meio. Em muitos tecidos, o acúmulo do produto da reação ocorre no interior do espaço entre plasmalemas de células adjacentes. Em superfícies especializadas, tais como membranas do canalículo biliar de hepatócitos, o produto da reação é inicialmente depositado sobre a superfície livre das microvilosidades que se projetam em direção ao lúmen. Após longa incubação, esse produto se acumula dentro do lúmen.

A presença de atividade ATPásica na membrana basal e invaginações do plasmalema, na ausência de magnésio, pode ser atribuída à presença de íons cálcio, quando da adição de cloreto de cálcio ao glutaraldeído e tampão cacodilato na primeira fixação. Já é conhecido o fato de que a presença de Ca^{2+} pode estimular essa ATPase mesmo na ausência de Mg^{2+} .

(ENGEL & TICE, 1966; NAGAHASHI *et alii*, 1978), induzindo um marcante aumento na taxa de hidrólise de ATP (PERRET & VIANA, 1981).

Ainda, há casos na literatura em que essa ATPase é ativa mesmo na ausência de magnésio, como no retículo sarcoplasmático de músculo de coelho (TICE & ENGEL, 1966; ENGEL & TICE, 1966) e na membrana celular de músculo cardíaco de cão (MALOUF & MEISSNER, 1980). Todos esses autores consideram tal ATPase, não especificamente dependente de magnésio, e podendo ser ativada por cátions divalentes, mais efetivamente por cálcio, uma verdadeira "ATPase básica".

A resposta enzimática na membrana plasmática, mesmo na ausência do substrato, talvez possa significar que a mesma possua níveis fisiológicos significantes de atividade ATPásica *in vivo* e que ainda estes níveis permaneçam atuantes no tecido, mesmo após a fixação.

Ainda deve ser ressaltado que a atividade ATPásica ao nível da membrana plasmática dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* possa estar relacionada com o transporte ativo de moléculas provenientes da hemolinfa.

Tanto em núcleos da região proximal como da região distal dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* foi detectada atividade ATPásica. Ao nível fotônico e eletrônico as heterocromatinas parecem não apresentar resposta positiva à metodologia empregada, embora os métodos difiram entre si. Por outro lado, evidente resposta ao método foi encontrada na eucromatina (nível fotônico) e nucléolo (nível fotônico e eletrônico).

A presença de ATPases em nucléolos de fígado de rato já foi sugerida bioquimicamente (SIEBERT, 1966). Recente

mente foi detectada atividade ATPásica dependente de magnésio e independente de cálcio em cromossomos plumosos de oócito de *Pleurodeles waltlii*, sugerida como tendo função nos fenômenos de contração e distensão dos mesmos, atuando sobre proteínas nucleares contráteis, por ocasião de fenômenos de transcrição (KARSENTI & GOUNON, 1979). Por outro lado, tem sido também sugerida a necessidade de atuação de ATPases nos fenômenos de desenrolamento do DNA durante a sua replicação (ALBERTS & STERNGLANZ, 1977).

ARAI *et alii* (1981) reportaram uma ATPase específica, que parece usar a energia da hidrólise do nucleosídeo trifosfato para a translocação do "primossomo" no fago ϕ X174, o que pode ter importante implicação na replicação do DNA.

VORBRÖDT & BOUN (1979) detectaram a presença de uma ATPase (ATPase - Ca^{++}) no núcleo de células HeLa apenas na fase de síntese, ao passo que uma ATPase- Mg^{++} esteve presente nas membranas plasmáticas durante todo o ciclo celular, mantendo provavelmente o nível de íons Mg^{++} os quais são necessários para funções metabólicas, incluindo a síntese de DNA e proliferação celular (RUBIN & CHU, 1978). A presença do produto da reação (ATPase - Ca^{++}) no núcleo celular não está clara mas, parece haver nesse caso uma conexão entre a atividade ATPásica - Ca^{++} e replicação cromossômica. Também é possível que em células em fase de síntese (S) possa ocorrer ativação da ATPase nuclear.

Também há evidências de envolvimento da nucleosídeo trifosfatase presente no envelope nuclear, na translocação nucleocitoplasmática de ribonucleoproteínas (RNP). Essa atividade ATPásica em envólucro nuclear foi descrita para fígado de rato e porco, macronúcleo de *Tetrahymena* e fibroblas-

tos em cultura (AGUTTER *et alii*, 1976 e 1977).

VORBRÖDT & MAUL (1980) tentaram estabelecer a localização e função dessa enzima durante alguns passos do processo de transporte de RNP através do envólucro nuclear. No entanto, conseguiram apenas demonstrar associação de atividade NTPase com estruturas intranucleares conhecidas por conter RNP, e uma reação positiva para NTPase no envólucro nuclear.

SIEBERT (1960 e 1963) menciona que a atividade ATPásica possa estar conectada com ação repressora dos genes. Já BUCHVALOV & UNGER (1977) acreditam que essa enzima esteja envolvida na defosforilação dos produtos finais da degradação de RNA ou na manutenção do "pool" de ortofosfatos nos núcleos.

Embora o significado fisiológico da atividade ATPásica nuclear e especialmente nucleolar não esteja claro e haja necessidade de futuras investigações nesse campo, é altamente provável que essas enzimas sejam também requeridas nos fenômenos de transcrição, os quais evidentemente ocorrem nas eucromatinas e no organizador nucleolar. Em heterocromatinas constitutivas como as do *Triatoma infestans* a ocorrência de transcrição é rara e ligada às funções do nucléolo, na região de contato heterocromatina-nucléolo (MELLO & DOLDER, 1978; MELLO, 1980 - informação pessoal).

As diferenças em detecção de ATPases na eucromatina, quando se comparam observações ao nível fotônico com as de nível ultraestrutural, provavelmente se relacionem aos próprios métodos citoquímicos usados, que diferem entre si, e também a diferentes etapas do fenômeno de transcrição.

A total inibição pela oligomicina da reatividade do nucléolo ao método citoquímico, ao menos em nível fotônico

(e também nesse nível, da eucromatina), é uma observação interessante, uma vez que esse antibiótico vem se prestando a estudos de inibição de atividade ATPásica em mitocôndrias (RACKER, 1976). Com base nesses estudos é de se supor que as ATPases nucleolares e cromatínicas também possam existir na forma de complexos que incluam a presença de fatores proteicos sensíveis à oligomicina (LEHNINGER, 1976; RACKER, 1976).

V - CONCLUSÕES

1. Peroxidasas, desidrogenases succínicas, fosfatases ácidas e alcalinas e ATPases ativadas por Mg^{++} podem ser detectadas citoquimicamente em túbulos de Malpighi de ninfas e adultos de *Triatoma infestans*.
2. Oxidação de benzidina e diaminobenzidina, tipicamente realizada por peroxidasas, é evidenciável respectivamente ao nível fotônico e eletrônico, em peroxissomos e mitocôndrias, e nos filamentos em íntimo contato com os cristais de urato presentes no lúmen da região proximal dos túbulos. A oxidação de DAB em mitocôndrias, mesmo na ausência de peróxido de hidrogênio, levanta a hipótese da existência de uma peroxidase mitocondrial, possivelmente até uma citocromo c peroxidase. Quanto aos filamentos extracelulares, podem se tratar de remanescentes de peroxissomos, talvez envolvidos no metabolismo de ácido úrico.

3. A localização mitocondrial nos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, já descrita a nível ultraestrutural (maior concentração de mitocôndrias próximo à parte apical das células distais e à lâmina basal das células proximais), é confirmada pela atividade SDH nessas regiões dos túbulos.
4. De modo geral, as fosfatases alcalinas detectadas pelo método de Gömöri poderão estar relacionadas com o transporte de fosfatos ou cálcio. Supõe-se que uma atividade fosfatásica alcalina ocorra nas "concreções" laminares da região distal dos túbulos, detectada a nível fotônico, o que estaria de acordo com dados da literatura para estruturas semelhantes em outras ordens de insetos. Essa atividade enzimática pode se ligar ao processo de calcificação das "concreções". Participação de fosfatases alcalinas na depleção de glicogênio quando seriam utilizados ortofosfatos liberados das "concreções", é também sugerida.
5. Atividade fosfatásica ácida detectada pelo método de Gömöri ocorre nas "concreções" laminares (células distais), lisossomos típicos, núcleos (células distais e proximais), invaginações do plasmalema e lâmina basal (principalmente células distais).
6. Usando-se dois métodos para detecção de atividade peroxidásica a nível de microscopia eletrônica não se observou participação de peroxissomos na formação das "concreções" (células distais). Por outro lado, a atividade fosfatásica ácida detectada nessas estruturas, tanto a nível fotô-

nico como eletrônico, indica que elas possam ter origem ou natureza lisossomal.

