

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo candidato Maurício
José Lopes Vaz do Amaral e aprovada
pela Comissão julgadora.

lefeallo
22/03/88

MAURICIO JOSÉ LOPES VAZ DO AMARAL

**CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA DA CROMATINA EM
ANIMAIS SUBMETIDOS AO JEJUM**

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

Orientadora: Maria Luíza Silveira Mello

CAMPINAS, 1988

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

Feliz o homem que compadece e empresta,
que regula suas ações pela justiça.

Nada jamais o há de abalar, e
eterna será sua memória

Porque ele confia no MAIOR
e é, pois, inabalável seu coração,
livre de medo, podendo sempre encarar
aos outros com altivez.

Por isso não é visto sem inveja,
por aqueles que range os dentes e definha.
Mas, assim mesmo, alcança sua glória.

Sal., 111.112.

Aos meus pais e irmãos,
pelo amor e união,
ofereço

A Paula Fiori, tia-avó,
pelo exemplo de luta,
dedico

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a participação de pessoas e entidades as quais agradeço:

Aos meus pais pelo amor e sacrifício dispensado aos filhos.

A Profa.Dra. Maria Luiza Silveira Mello, que em muito tem contribuído para a minha formação científica, por sua orientação segura e objetiva, sua dedicação ao trabalho e devoção à pesquisa.

Ao Prof.Dr. Benedicto de Campos Vidal, não apenas pelas críticas e sugestões que em muito contribuiu para o engrandecimento deste trabalho, mas também por seu rigor científico, minha sincera admiração.

Aos Profs.Drs. Renato Bonatelli Junior e Quivo S. Tahin, pela leitura, críticas e sugestões dadas a este trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo convívio agradável e pelos ensinamentos.

Ao Departamento de Biologia Celular onde o presente trabalho foi realizado.

Aos amigos e colegas da Pós-graduação em Biologia Celular, pelos momentos e pela amizade.

Aos amigos Sebastião Roberto Taboga, José Roberto Bosqueiro, Rosana de Sousa Alvares-Garcia e Vera Lúcia Correia Feitosa, não apenas pela grande amizade que nos uni, mas também pelas sugestões e leituras do manuscrito deste trabalho.

Ao Hernandes F. de Carvalho, pelo auxílio nos microcomputadores e pela amizade.

Aos funcionários do Depto. de Biologia Celular pelo convívio diário e amizade.

A SUCEN de Mogi-Guaçu (SP) e Instituto de Pesquisas Reneé Rachou de Belo Horizonte (MG), pelo fornecimento dos exemplares de triatomíneos.

Ao Biotério Central pelo fornecimento dos camundongos.

Ao Depto. de Parasitologia da UNICAMP por ter providenciado a alimentação dos triatomíneos.

A Ana Gagliardi, bibliotecária-chefe, pela correção das referências bibliográficas.

As professoras Dra. Adelina B.C. Silva e Maria Tercília V.A. Oliveira, do Depto. de Genética da UNESP de São José do Rio Preto, pela amizade dispensada e pelos primeiros passos da minha carreira profissional.

A. Reitoria da UNICAMP, pelo suporte financeiro (Bolsa de Incentivo Acadêmico).

INDICE

I- Introdução

1.1	Basofilia nuclear e concentração eletrolítica crítica (CEC): conceitos básicos	01
1.2	Heterocromatina e eucromatina	07
1.3	O jejum como fator de "stress": ação a nível celular.....	10
1.4	Objetivos do trabalho	14

II- Material

II.1	Camundongos	16
II.2	<i>Triatoma infestans</i>	17

III- Métodos

III.1	Obtenção dos preparados.....	18
III.2	Citoquímica	19

IV- Resultados

VI.1 Hepatócitos de camundongos	21
1.1 Tabelas	23
1.2 Figuras	26
VI.2 Células epiteliais de túbulos de Malpighi de <i>Triatoma infestans</i>	32
2.1 Tabelas	35
2.2 Figuras	38
V- Discussão	46
VI- Conclusões	52
VII- Resumo.....	56.
VIII- Summary	58
IX- Referências Bibliográficas.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 - BASOFILIA NUCLEAR E CONCENTRAÇÃO ELETROLÍTICA CRÍTICA (CEC) DA CROMATINA: CONCEITOS BÁSICOS