7. Atividade ATPásica detectável com método citoquímico para microscopia fotônica mostrou-se variável, de célula para célula, na região distal dos túbulos de Malpighi, sugerindo variações metabólicas. Essa atividade é atribuída à presença de mitocôndrias e "concreções". Já na região proximal dos túbulos, apenas os núcleos exibiram alguma reação. Plasmalema e lâmina basal das células distais, ao microscópio eletrônico, por outro lado, exibiram atividade admitida como ATPásica dependente de Mg^{++} e relacionada com o transporte ativo de moléculas procedentes da hemolinfa.
8. Atividades relativas a fosfatases alcalinas, ácidas e ATPase dependente de Mg^{++} , ocorrem no nucléolo das células proximais e distais dos túbulos. Além disso, atividade fosfatásica ácida é demonstrável na heterocromatina e atividade ATPásica é encontrada na eucromatina, neste último caso quando se usa o método citoquímico para microscopia fotônica. Há sugestão de que tais atividades enzimáticas no nucléolo e eucromatina se relacionem a processos de transcrição.

SUMÁRIO

Peroxidases, desidrogenases succínicas (SDH), fosfatases ácidas e alcalinas e ATPases ativadas por Mg^{++} foram detectadas citoquimicamente nos túbulos de Malpighi de ninfas e adultos de *Triatoma infestans*, todas ao nível de microscopia fotônica e algumas com microscopia eletrônica. As regiões dos túbulos analisadas (proximal e distal) diferem em características ultraestruturais e fisiológicas. Atividade peroxidásica avaliada por oxidação de diaminobenzidina foi evidenciada em peroxissomos, mitocôndrias (citocromo *c* peroxidase?) e em filamentos extracelulares intimamente associados a cristais de urato (lúmen da região proximal dos túbulos). Atividade SDH, seguindo a distribuição preferencial das mitocôndrias no órgão, foi detectada na região apical das células distais e região basal das células proximais. Fosfatases alcalinas detectadas pelo método de Gömöri nas células distais, possivelmente se relacionem de um lado ao processo de calcificação de "concreções" laminares aí presentes e, de outro, com a depleção de glicogênio, quando seriam usados ortofosfatos liberados dessas "concreções". Além disso, também este grupo de enzimas participaria no transporte de fosfatos ou cálcio na região proximal dos túbulos. Atividade fosfatásica ácida foi detectada pelo método de Gömöri nas "concreções" laminares (células distais), nos lisossomos e núcleos (células distais e proximais) e na lâmina basal e invaginações do plasmalema (principalmente células distais). Não se observaram peroxissomos participando na formação das "concreções". Por outro lado a atividade fosfatásica ácida destas é fortemente indicativa da origem lisossomal das mesmas. Atividade ATPásica dependen-

te de Mg^{++} mostrou-se variável nas células distais dos túbulos (mitocôndrias, "concreções"?). Nas células proximais apenas núcleos exibiram alguma atividade enzimática desse tipo. O plasmalema e a lâmina basal das células distais exibiram também atividade ATPásica dependente de Mg^{++} , possivelmente relacionada com o transporte ativo de moléculas procedentes de hemolinfa. Fosfatases ácidas e alcalinas e ATPases dependentes de Mg^{++} foram demonstradas nos nucléolos das células proximais e distais dos túbulos de Malpighi. Alguma atividade ATPásica foi encontrada também na eucromatina de células proximais de alguns preparados, assim como atividade fosfatásica ácida parece ocorrer na heterocromatina de células proximais e distais. Sugere-se que as atividades enzimáticas constatadas no nucléolo e eucromatina estejam relacionadas com o processo de transcrição.

SUMMARY

Peroxidases, succinic dehydrogenases (SDH), acid and alkaline phosphatases and Mg^{++} -activated ATPase were detected cytochemically in *Triatoma infestans* nymph and adult Malpighian tubules, at the light microscope level. Some were also detected at the electron microscope level. The regions of analyzed tubules (distal and proximal) differ in ultrastructure and physiological characteristics. Peroxidase activity estimated by oxidation of DAB was found in peroxisomes, mitochondria (cytochrome c peroxidase?) and in extracellular filaments closely associated with urate crystals (lumen of distal and proximal segments). SDH activity which closely followed the distribution of the mitochondria in the organ, was detected in the apical region of distal cells and the basal region of proximal cells. Alkaline phosphatases detected by Gömöri's method in distal cells may be associated on the one hand with the calcification process of laminated "concretions" present in this region, and on the other with glycogen depletion, which would involve orthophosphates released from these "concretions". Moreover, this enzyme group also participates in phosphate or calcium transport in the proximal segment of these tubules. Acid phosphatase activity was detected by Gömöri's method in laminated "concretions" (distal cells), lysosomes and nucleus (distal and proximal cells) basal membrane and infoldings of the plasmalemma (mainly distal cells). While peroxisomes were not observed to take part in the formation of "concretions", the acid phosphatase activity of these concretions is strongly indicative of its lysosomal origin. Mg^{++} -dependent ATPase activity was shown to be variable

in distal cells of the tubules (mitochondria, "concretions"?). In proximal cells only the nucleus exhibited some enzymatic activity of this type. The plasmalemma and basal membrane of distal cells also showed Mg^{++} -dependent ATPase activity, possibly associated with active transport of molecules proceeding from haemolymph. Acid and alkaline phosphatases and Mg^{++} -dependent ATPase were demonstrated in the nucleolus of proximal and distal cells of the Malpighian tubules. Some ATPase activity was also detected in the euchromatin proximal cells of some preparations, just as acid phosphatase activity seems to occur in the heterochromatin of proximal and distal cells. It is suggested that enzymatic activities found in the nucleolus and euchromatin have some relationship to the transcription process.

ABREVIATURAS USADAS

AMD	-	Actinomicina D
AMP	-	Adenosina monofosfato
ATP	-	Adenosina trifosfato
ATPase	-	Adenosina trifosfatase
DAB	-	Diaminobenzina
ME	-	Microscopia eletrônica
MF	-	Microscopia fotônica
NTPase	-	Nucleosídeo trifosfatase
pNPP	-	p-Nitrofenilfosfato
PPi	-	Pirofosfato
RNAr	-	RNA ribossômico
RNP	-	Ribonucleoproteína
SCN	-	Sulfocianeto
SDH	-	Desidrogenase Succínica

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOLINS-KROGIS, A. Electron microscope studies of the intracellular origin and formation of calcifying granules and calcium spherites in the hepatopancreas of the snail, *Helix pomatia*. *L. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 108: 501-15, 1970.
- AGUTTER, P. S.; MCARDLE, H. J. & MCCALDIN, B. Evidence for involvement of nuclear envelope nucleoside triphosphate in nucleocytoplasmic translocation of ribonucleoprotein. *Nature*, 263: 165-7, 1976.
- AGUTTER, P. S.; HARRIS, J. R. & STEVENSON, I. Ribonucleic acid stimulation of mammalian liver nuclear-envelope nucleoside triphosphatase. *Biochem. J.*, 162: 671-9, 1977.
- AL-ALI, S. Y. & ROBINSON, N. Ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase via cytochrome *c* in cerebral cortex. *J. Histochem. Cytochem.*, 27(9): 1261-6, 1979.
- ALBERTS, B. & STERNGLANZ, R. Recent excitement in the DNA replication problem. *Nature*, 9: 655-61, 1977.
- ANASTASIA-SAWICKI, J. & MACINTYRE, R. J. Ultrastructural histochemical localization of acid phosphatase in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *J. Histochem. Cytochem.*, 24(2): 463-7, 1976.
- ANDRÉ, J. & FAURÉ-FEMIET, E. Formation et structure des

- concrétions calcaires chez *Prorodon morgani* Kahl. *J. Microscopie*, 6: 391-8, 1967.
- AKAI, H. Electron probe X-ray microanalysis and fine structure of disc-like deposits on newly exuviated *Bombyx mori* larvae. *J. Serie Sci Japan*, 49(2): 147-51, 1980.
- ARAI, K-I; LOW, R. L. & KORNBERG, A. Movement and site selection for priming by the primosome in phage ϕ X174 DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(2): 707-11, 1981.
- ANSTEE, J. H. & BELL, D. M. Relationship of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - activated ATPase to fluid production by Malpighian tubules of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, 21: 1779-84, 1975.
- ANSTEE, J. H. & BELL, D. M. Properties of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - activated ATPase from the excretory system of *Locusta*. *Insect Biochem.*, 8: 3-9, 1978.
- ANSTEE, J. H. & FATHPOUR, H. The presence and properties of a Mg^{2+} dependent HCO_3 stimulated ATPase in the Malpighian tubules of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 9: 383-8, 1979.
- ANSTEE, J. H. & FATHPOUR, H. Studies on the anion-sensitivity, oligomycin-sensitivity and sub-cellular localization of Adenosine triphosphatase activity in Malpighian tubules of *Locusta*. *Insect Biochem.*, 11: 103-15, 1981.

- BACETTI, B.; MAZZI, V. & MASSIMELLO, G. Ricerche istochimiche e al microscopio elettronico sui tubi Malpighiani di *Dacus oleae* Gmel II. L'Adulto. *Redia*, 48: 47-68, 1963.
- BALLAN-DUFRAÎÇAIS, C. Ultrastructure d'ileon de *Blatella germanica* L. (Dictyoptère). Localisation, genese et composition des concrétions minérales intracytoplasmiques. *Z. Zellforsch mikrosk. Anat.*, 133: 163-79, 1972.
- BANCROFT, J. D. *An Introduction to Histochemical Technique*. London, Butterworth, 1967.
- BARKA, T. & ANDERSON, P. J. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as complex. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 741-53, 1962.
- BEADLE, D. J. & GAHAN, P. B. Cytochemical studies of the types and localization of acid phosphatases in various regions of the midgut epithelium of *Carausius morosus*. *Histochemical J.*, 1: 539-49, 1969.

- BEAMS, H. W.; TAHMISIAN, T. N. & DEVINE, R. L. Electron microscope studies on the cells of the Malpighian tubules of the grasshopper (Orthoptera, Acrididae). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 197-202, 1955.
- BEARD, M. G. & NOVIKOFF, A. B. Distribution of peroxisomes (microbodies) in the nefron of the rat. A cytochemical study. *J. Cell Biol.*, 42: 501-18, 1969.
- BECKER, G. L.; CHEIN, C. H.; GREENAWALT, J. W. & LEHNINGER, A. L. Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Cell Biol.*, 61: 316-26, 1974.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, G. M. C.; FREITAS NETO, A. G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo, Edart, Ed. USP, 1976. p. 51-5.
- BELL, D. M. & ANSTEE, J. H. A study of the Malpighian tubules of *Locusta migratoria* by scanning and transmission electron microscopy. *Micron*, 8(3): 123-34, 1977.
- BERKALOFF, A. Les grains de sécrétion des tubes de *Gryllus domesticus* (Orthoptère, Gryllidae). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 246: 2807-9, 1958.
- BERKALOFF, A. Transformations mitochondriales et formation de pigment dans les tubes de Malpighi de *Gryllus domesticus* (Orthoptère, Gryllidae). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 249: 1934-6, 1959.

- BERKALOFF, A. Contribution a l'etude des tubes de Malpighi et de l'excrétion chez les insectes. Observations au microscope electronique. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.*, 12: 869-947, 1960.
- BERRIDGE, M. J. Metabolic pathways of isolated Malpighian tubules of the blowfly functioning in an artificial medium. *J. Insect Physiol.*, 12: 1523-38, 1966.
- BERRIDGE, M. J. Urine formation by the Malpighian tubules of *Calliphora*. I. Cations. *J. exp. Biol.*, 48: 159-74, 1968.
- BERRIDGE, M. J. Urine formation by the Malpighian tubules of *Calliphora*. II. Anions. *J. exp. Biol.*, 50: 15-28, 1969.
- BERRIDGE, M. J. & GUPTA, B. L. Fine structural changes in relation to ion and water transport in the rectal papillae of the bowfly, *Calliphora*. *J. Cell Sci.*, 2: 89-112, 1967.
- BERRIDGE, M. J. & OSCHMAN, J. L. A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. *Tissue & Cell*, 1: 247-72, 1969.
- BERRIDGE, M. J. & OSCHMAN, J. L. *Transporting Epithelia*. Academic Press, New York, 1972. Citado por Ryerse, J. S., 1979.

- BONTING, S. L.; GARAVAGGIO, L. L. & HAWKINS, N. M. Studies on sodium potassium activated Adenosine triphosphatase. IV - Correlation with cation transport sensitive to cardiac glycosides. *Arch. Bioch. Biophys.*, 98: 413-9, 1962.
- BRADFIELD, J. R. G. New features of protoplasmic structure observed in recent electron microscope studies. *Quart. J. Micr. Sci.*, 94: 351-67, 1953.
- BUCHVALOV, I. B. & UNGER, E. Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.*, 106: 139-50, 1977.
- BYERS, J. R. Metamorphosis of the perirectal Malpighian tubules in the mealworm *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae). II. Ultrastructure and role of autophagic vacuoles. *Can. J. Zool.*, 49: 1185-92, 1971.
- CAMPO-AASEN, I. & YARZÁBAL, L. Acid phosphatase observed in the intramembranous system of the yeast-like phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, 74(2): 87-8, 1981.
- CHEN, P. S. & NEUMAN, N. F. Renal excretion of calcium by the dog. *Am. J. Physiol.*, 180: 623-31, 1955.
- CHEUNG, W. W. K. & MARSHALL, A. T. Studies on water and ion transport in homopteran insects. Ultrastructure and cytochemistry of the cicadoid and cercopoid mid-gut. *Tissue & Cell*, 5: 651-69, 1973.
- CRAIG, R. The physiology of excretion in insect. *Ann. Rev. Entom.*, 5: 53-8, 1960.
- CUTLER, L. S., CHANDHRY, A. P. & MONTES, M. Alkaline phosphatase activity associated with the nuclear pore in normal and neoplastic salivary gland tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1113, 1974.

- DANNEN, E. & BEARD, M. E. Peroxisomes in pulmonate gastropods. *J. Histochem. Cytochem.*, 25(5): 319-28, 1977.
- DEANE, H. W. Nuclear localization of phosphatase activity: fact or artefact. *J. Histochem. Cytochem.* 2: 443-4, 1963.
- DELTOUR, R.; FRANSOLET, S. & LOPPE, R. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo root cells. *J. Cell Sci.* 47: 77-89, 1981.
- DE DUVE, C. & BAUDHUIN, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46: 323-57, 1966.
- DI FIORE, M. S. H.; MANCINI, R. E. & DE ROBERTIS, E. D. P. *Novo atlas de Histologia. Microscopia Optica, histoquímica e microscopia eletrônica.* 3 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973.
- DOLDER, H. & MELLO, M. L. S. Dados preliminares sobre partículas semelhantes a vírus em células de triatomíneos. *Rev. Saúde Publ.*, 12: 104-9, 1978a.
- DOLDER, H. & MELLO, M. L. S. Virus-like particle in the Malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. *Cellular & Molecular Biology*, 23: 299-310, 1978b.
- DOLDER, H. & MELLO, M. L. S. Ultrastructure of the Malpighian tubule cells of *Panstrongylus megistus* Burmeister. *J. Submicr. Cytol.*, 11(3): 385-94, 1979.
- DONADEY, C. Contribution à l'étude de rôle excréteur des