A utilização do corante azul de toluidina tem possibilitado demonstrar fenômenos de basofilia e de metacromasia em citoquímica qualitativa e quantitativa para glicosaminoglicanas ácidas, proteínas e ácidos nucleicos (LISON & MUTSAARS, 1950; LISON, 1960; VIDAL, 1987).

A basofilia é devida à ligação eletrostática de moléculas de um corante catiônico a moléculas aniônicas de um substrato. Admite-se que a basofilia nuclear quando da utilização do azul de toluidina em pH 3,0-4,0, seja devida à presença de ácidos nucleicos (LISON & MUTSAARS, 1950; LISON, 1960) e se dá pela ligação eletrostática dos grupos catiônicos do corante a grupos aniônicos do substrato, ou seja, a grupos fosfatos de DNA e RNA (LISON, 1960; VIDAL, 1979).

A basofilia é definida como metacromática, para o caso do azul de toluidina, quando ocorre um deslocamento do pico principal da curva de absorção espectral do comprimento de onda $\lambda=630$ nm para comprimentos de onda mais curtos (hipsocromismo) onde ao redor de $\lambda=550$ nm tem-se a metacromasia α , e ao redor de $\lambda=590$ nm, metacromasia β , com uma diminuição simultânea dos valores de absorbância em $\lambda=630$ nm (hipsocromismo) (BERGERON & SINGER, 1958; MIURA & OHBA, 1967; TOEPFER, 1970; VIDAL, 1987).

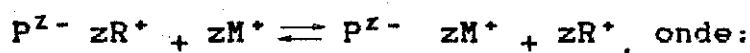
O fenômeno de metacromasia acha-se intimamente ligado ao grau de empilhamento das moléculas do corante e proximidade entre elas. Quanto mais próximas as moléculas do corante estiverem entre si, e maior for seu empilhamento, maior será a interação de seus elétrons π , conseqüentemente sendo maior o deslocamento de seu máximo de absorção para comprimentos de onda mais curtos (efeito hipsocrômico) (MELLO, 1976; VIDAL, 1987).

Se a uma solução de corante catiônico forem adicionados microcátions* (por ex. Mg^{2+}), ocorrerá competição entre estes últimos e o dipolo do corante de carga semelhante pelas cargas negativas do substrato poli-aniónico. Dependendo do tipo e força de carga dos cátions envolvidos na competição e nas afinidades iônicas do poliânion, a coloração do substrato poderá ser abolida numa certa concentração do microcátion, conseqüentemente os sítios de ligação disponíveis do substrato deverão ligar os microcátions. Esta concentração do microcátion foi chamada por SCOTT (1960, 1973) de concentração ele-

trolítica crítica (CEC), sendo expressa em termos de molaridade do sal utilizado.

O princípio desta reação e sua aplicação, desenvolvidos por SCOTT (1960) se destinaram ao estudo de glicosaminoglicanas ácidas (GAGA), sendo neste caso utilizado principalmente o azul de alcian como corante catiônico. Vários poliânions presentes na matriz extracelular puderam assim serem estudados e caracterizados bioquímica e citoquimicamente através da determinação da CEC nesta matriz, tanto em condições normais (SCOTT, 1960, 1961, 1962, 1966, 1967, 1968, 1970, 1972, 1973; SCOTT *et alii*, 1964; SCOTT & DORLING, 1965; SCOTT & STOCKWELL, 1967; STOCKWELL & SCOTT, 1967; MODIS, 1974; VIDAL; 1979), como também na matriz do carcinoma de colo uterino (IOZZO *et alii*, 1982). Ao tratar a matriz de colo uterino com o azul de alcian, IOZZO e colaboradores (1982) observaram que em determinada concentração de $MgCl_2$ (0,4M) a coloração era inibida na matriz de colo normal, entretanto a matriz que circunda a célula tumoral exibia ainda intensa alcianofilia. Na concentração de 0,05M de $MgCl_2$, por exemplo, são coradas tanto GAGAs sulfatadas como carboxiladas, mas na concentração de 0,4M apenas GAGAs sulfatadas são coradas. Tais resultados, apoiados por análises bioquímicas, revelaram um aumento de poliânions sulfatados na matriz que circunda o carcinoma uterino, com relação à matriz de colo normal.