- caecums digestifs des Crustacés. Étude au microscope électronique sur *Sphaeroma serratum* (Crustaces, Isopoda). *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci, Paris, Series D*, 263: 1401, 1966. Citado por Turbeck, 1974.
- EICHELBERG, D. & WESSING, A. *Morphology of the Malpighian tubules of insects: Excretion*. A. Wessing, ed. Fortschritte der Zoology, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1975.
- ENGEL, A. G. & TICE, L. W. Cytochemistry of phosphatases of the sarcoplasmic reticulum. I. Biochemical studies. *J. Cell Biol.*, 31: 473-87, 1966.
- ESSNER, E. Observations on hepatic and renal peroxisomes (microbodies) in the developing chick. *J. Histochem. Cytochem.*, 18: 80-92, 1970.
- ESSNER, E. Phosphatases. In: HAYAT, M. A. *Electron microscopy of enzymes. Principles and methods*. New York, Van Nostrand Reinhold Co, 1973a, vol. 1, cap. 2, p. 44-76.
- ESSNER, E. Hemoproteins. In: HAYAT, M. A. *Electron microscopy of enzymes. Principles and methods*. New York, Van Nostrand Reinhold Co, New York, 1973b, vol. 2, cap. 1, p. 1-33.
- EVANS, W. A. G. *J. Insect Physiol.*, 1: 150-7, 1957. Citado por Craig, R., 1960.
- FAIN-MAUREL, M. A.; CASSIER, P. & ALIBERT, J. Étude-

- infrastructurale et cytochimique de l'intestine moyen de *Petrobius maritimus* leach en rapport avec ses fonctions excrétoire et digestive. *Tissue & Cell*, 5: 603-31, 1973.
- FAIN-MAUREL, M. A. & CASSIER, P. A comparative study of the functional capacities of the cephalic kidneys and the abdominal excretory apparatus in *Petrobius maritimus* (Insecta, Apterygota, Thysanura) [Machilidae]. *Pedobiologia* (2nd Symp. Apterygota Jevany - Czechoslovakia), 24-26 Sept 1973, 14(2-5): 173-6, 1974.
- FRANZI, A. T.; LEPRINI, A.; CADONI, A.; ZICCA, A.; CHIGLIOTTI, C. & GROSSI, C. E. Functional studies on adherent cells from human peripheral blood in short term cultures. Release of acid hydrolases and plasma membrane turnover. *J. Submicrosc. Cytol.*, 12(4): 533-45, 1980.
- FULLER, H. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Malpighischen Gefasse von *Lithobius forficatus* (L.). *Z. Wiss Zool.*, 173: 191-217, 1966.
- GEE, J. D. Active transport of sodium by the Malpighian tubules of the tsetse fly *Glossina morsitans*. *J. exp. Biol.*, 64: 357-68, 1976a.
- GEE, J. D. Fluid secretion by the Malpighian tubules of the tsetse fly *Glossina morsitans*: The effects of ouabain, ethacrynic acid and amiloride. *J. exp. Biol.*, 65: 323-32, 1976b.

- GEE, J. D. The effects of dietary sodium and potassium on rapid diuresis in the tsetse fly *Glossina morsitans*. *J. Insect Physiol.*, 23: 137-43, 1977.
- GIACOMELLI, F.; SPIRO, D. & WIENER, J. A study of metastatic renal calcification at cellular level. *J. Cell Biol.*, 22: 189-206, 1964.
- GOECKERMANN, J. A. & VIGIL, E. L. Peroxisome development in the metanephric kidney of mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 23(12): 957-73, 1975.
- GÖMÖRI, G. The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. *J. Cell Comp. Physiol.*, 17: 71-83, 1941.
- GÖMÖRI, G. An improved histochemical technic for acid phosphatase. *Stain Tech.*, 25: 81-5, 1950.
- GÖMÖRI, G. *Microscopic Histochemistry*, Chicago University Press, 1952. Citado por Bancroft, J. D., 1967.
- GOURANTON, J. Composition, structure et mode de formation des concrétions minérales dans l'intestin moyen des homoptères cecropides. *J. Cell Biol.*, 37: 316-28, 1968a.
- GOURANTON, J. Observations histochimiques et histoenzymologiques sur le tube digestif de quelques homopteres cercopides et jassides. *J. Insect Physiol.*, 14: 569-79, 1968b.
- GRAHAM, R. G. JR. & KARNOVSKY, M. J. The early stages of

- absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 11: 291-302, 1966.
- GRANSTRÖM, G.; LINDE, A. & NYGREN, H. Ultrastructural localization of alkaline phosphatases in rat incisor odontoblasts. *J. Histochem. Cytochem.*, 26(5): 359-68, 1978.
- GREEN, L. F. B. Organization and fine structure of the hindgut of the nymph of *Uropetala carovei* (Odonata: Petaluridae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 8: 311-23, 1979a.
- GREEN, L. F. B. The fine structure of the light organ of the new zealand glow-worm *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae). *Tissue & Cell*, 11(3): 457-65, 1979b.
- GREEN, L. F. B. Regional specialization in the Malpighian tubeles of the new zealand glow-worm *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae). The structure and function of type I and II cells. *Tissue & Cell*, 11(4): 673-702, 1979c.
- GREEN, L. F. B. Cryptonephric Malpighian tubule system in a dipteran larva, the new zealand glow-worm, *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Mycetophilidae). A structural study. *Tissue & Cell*, 12(1): 141-51, 1980.

- GREEN, L. F. B.; BERGQUIST, P. R. & Bullivant, S. The structure and function of the smooth septate junction in a transporting epithelium. The Malpighian tubules of the new zealand glow-worm *Arachnocampa luminosa*. *Tissue & Cell*, 12(2): 365-81, 1980.
- GRIFFIN, M. J.; COX, R. P. & GRUJIC, N. A chemical method for the isolation of HeLa cell nuclei and the nuclear localization of HeLa cell alkaline phosphatase. *J. Cell Biol.*, 33: 200-3, 1967.
- GRIMSTONE, A. V.; MULLINGER, A. M. & RAMSAY, J. A. Further studies on the rectal complex of the meal worm *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 253B: 343-82, 1968.
- GRINYER, I. & MUSGRAVE, A. J. Microorganisms and mitochondria in the Malpighian tubules of *Sitophilus* (Coleoptera). *Can. J. Microbiol.*, 10: 805-6, 1964.
- HALTON, D. W. Peroxidase activity in the trematode *Haplometra cylindracea*. *Exp. Parasit.*, 24: 265-9, 1969.
- HAND, A. R. Ultrastructural localization of catalase and L- α -hydroxy acid oxidase in microperoxisomes of *Hydra*. *J. Histochem. Cytochem.*, 24(8): 915-25, 1976.
- HAUSMANN, K. & WALZ, B. Ultrastructural characterization and energy dispersive X-ray microanalysis of crystals and lithosomes of the ciliate *Euplotes vannus*. *Protoplasma*,

99(1/2): 67-77, 1979.

HAUSSLER, M. R.; NAGODE, L. A. & RASMUSSEN, H. Induction of intestinal brush border alkaline phosphatases by vitamin D and identity with Ca-ATPase. *Nature*, 228: 1199-201, 1970.

HERZOG, V. & FAHIMI, H. D. The effect of glutaraldehyde on catalase. Biochemical and cytochemical studies with beef liver catalase and rat liver peroxisomes. *J. Cell Biol.*, 60: 303-11, 1974.

HESS, R.; SCARPELLI, D. G. & PEARSE, G. E. Cytochemical localization of Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Nature*, 181: 1531-2, 1958a.

HESS, R.; SCARPELLI, D. G. & PEARSE, G. E. The cytochemical localization of oxidase enzymes. II. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 753, 1958b.

HEVERT, F.; WOLBURG, H. & WESSING, A. The concretions of the larval primary urine of *Drosophila hydei*. II. The inorganic constituents [Dipt. Drosophilidae]. *Cytobiologie*, 8(2): 312-19, 1974.

HIRAI, K. I. Distribution of peroxidase activity in *Tetrahymena pyriformis* mitochondria. *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 189-202, 1974.