Segundo proposição de SCOTT (1960) a CEC está representada pela equação:



P = poliânion com cargas negativas (z^{-}).

R^{+} = cátion orgânico (corante).

M^{+} = cátion inorgânico (K^{+} , Na^{+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.).

z = grupos ionizados.

Se o número de cargas do poliânion for grande e R^{+} for mantido constante, para que a reação se inicie da esquerda para direita, é requerida uma determinada concentração de M^{+} . Sob estas condições, o corante seria deslocado do complexo corante-substrato.

A par destes conhecimentos, SCOTT (1973), determinou a CEC para grupos aniônicos $-COO^{-}$ (alginato, poliglutamato), $=PO_4^{-}$ (DNA, RNA) e $-SO_3^{-}$ (queratansulfato, dextransulfato), utilizando o azul de alcian como corante e Na^{+} e Mg^{2+} como microcátions.

VIDAL & MELLO (1987) propuseram que os princípios da CEC pudessem ser utilizados para o estudo da cromatina, mas empregando-se neste caso o corante azul de toluidina. O uso extensivo do azul de toluidina em pesquisas de natureza topográfica e anisotrópica de DNA justificou sua escolha. Neste caso, a CEC foi considerada o valor de concentração de Mg^{2+}

na qual a metacromasia aparecia completamente abolida (VIDAL & MELLO, 1987), ou seja, o material aparecia corado em verde. Esta coloração seria também proporcionada por outro mecanismo de interação de moléculas do azul de toluidina com o DNA, ou seja, intercalação de moléculas do corante no interior da molécula deste ácido nucléico (MIURA & OHBA, 1967) .

Deve-se lembrar que, se R^+ e M^+ forem mantidos constantes e a natureza dos grupos ionizados do poliânion mudar, então mudará também a afinidade relativa destes últimos pelos íons competidores (M^+ e R^+) (MÓDIS, 1974). Isto sem dúvida possibilitaria estudos da CEC em DNA diferentemente complexados às proteínas ou com parte de seus grupos fosfatos variavelmente bloqueados por outros microcátions, o que de fato pôde ser demonstrado experimentalmente (VIDAL, 1979; MELLO & VIDAL, 1987; RANDI & MELLO, 1987; VIDAL & MELLO, 1987).

A primeira evidência da possibilidade da aplicação do conceito de CEC para a cromatina com o corante azul de toluidina aparece em trabalho de VIDAL (1979), quando estudava cromossomos politênicos de glândulas salivares de *Trichostema pubescens*, e observou a abolição da metacromasia em cromossomos tratados com uma solução deste corante contendo altas concentrações de $MgCl_2$. A coloração exibida era do tipo obtida por LISON (1960) e MELLO (1976), em núcleos, quando cátions UO_2^{2+} eram adicionados à solução de azul de toluidina (núcleos verdes).

Posteriormente, em experimento *in vitro* VIDAL & MELLO (1987) demonstraram que a CEC de complexos DNA/H₁ era mais baixa do que a CEC de DNA puro, porém mais alta do que a de complexos DNA/protamina, o que estaria de acordo com a organização destes complexos nucleoproteicos e com sua variação em grupos fosfatos disponíveis à ligação, seja com o corante, seja com os microcátions. Por outro lado, em experimentos *in situ*, MELLO & VIDAL (1987) encontraram diferenças no valor de CEC entre heterocromatina e eucromatina de células de *Triatoma infestans*. Estas diferenças variam quando o mesmo material é previamente tratado com íons cúpricos (RANDI & MELLO, 1987).