- HOFFMAN, L. H. & DI PIETRO, D. L. Subcellular localization of human placental acid phosphatases. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 114: 1087-96, 1972.
- HOGEBOM, G. H.; ALBERT, C. & HOTCHKISS, R. D. The distribution of cytochrome oxidase and succinoxidase in the cytoplasm of the mammalian liver cell. *J. Bioch. Chem.*, 165: 615-29, 1946.
- HOLT, S. J. *Exp. Cell Res., Suppl.*; 7: 1, 1959. Citado por Pearse, A. G. E. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. Vol. I, 3 ed., New York, 1968.
- HUANG, K.; ROBINSON, J. C. & CHOU, J. Y. Phosphoprotein phosphatase activity associated with human placental alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70: 186, 1976.
- HUGON, J.; BORGERS, M. & LONI, M. C. Alkaline phosphatase activity in HeLa cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 15: 417-8, 1967.
- HUMBERT, W. Localization, structure and genesis of the mineral concretions in the midgut of Tomoceridae. (Insecta, Collemb). *Z. Morphol. Tiere*, 78(1-2): 93-109, 1974.
- ISTIN, M. & GIRARDI, J. P. Carbonic anhydrase and mobilization of calcium reserves in the mantle of Lamellibranchs. *Calc. Tiss. Res.*, 5: 247-60, 1970.

- JARIAL, M. S. & SCUDDER, G. G. E. The morphology and ultrastructure of the Malpighian tubules and hindgut in *Cenocorixa bifida* (Hung.) (Hemiptera, Corixidae) Z. Morph. Tiere, 68: 260-99, 1970.
- JEANTET, A. Y. Recherches histophysiologiques sur le développement post-embryonnaire et le cycle annuel de *Formica* (Hyménoptère). Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 116: 405-24, 1971.
- JEANTET, A. Y.; MARTOJA, R. & TRUCHET, M. The role of the sphaerocrystals of the gut epithelium in the resistance of an insect to mineral poisonig: experimental results obtained by means of eletronic micropobe and secondary ionic emission microanalyser. C. R. Acad. Sci. Paris, D., 278(10): 1441-4, 1974.
- JEANTET, A. Y.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C. & RUSTE, J. Quantitative electron probe microanalysis on Insects exposed to mercury. II - Involvement of the lysosomal system in detoxification processes. Biologie Cellulaire, 39: 325-34, 1980.
- JOHNSON, I. T. & RIEGEL, J. A. Ultrastructural studies on the Malpighian tubule of the pill millipede, *Glomeris marginata* (Villers). General morphology and localisation of phosphatases enzymes. Cell Tiss Res., 180: 357-66, 1977.
- KARSENTI, G. & GOUNON, P. Lampbrush chromosomes: Are they ATP dependent contractile structures? Biol. Cellulaire,

34: 91-98, 1979.

KESSEL, R. G. The permeability of dragonfly Malpighian tubule cells to protein using horseradish peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.*, 47: 299-303, 1970.

KICENIUK, J. & PHILLIPS, J. E. Magnesium regulation in mosquito larvae (*Aedes campestris*) living in waters of high MgSO_4 content. *J. exp. Biol.*, 61: 749-60, 1974.

LACOMBE, D. & RANGEL, E. F. Anatomy, histology and stains in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Klug, 1834). *Rev. Bras. Biol.*, 39(3): 677-86, 1979.

LANDA, V.; SOLDÁN, T. & PETERS, W. L. Comparative anatomy of larvae of the family Leptophlebridae (Ephemeroptera) based on ventral nerve cord, alimentary canal, Malpighian tubules, gonads and tracheal system. *Acta entom. bohém.*, 77: 169-95, 1980.

LAVALLARD, R. Ultrastructure des cellules prismatiques de l'épithélium intestinal chez *Peripatus acacioi* Marcus et Marcus. *C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris, SD*, 264: 929-32, 1967.

LEHNINGER, A. L. *Bioquímica*, Ed. Edgard Blucher, São Paulo, 1976, vol. 2, p. 370.

- LHONORÉ, J. Combined application of morphological and cytochemical methods and X-ray spectrographic analysis to the study of the excretory apparatus of *Gryllotalpa gryllotalpa* Latr (Orth., Gryllotalpidae). *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 114(3): 439-74, 1973.
- LIN, C.-W.; SASAKI, M.; ORCUTT, M. L.; MIYAYAMA, H. & SINGER, R. M. Plasma membrane localization of alkaline phosphatase in HeLa cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 24(5): 659-67, 1976.
- LINDE, A. & MAGNUSSON, B. C. Inhibition studies of alkaline phosphatases in hard tissue-forming cells. *J. Histochem. Cytochem.* 23(5): 342-7, 1975.
- LISON, L. *Histochimie et Cytochimie Animales*. Principes et méthodes. Paris, Gauthier-Villars, 1960, vol. 2.
- LOVE, R.; STUDZINSKI, G. P. & WALSH, R. J. Nuclear, nucleolar and cytoplasmic acid phosphatases in cultured mammalian cells. *Expl. Cell Res.*, 58: 62-72, 1969.
- LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 409-15, 1961.
- LUMSDEN, R. D.; OAKS, J. A. & MILLS, R. R. Mitochondrial oxidation of diaminobenzidine and its relationship to the cytochemical localization of tapeworm peroxidase. *J. Parasit.*, 55: 1119-33, 1969.

- MACGOWN, M. W. & SIKOROWSKI, P. P. Digestive anatomy of the adult boll weevil, *Anthonomus grandis grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 74: 117-26, 1981.
- MADDRELL, S. H. P. & GARDINER, B. O. C. The passive permeability of insect Malpighian tubules to organic solutes. *J. exp. Biol.*, 60(3): 641-52, 1974.
- MALL, S. B. & CHATTORAJ, A. N. Digestive enzymes of the beetle *Galerucella birmanica*. *Rev. Biol. (LISB)*, 11(1-4): 107-112, 1977 - 79.
- MALOUF, N. N. & MEISSNER, G. Cytochemical localization of a "basic" ATPase to canine myocardial surface membrane. *J. Histochem. Cytochem.*, 28(12): 1286-94, 1980.
- MARCHESI, V. T. & PALADE, G. E. The localization of Mg-Na-K activated adenosine triphosphatase activity on red cell ghost membranes. *J. Cell Biol.*, 35: 385-404, 1967.
- MARINOS, E. & BILLETT, F. S. Mitochondrial number, cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase activity in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Embryol. exp. Morph.*, 62: 395-409, 1981.
- MARTOJA, R. Histophysiological data on the mineral and purine concretions of *Thysanura* (Insecta, Apterygota). *Zool. Exp. Gén.*, 113(4): 565-78, 1972.

- MARTOJA, R. Problems arising from adapting classical histological methods to Apterygota: application to two aspects of the physiology of *Thysanura Pedobiologia*, 14 (2-5): 163-4, 1974.
- MARTOJA, R.; LHONORE, D. & BALLAN-DUFRANÇAIS, C. Mineral and purinic bioaccumulation in Neuroptera *Euroleon nostras*, *Myrmeleon hyalinus*, *Acanthaclisis beaticus*, *Sisyra fuscata*, *Chrysopa* sp. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 118(4): 441-55, 1977.
- MARSHALL, A. T. Golgi body function and mucomplex secretion in the Malpighian tubules of *Cercopoid larvae* (Insecta: Homoptera). *J. Ultrastructure Research*, 47: 95-105, 1974.
- MATHEW, G. & RAI, K. S. Fine structure of the Malpighian tubule in *Aedes aegypti*. *Annals of the Entomological Society of America*, 69(4): 659-61, 1976.
- MAZZI, V. & BACCETTI, B. *Redia*, 42: 277-82 e 383-91, 1957.
Citado por Craig, R., 1960.
- MAZZI, V. & BACCETTI, B. Recherche istochimiche e al microscopio elettronico sui tubi Malpighiani di *Dacus oleae* Gmel. I. La larva. *Z. Zellforsch*, 59: 47-70, 1963.
- MCDONALD, D. F.; SCHOFIELD, B. H.; GEFFERT, M. A. & COLEMAN, R. A. A comparative study of new substrates for the histochemical demonstration of acid phosphomonoesterase activity in tissues which secrete acid phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, 28(4): 316-22, 1980.

- MELLO, M. L. S. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv., Hemiptera). *Cytologia, Int. J. Cytology*, 36(1): 42-9, 1971.
- MELLO, M. L. S. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 8(2): 101-7, 1975.
- MELLO, M. L. S. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero e eucromatinas. Campinas, 1976, p. 205. Dissertação de Livre Docência, UNICAMP.
- MELLO, M. L. S. Toluidine blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. *Histochemistry*, 69: 181-7, 1980.
- MELLO, M. L. S. & BOZZO, L. Histochemistry, refractometry, and fine structure of excretory globules in larval Malpighian tubules of *Melipona quadrifasciata* (Hym. Apoidea). *Protoplasma*, 68: 241-51, 1969.
- MELLO, M. L. S. & DOLDER, H. Fine structure of the Malpighian tubes in the blood-sucking insect, *Triatoma infestans* Klug. *Protoplasma*, 93: 275-88, 1977.
- MELLO, M. L. S. & DOLDER, H. Localization of the nucleolus in the epithelial cells of the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug. In: Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica, VI. São Paulo, 1978. São Paulo, Escola de Comunicação e Artes, USP, 1978, p. 62-3.
- MELLO, M. L. S. & DOLDER, H. Aspectos ultra-estruturais de tubos de Malpighi de ninfas jovens de *Triatoma infestans* Klug. *Ciênc. Cult.*, 32(7): 903-7, 1980.

- MELLO, M. L. S. & VIANA, A. M. Some cytochemical characteristics of the Malpighian tube cells in the blood-sucking bug, *Triatoma infestans* Klug. *Celular e Molecular Biology*, 22: 367-72, 1977.
- MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. Cytofluorimetric analysis of naturally fluorescent substances of the Malpighian tubes of *Triatoma infestans*. In: International Histochemistry Congress, 6, Brighton, 1980. Oxford, The Royal Microscopical Society, 1980, p. 256.
- MELLO, M. L. S.; DOLDER, H. & VIDAL, B. C. Alterações ultra-estruturais em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetidos a jejum. In: Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia eletrônica, VII, Rio de Janeiro, 1981. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1981, p. 26.
- MESSIER, P. E. & SANDBORN, E. B. Mitochondries dans les microvillosités des tubes de Malpighi chez le grillon. *Rev. Can. Biol.*, 25: 217-19, 1966.
- MEYER, G. F. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Malpighischen Gefäßen verschiedener Insekten. *Z. Zellforsch.* 47: 18-28, 1957.
- MIYAYAMA, H.; SOLOMON, R.; SASAKI, M.; LIN, C-W. & FISHMAN, W. H. Demonstration of lysosomal and extralysosomal sites for acid phosphatase in mouse kidney tubule cells with p-nitrophenyl phosphate lead-salt technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 23(6): 439-51, 1975.

- MOOG, F. Physiological significance of the phosphomonoesterases. *Biol. Rev.*, 21: 41-59, 1946.
- MORAN, D. T. & STACHELILIN, A. The structure of an intranuclear crystal as determined by sectioning freeze-etching, and optical diffraction. *J. Insect Physiol.*, 17: 2245-52, 1971.
- MOSES, H. L. & ROSENTHAL, A. S. Pitfalls in the use of lead ion for histochemical localization of nucleoside phosphatases. *J. Histochem. Cytochem.*, 16(8): 530-39, 1968.
- NACHLAS, M. M.; TSOU, K-C; SOUZA, E.; CHENG, C-S & SELIGMAN, A. M. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 420-36, 1957.
- NAGAHASHI, G.; LEONARD, R. T.; THOMSON, W. W. Purification of plasma membranes from roots of barley. *Plant Physiol.*, 61: 993-9, 1978.
- NAGODE, L. A.; FRAJOLA, W. J. & LOEB, W. J. *Amer. J. Vet. Res.*, 27: 1385, 1968. Cited by Haussler *et alii*, 1970.
- NARULA, J. S. Excretory system of the Indian house cricket *Gryllodes sigillatus* (Walker) (Orthoptera: Gryllidae). *Bull. Entomol. Soc. India*, 11(2): 98-101, 1970.
- NIJHOUT, H. F. Excretory role of the midgut in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *J. exp. Biol.*, 62: 221-30, 1975.
- NOIROT, C. & NOIROT-TIMOTHÉE, C. Fine structure of the rectum in cockroaches (Dictyoptera): general organization and intercellular junctions. *Tissue & Cell*, 8: 345-68, 1976.

- NOVIKOFF, A. B. Lysosomes in nerve cells. In: *The Neuron*, New York, Elsevier Publishing Co, 1967. p. 319. Citado por Essner, E., 1973a.
- NOVIKOFF, A. B. & GOLDFISCHER, S. Visualization of microbodies for light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 16: 507, 1968.
- NOVIKOFF, A. B. & GOLDFISCHER, S. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.*, 17: 675-80, 1969.
- NOVIKOFF, A. B.; NOVIKOFF, P. M.; QUINTANA, N. & DAVIS, C. Diffusion artifacts in 3,3'-diaminobenzidine cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 20: 745-9, 1972.
- OSCHMAN, J. L. & BERRIDGE, M. J. Structural and functional aspects of salivary fluid secretion in *Calliphora*. *Tissue & Cell*, 2: 281-310, 1970.
- PALADE, G. E. The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.*, 114: 427-51, 1952.
- PAUTRAT, G. & BENKÖEL, L. Adenosine triphosphatase activity during fusion of culture sheep choroid plexus cells induced by either Visna virus or polythelene glycol. *Cellular & Molecular Biology*, 23: 349-54.
- PEACOCK, A. J. A comparison of two methods for the preparation of Mg^{2+} -dependent ($Na^{+} + K^{+}$) - stimulated ATPase from the

- locust rectum. *Insect Biochem.*, 9: 481-4, 1979.
- PEACOCK, A. J. & ANSTEE, J. H. Malpighian tubules of *Jamaica flava* (Caudell). I. Structure of the primary cells. *Micron*, 8: 19-27, 1977.
- PEACOCK, A. J.; BOWLER, K. & ANSTEE, J. H. Demonstration of a $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{2+}$ dependent ATPase in a preparation from hindgut and Malpighian tubules of two species of Insect. *Experientia*, 28: 901-2, 1972.
- PEACOCK, A. J.; BOWLER, K. & ANSTEE, J. H. Properties of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - dependent ATPase from the Malpighian tubules and hindgut of *Homorocoryphus nitidulus vicinus*. *Insect Biochem.*, 6: 281-8, 1976.
- PEARSE, A. G. E. & SCARPELLI, D. G. Cytochemical localization of succinic dehydrogenase in mitochondria from *Periplaneta americana*. *Nature*, 181: 702-3, 1958.
- PERRET, M. L. & VIANA, A. L. Kinetic characterization of Mg^{2+} - dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum. *An. Acad. brasil. Ciênc.*, 53(1): 173-181, 1981.
- PETRALIA, R. S. & VINSON, S. B. Internal anatomy of the fourth instar larva of the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 9: 89-106, 1980.
- PHILLIPS, J. E. & MADDRELL, S. H. P. Active transport of

- magnesium by the Malpighian tubules of the larvae of the mosquito, *Aedes campestris*. *J. exp. Biol.*, 61: 761-71, 1974.
- PILEGGI, V. J.; DE LUCA, H. F. & STEENBOCK, H. The role of vitamin D and intestinal phytase in the prevention of rickets in rats on cereal diets. *Arch. Biochem. Biophys.*, 58: 194-204, 1955.
- PITTS, R. F. *Handbook of Physiology. Renal Physiology*. Ed. J. Orloff & Berliner, R. W., American Physiological Society, Washington, 1973. p. 455-96. Citado por Goeckermann, J. A. & Vigil, E. L., 1975.
- PITTS, R. F. *Physiology of the kidney and body fluids*. Year Book Medical Publishers. Inc. Chicago, 1974.
- PRIESTER, W. Lysosomes in the midgut of *Calliphora erythrocephala* Meigen. *Z. Zellforsch.*, 129: 430-46, 1972.
- RACKER, E. *A new look at mechanisms in bioenergetics*. Acad. Press., New York, 1976.
- RAMSAY, J. A. The excretion of sodium and potassium by the Malpighian tubules of *Rhodnius*. *J. exp. Biol.*, 29: 110-126, 1952.
- RAMSAY, J. A. Active transport of potassium by the Malpighian tubules of insects. *J. exp. Biol.*, 30: 358-69, 1953.