1.2 - HETEROCROMATINA E EUCROMATINA

As diferenças em CEC entre heterocromatina e eucromatina de *Triatoma infestans* reforçam outros achados a nível citot químico e rádio-autográfico para os tipos de cromatina neste material.

Estes achados já permitiram salientar para tal heterocromatina: baixa atividade de transcrição (MELLO, 1971), notável resistência à hidrólise ácida (MELLO, 1979), metacromasia mesmo após tratamento com RNase (MELLO, 1980b), alto conteúdo de DNA em dupla-hélice (VIDAL & PIMENTEL, 1980) e rico em AT (MELLO, 1978a; MELLO & RECCO-PIMENTEL, 1987), afinidade por drogas intercalantes ao DNA, como a hicanтона (SIMONI & MELLO, 1986), alta afinidade pela clupeína, um tipo de protamina (MELLO, 1985) e falta de atividade ATPásica-dependente de Mg^{+} (AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO, 1986).

Estes dados em conjunto vieram a colaborar para uma melhor definição e caracterização geral de eucromatina e heterocromatina, tipos de cromatina que a várias décadas vêm sendo objeto de estudo em diversos materiais, em termos bioquímicos, biofísicos, citot químicos, ultra-estruturais e outros (ARRIGHI

et alii, 1970; LEE & YUNIS, 1970; 1971; PALLOTA *et alii*, 1970; MELLO, 1971, 1976, 1977, 1978b, 1979, 1980a, 1980b, 1983, 1985; MITTERMAYER *et alii*, 1971; YUNIS & YASMINEH, 1971; VIDAL, 1972; BURKOLDER & WEAVER, 1974; OUDET *et alii*, 1975; MELLO & RAYMUNDO, 1978, 1980; MELLO & VIDAL, 1980b; VIDAL & PIMENTEL, 1980; RECCO-PIMENTEL & MELLO, 1974; MELLO & RECCO-PIMENTEL, 1987).

Tais estudos ganharam impulso a partir de HEITZ (1928, 1934 - apud MELLO, 1978a e 1983) quando denominou heterocromatina a cromatina que em certos cromossomos permanecia condensada durante a intérfase, retendo as propriedades de se corar intensamente, típica de cromossomos metafásicos. A cromatina que se apresentava difusa, não compactada durante esta mesma fase do ciclo celular foi denominada por ele de eucromatina.

A partir daí, vários autores se empenharam em descobrir outras propriedades que diferentemente caracterizassem eucromatina e heterocromatina e que no caso de *Triatoma infestans*, acham-se bem definidas como mencionado acima.

Muito embora, em vários sistemas celulares, a heterocromatina tenha sido caracterizada, sua função está longe de ser bem compreendida. Mesmo em termos morfológicos e químicos parece não haver uma uniformidade de características, quando são considerados diversos organismos (Comings, 1972; MELLO, 1978b, 1983).

Embora se admita para a heterocromatina: (1) relativa ou total inabilidade para codificação (heterocromatina constitutiva) ou (2) inativação gênica (heterocromatina facultativa) (MELLO, 1978b), há relatos de que seus genes silentes, em condições de "stress" fisiológico, possam estar em funcionamento (DIAS et *alii*, 1969; SANDRITTER et *alii*, 1974; SIMÕES et *alii*, 1975; SIMÕES & CESTARI, 1982; MELLO, 1983, 1987).

1.3 - O JEJUM COMO FATOR DE "STRESS": AÇÃO A NÍVEL CELULAR

Formação de pufes ou afrouxamento de heterocromatina aparecem relatados para cromossomos politênicos de *Rhynchosciara americana*, em resposta ao choque térmico, bem como após infecção por vírus e microsporídeos e também por ação de antibióticos (DIAS *et alii*, 1969, SIMÕES *et alii*, 1975; SIMÕES & CESTARI, 1982). Em células tumorais há também descrição de uma descompactação parcial da heterocromatina (SANDRITTER *et alii*, 1974).