- RAMSAY, J. A. Active transport of water by the Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae). *J. exp. Biol.*, 31: 104-13, 1954.
- RAMSAY, J. A. The excretory system of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae). *J. exp. Biol.*, 32: 183-99, 1955a.
- RAMSAY, J. A. The excretion of sodium, potassium and water by the Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae). *J. exp. Biol.*, 32: 200-16, 1955b.
- RAMSAY, J. A. Excretion by the Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae): calcium, magnesium, chloride, phosphate and hydrogen ions. *J. exp. Biol.*, 33: 697-708, 1956.
- RAMSAY, J. A. Excretion by the Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae): amino acids, sugars and urea. *J. exp. Biol.*, 35: 871-91, 1958.
- RAMSAY, J. A. The comparative physiology of renal function in invertebrates. In: *The cell and the organism*. J. A. Ramsay & V. B. Wigglesworth, eds. Cambridge University Press, pp. 158-74, 1961. Citado por Berridge, M. J. & Oschman, J. L., 1969.

- REALE, G. & LUCIANO, L. A probable source of errors in electronhistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 713-5, 1964.
- REMY, L.; MICHEL-BECHET, M. & ATHORÏEL-HAON, A. M. Etude critique de localisations phosphatasiques acides extra-lysosomiales de cellules folliculaires thyroïdiennes par la réaction de Gömöri. *Histochemistry*, 13: 131-45, 1975.
- RIEGEL, J. A. Micropuncture studies of formed-body secretion by the excretory organs of crayfish, frog and stick insect. *J. exp. Biol.*, 44: 379-85, 1966a.
- RIEGEL, J. A. Analysis of formed bodies in urine removed from crayfish antennal gland by micropuncture. *J. exp. Biol.*, 44: 387-95, 1966b.
- RIEGEL, J. A. A new model of transepithelial fluid movement with detailed application to fluid movement in the crayfish antennal gland. *Comp. Biochem. Physiol.*, 36: 403-10, 1970.
- RIEGEL, J. A. Excretion - Arthropoda. In: *Chemical Zoology* (eds. M. Florkin and B. T. Scheer). vol. 6, p. 249-77. Academic Press, New York, 1971. Citado por Sohal, R. S. *et alii*, 1976.
- ROTHMAN, A. H. Peroxidase activity in platyhelminth cuticular

- mitochondria. *Exp. Parasit.*, 23: 51-5, 1968.
- RUBIN, A. H. & CHU, B. Reversible regulation by magnesium of chick embryo fibroblast proliferation. *J. Cell Physiol.*, 94: 13-19, 1978.
- RYERSE, J. S. Developmental changes in Malpighian tubule cell structure. *Tissue & Cell*, 11(3): 533-51, 1979.
- SABATINI, D. D.; BENSCH, K. & BARNETT, R. J. Cytochemistry and electron microscopy: The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.*, 17: 19, 1963.
- SANCHEZ-PINA, A.; RODRÍGUEZ-GARCIA, M. I.; RISUEÑO, M. C. & FERNÁNDEZ GÓMEZ, M. E. Localization of the acid phosphatase activity in plant cell nucleoli. *Revista de Microscopia Eletrônica*, 5(1): 282-3, 1978.
- SANDBORN, E. B. & MAKITA, T. The effect of dimethyl sulfoxide on aldehyde fixation and the localization of alkaline phosphatase activity in tissues. *J. Cell Biol.*, 43: 121A-2A, 1969.
- SASAKI, M. & FISHMAN, W. H. Dual ultrastructural localization of acid phosphatase in mouse kidney tubule cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 21: 653-60, 1973.
- SATO, A. *J. Labor. Clin. Med.*, 13: 1058, 1928. Citado por Lison, L. 1960.

- SCARPELLI, D. G.; HESS, R. & PEARSE, G. E. The cytochemical localization of oxidative enzymes. I. Diphosphoryridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 747, 1958.
- SEGURI, S.; TONGU, Y.; YTANO, K.; SAKAMOTA, D. & INATOMI, S. The ultrastructure of mosquitoes. II. Malpighian tubule of *Culex pipens pallens*. *Jap. J. Sanit. Zool.*, 20: 1-6; 1969.
- SELIGMAN, A. M.; SHANNON, W. A.; HOSHINO, Y. & PLAPINGER, R. E. Some important principles in 3,3'-diaminobenzidine (DAB) - ultrastructural cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 21: 756-8, 1973.
- SERRANO, J. A.; SHANNON, W. A.; STERNBERGER, N. J.; WASSERKURUG; A. A. S. & SELIGMAN, A. M. The cytochemical demonstration of prostatic acid phosphatase using a new substrate, phosphorylcholine. *J. Histochem. Cytochem.*, 24: (10): 1046-56, 1976.
- SHNITKA, T. K. Comparative ultrastructure of hepatic microbodies in some mammals and birds in relation to species differences in uricase activity. *J. Ultrastr. Res.*, 16: 598-625, 1966.
- SIEBERT, G. Nuclear enzymes, especially those of energy metabolism. In: *The cell nucleus*. Edited by J. S. Mitchell, Butterworth, 1960. p. 176. Citado por Vorbrodt, A. & Maul, G. G., 1980.

- SIEBERT, G. Enzymes of cancer nuclei. *Exp. Cell Res.*
Suppl., 9: 389, 1963. Citado por Vorbrodt, A. & Maul, G.
G., 1980.
- SIEBERT, G. Nucleolar enzymes of isolated rat liver nucleoli.
Natl. Cancer Inst. Monograph, 23: 285-93, 1966.
- SJÖSTRAND, F. S. & RHODIN, J. *Exp. Cell Res.*, 4: 426, 1953.
Citado por Pearse, A. G. E. & Scarpelli, D. G., 1958.
- SKOU, J. C. Preparation from mammalian brain and kidney of
the enzyme system involved in active transport of Na^+ and
 K^+ . *Biochem. Biophys. Acta*, 58: 314, 1962.
- SLATER, E. C. Oxidative phosphorylation. *J. Exp. Biol. &*
Med. Sci., 36: 3-11, 1958. Citado por Wegmann, R. &
Bankowski, Z., 1960.
- SLEPYAN, E. J. & GABARAYEVA, N. I. Morphological and
histological features of the gut, Malpighian tubes and
salivary glands of *Pontania proxima* larvae (Hymenoptera,
Tenthredinidae) in connection with their mode of life.
Entomological Review, 57(3): 333-8, 1979.
- SMITH, D. S. & LITTAU, V. C. Cellular specialization in the
excretory epithelia of an insect *Macrosteles fascifrons*
Stål (Homoptera). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 8: 103-
33, 1960.
- SOHAL, R. S. Fine structure of the Malpighian tubules in the

- housefly. *Tissue and Cell*, 6: 719-28, 1974.
- SOHAL, R. S. & LAMB, R. E. Storage-excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.*, 25: 119-24, 1979.
- SOHAL, R. S.; PETERS, P. D. & HALL, T. A. Fine structure and X-ray microanalysis of mineralized concretions in the Malpighian tubules of the housefly, *Musca domestica*. *Tissue & Cell*, 8(3): 447-58, 1976.
- SOLDÁN, T. Internal anatomy of *Dolania americana* (Ephemeroptera: Behningiidae). *Entomological Society of America*, 72: 636-41, 1979.
- SORIANO, R. Z. & LOVE, R. Electron microscopic demonstration of acid phosphatase in nucleoli and nucleoplasm. *Exp. Cell Res.*, 65: 467-70, 1971.
- SPENCER, T. & MACRAE, D. L. Some properties of the alkaline phosphate of HeLa cells. *Enzymologia*, 42: 329, 1972.
- STELLY, N.; BALMEFRÉZOL, M. & ADOUTLE, A. Diaminobenzidine reactivity of mitochondria and peroxisomes in *Tetrahymena* and in wild-type and cytochrome oxidase-deficient *Paramecium*. *J. Histochem. Cytochem.*, 23(9): 686-96, 1975.
- TAKAHASHI, S. Y.; SUSUKI, G. & OHNISHI, G. Origin of oxalic acid in Ca oxalate crystals in the Malpighian tubes of the tent caterpillar, *Malacosoma neustria testacea*. *J.*

Insect Physiol., 15: 403-7, 1969.