Da mesma forma, na heterocromatina de *Triatoma infestans* e de *Panstrongylus megistus* pode ocorrer descompactação parcial dos filamentos cromatínicos sob a ação de íons cúpricos (KUBRUSLY, 1984; RANDI & MELLO, 1987) e também sob a ação do jejum (MELLO & RAYMUNDO, 1980, MELLO, 1983, 1987; ANDRADE & MELLO, 1987). Alguns núcleos, no entanto, sofrem degeneração e lise em ambas situações (KUBRUSLY, 1984; ANDRADE & MELLO, 1987; MELLO, 1987).

O jejum parece se encontrar entre as várias condições de "stress" que induzem descompactação cromatínica (ao menos em *Triatoma infestans*), possivelmente por ativação do mesmo sistema gênico que responde a choques de temperatura (ATKINSON & WALDEN, 1985).

Nos insetos triatomíneos não só a descompactação da heterocromatina e degeneração de alguns núcleos aparece como

resposta ao estímulo do jejum em células somáticas. Nestas em particular, se instalam processos de fusões nucleares (WIGGLESWORTH, 1967a, 1967b, 1982; MELLO & RAYMUNDO, 1978, 1980; MELLO, 1983, 1987; ANDRADE & MELLO, 1987), sendo que o número de núcleos envolvidos é muito variado e deve representar um mecanismo de sobrevivência celular em condições metabólicas extremamente baixas (WIGGLESWORTH, 1967a; MELLO & VIDAL, 1979).

O "stress" causado pelo jejum vem sendo estudado também em muitos outros organismos, desde protozoários aos mamíferos. A nível celular tem sido demonstrado que o "stress" causa uma inibição parcial na formação final dos ribossomos, bem como uma alteração no conteúdo de mRNA nos protozoários *Tetrahymena pyriformis* e *T. thermophila* (CALZONE et alii, 1983; GALEGO, 1984).

Na planária *Polycelis nigra*, HOFF-JORGENSEN e colaboradores (1953) demonstraram que após 36 dias de jejum, havia um decréscimo no conteúdo de DNA, ocorrendo uma dispersão da cromatina nuclear e parada da mitose. O mesmo acontece quando o microplasmódio *Physarum polycephalum* é submetido a jejum, porém de 12 horas (CZUPRYM et alii, 1985).

Já se detectou que, com o jejum, se instala uma diminuição do tamanho nuclear em células dos insetos *Leucophaea maderae*, *Blaberus craniifer* (SCHARRER, 1965), *Nasonia vitripennis* (RATCLIFFE & KING, 1970) e *Atheta fungi* (CARSTENS & STORCH, 1980). No caso do micro-himenóptero *Nasonia vitripennis*, constatou-se redução de RNA no nucléolo e conden-

sação cromatínica, porém o conteúdo de DNA nuclear permaneceu inalterado (RATCLIFFE & KING, 1970). O mesmo foi comprovado nas células A e B do hepatopâncreas do crustáceo *Ligia oceanica* submetido a um jejum de 15 semanas, a organização da sua cromatina concensada variou, no entanto, conforme o tipo celular (células A, grumos; células B, rede) (CLIFFORD & WITTKUS, 1971).

WINICK e colaboradores (1978) verificaram que no rato o jejum ou a má nutrição interrompem ou diminuem a síntese de DNA, pelo fato da DNA-polimerase não ser sintetizada. Estas alterações em conteúdo total de DNA são permanentes no cérebro e nos rins, porém no fígado são reversíveis. Com relação aos achados referentes ao fígado, o mesmo se encontrou em camundongos (CONDE & SCORNICK, 1976; CONDE & FRANZE-FERNANDEZ, 1980; MITEVA & DIMOVSKA, 1987). ROSSO & WINICK (1975) levantaram também a hipótese de que em condições de má nutrição em ratos, o conteúdo de histonas possa ser igualmente afetado, sendo impedido o processo de divisão celular normal.