TANDLER, C. J. & SOLARI, A. J. Nucleolar orthophosphate ions. Electron microscope and diffraction studies. *J. Cell. Biol.*, 41: 91-108, 1969.

TAPER, H. S. Evaluation of the validity of histochemical lead nitrate technique for alkaline and acid deoxyribonuclease. *J. Histochem. Cytochem.*, 27(11): 1483-90, 1979.

TAYLOR, H. H. Water and solute transport by the Malpighian tubules of the stick insect, *Carausius morosus*. The normal ultrastructure of the type 1 Cells. *Z. Zellforsch.*, 118: 333-68, 1971a.

TAYLOR, H. H. The fine structure of the type 2 cells in the Malpighian tubules of the stick insect, *Carausius morosus*. *Z. Zellforsch.*, 122: 411-24, 1971b.

TAYLOR, H. H. Structural and functional changes in the Malpighian tubules of *Carausius morosus* during dehydration and starvation. *Z. Zellforsch.*, 141: 479-92, 1973.

THREADGOLD, L. T. & READ, C. P. Electron microscopy of *Fasciola hepatica*. V. Peroxidase localization. *Exp. Parasit.*, 23: 221-7, 1968.

TICE, L. W. & ENGEL, A. G. Cytochemistry of phosphatases of the sarcoplasmic reticulum. II. In situ localization of

- the MG - dependent enzyme. *J. Cell Biol.*, 31: 489-9, 1966.
- TISHER, C. C.; BULGER, R. E. & VALTIN, H. Morphology of renal medulla in water diuresis and vasopressin - induced antidiuresis. *Am. J. Physiol.*, 220: 87-94, 1971.
- TOLBERT, N. E. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.*, 50: 133-57, 1981.
- TRONCHIN, G.; POULAIN, D. & BIGUET, J. Localisation ultrastructurale de l'activité phosphatasique acide chez *Candida albicans*. *Biol. Cellulaire*, 38: 147-52, 1980.
- TSUBO, I. & BRANDT, P. W. An electron microscopic study of the Malpighian tubules of the grasshopper, *Dissostertia carolina*. *J. Ultrastr. Res.*, 6: 28-35, 1962.
- TURBECK, B. O. A study of the concentrically laminated concretions, "spherites" in the regenerative cells of the midgut of Lepidopterous larvae. *Tissue & Cell*, 6(4): 627-40, 1974.
- VAN STEVENINCK, R. F. M. The verification of cytochemical tests for ATPase activity in plant cells using X-ray microanalysis. *Protoplasma*, 99: 211-20, 1979.
- VICENT; W. S. The isolation and chemical properties of the nucleoli of starfish oocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 38: 139-45, 1952.

- VORBRÖDT, A. & BOUN, T. W. Ultrastructural cytochemical studies of plasma membrane phosphatase activities during the HeLa S₃ cell cycle. *J. Histochem. Cytochem.*, 27(12): 1596-603, 1979.
- VORBRÖDT, A. & MAUL, G. G. Cytochemical studies on the relation of nucleoside triphosphatase activity to ribonucleoproteins in isolated rat liver nuclei. *J. Histochem. Cytochem.*, 28(1): 27-35, 1980.
- WACHSTEIN, M. & MEISEL, G. Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. *American J. Clin. Path.*, 27: 13-23, 1957.
- WALL, B. J. & OSCHMAN, J. L. Structure and function of rectal pads in *Blatella* and *Blaberus* with respect to the mechanism of water uptake. *J. Morph.*, 140: 105-18, 1973.
- WALL, B. J.; OSCHMAN, J. L. & SCHMIDT, B. A. Morphology and function of Malpighian tubules and associated structures in the cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Morph.*, 146: 265-306, 1975.
- WAKU, Y. The ultrastructure of Malpighian tubule cells in *Bombyx mori* L., with special regard to metamorphosis. *Zool. Mag. Zool. Soc. Jap.*, 83(2): 152-62, 1974.
- WAKU, Y. & SUMIMOTO, K. Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium deposits in the cytoplasm. II. Electron

- microscopy. *Tissue & Cell*, 6: 127-36, 1974.
- WASHITANI, I. & SATO, S. On the reliability of the lead salt precipitation method of acid phosphatase localization in plant cells. *Protoplasma*, 89: 157-70, 1976,
- WEBER, G. Ultrastructural demonstration of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase. Activity in sporozoites of *Babesia ovis* and *Theileria annulata* (Apicomplexa: Piroplasmaea) in salivary glands of tick vectors (*Rhipicephalus Bursa*, *Hyalomma Anatolicum* excavation). *J. Parasitol.*, 66(6): 904-13, 1980.
- WEGMANN, R. *Méthods de detection en histoenzymologie*. Institut d'Histochimie Médicale, Paris. vol II., 1968.
- WEGMANN, R. & BANKOWSKI, Z. Differenciación histoquímica de cuatro grupos d'adénosina triphosfatases según Slater. *Ann. Histochem.*, 5: 121-41, 1960.
- WEGMANN, R. & TORDET-CARIDROIT, C. Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase by specific inhibition and activation. *J. Histochem. Cytochem.*, 8: 348-9, 1960.
- WESSING, A. Die funktion der Malpighischen Gefäße. In: *Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle*. II. *Skretion und Excretion*. Springer Verlag Berlin, p. 228-68, 1965. Citado por Wall, B. J. *et alii*, 1975.
- WESSING, A. & EICHELBERG, D. Elektroneptische untersuchungen

- zen lipid splicherung in den Nierentubuli von *Drosophila melanogaster*. *Z. Zellforsch*, 94: 129-46, 1969a. Citado por Green, L. F. B., 1979c.
- WESSING, A. & EICHELBERG, D. Elektronenoptische untersuchungen an den Nierentubuli (Malpighische Gefäße) von *Drosophila melanogaster*. I. Regionale gliederung der tubuli. *Z. Zellforsch*, 101: 285-322, 1969b. Citado por Green L. F.B., 1979c.
- WESSING, A. & EICHELBERG, D. Ultrastructural aspects of the transport and accumulation of substance in the Malpighian tubules of *Drosophila*. In: *Excretion. Fortschritte der Zoology* (ed. A. Wessing), p. 148-72. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1975. Citado por Sohal, R. S. *et alii*, 1976.
- WIGGLESWORTH, V. B. The physiology of excretion in the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). I. Composition of the urine. *J. exp. Biol.*, 8: 411-27, 1931a.
- WIGGLESWORTH, V. B. The physiology of excretion in the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). II. Anatomy and histology of the excretory system. *J. exp. Biol.*, 8: 428-442, 1931b.
- WIGGLESWORTH, V. B. The physiology of excretion in the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). III. Mechanism of uric acid excretion. *J. exp. Biol.*, 8:

443:51, 1931c.

WIGGLESWORTH, V. B. *The principles of insect physiology*,
6 ed. London, Methuen, 1965.

WIGGLESWORTH, V. B. & SALPETER, M. M. Histology of the
Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera).
J. Insect Physiol., 8: 299-307, 1962.

WOLBURG, H.; HEVERT, F.; WESSING, A.; PORSTENDOERFER, J. The
concretions of the larval primary urine of *Drosophila*
hydei. I. Structure [Dipt., Drosophilidae]. *Cytobiologie*,
8(1): 25-38, 1973.

YADAV, B. B. & KARYAKARTE, P. P. Histochemical observations on
phosphatase activity in the hepatopancreatic cells of
Lymnae auricularia infected with *Gymnocephalus cercaria*
Cercaria Pigmentosa, Porter, 1938. *Rivista di Parassitologia*,
vol. XLI (2): 249-52, 1980.