A nível ultra-estrutural e molecular comprovou-se que a má nutrição pode afetar a estrutura cromatínica de hepatócitos de ratos, levando a modificações em proteínas histônicas H_1 e mesmo do "core" nucleossômico, bem como a hipometilação do DNA (CASTRO *et alii*, 1986). Induz também alterações em atividade de enzimas do tipo topoisomerases e desestabilizadoras da hélice do DNA, afetando a configuração estrutural da cromatina (CASTRO *et alii*, 1986).

Da mesma forma, carpas (*Cyprinus carpio*) submetidas a jejum por um período de 8 meses, apresentaram sinais gradativos de picrose nuclear, sendo que a cromatina perinuclear dos hepatócitos tornou-se acentuadamente condensada, destacando-se do envelope nuclear, ao mesmo tempo em que o nucléolo perde sua individualidade (GAS & NOAILLIAC-DEPEYRE, 1976).

Também em timo e pulmão de rato, o conteúdo total de DNA por órgão decresce com o jejum, restabelecendo-se após alimentação (*Timic function in malnutrition*, 1974; SAHEBJAMI & MACGEE, 1985).

Da mesma forma, o conteúdo de DNA do cérebro de ratos e de coelhos recém-nascidos decresce em condições de jejum, sendo que nestas condições há simultaneamente um comprometimento no desenvolvimento do cérebro dos animais (ZEMAN, 1967; ZAMENHOF et alii, 1972; SCHAIM et alii, 1973; SRIVASTAVA & TANG, 1979; SRIVASTAVA & OMOLOKO, 1981; SRIVASTAVA, 1985).

1.4 - OBJETIVOS DO TRABALHO

O presente trabalho visa a determinação da CEC em heterocromatina e eucromatina de animais submetidos ao jejum, considerando-se ser esperado que seus valores variem, desde que ocorram alterações estruturais e/ou de composição nestes tipos cromatínicos, sob a ação de jejum.

A escolha do material para tal estudo, células de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* e de fígado de camundongo, baseou-se nos seguintes fatos:

1. as células dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* oferecem um bom modelo de sistema heterocromatina/eucromatina, pelo que se conhece do seu tipo de heterocromatina, conforme descrito no item 1.2, bem como pelas dimensões dos núcleos e de seus constituintes;

2. em condições normais de nutrição a CEC da heterocromatina de células dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* já foi determinada, mostrando diferir daquela da eucromatina (MELLO & VIDAL, 1987);

3. em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* os fenótipos nucleares definidos em termos de número de cromocentros (corpos de heterocromatina constitutiva) variam em condições normais e em condições de jejum (MELLO, 1971, 1980b, 1983, 1987; ANDRADE & MELLO, 1987);

4. nos hepatócitos de camundongos a heterocromatina constitutiva centromérica aparece bem individualizada sob a forma de cromocentros conspícuos conhecidos pela presença de um DNA rico em sequências AT (PARDUE & GALL, 1970);

5. há diversos dados sobre efeitos de jejum em hepatócitos, inclusive a nível de estrutura cromatínica, conforme descrito no item 1.3;

Sendo encontradas diferenças em CEC, os dados servirão como indicação na disponibilidade de fosfatos livres no DNA e/ou de mudanças na estrutura dos tipos cromatínicos considerados, servindo de subsídio para estudos futuros da ação de outros agentes indutores de "stress" a nível nuclear e mesmo da ação do jejum ou má nutrição em outros tipos celulares.

II- MATERIAL

II.1- Camundongos:

No presente trabalho foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem CBA, machos, com 3 meses de idade, e isentos de patógenos, que foram fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP.

Destes animais, 4 foram utilizados como controle, 12 submetidos a jejum alimentar por cerca de 52, 72, e 96 horas (4 animais para cada condição) e 4 animais foram realimentados após permanecerem 72 horas em jejum. Os animais realimentados permaneceram 24 horas na presença do alimento, após o que, foram sacrificados.

Os animais tiveram fornecimento de água "*ad libitum*", e como alimentação, ração para ratos e camundongos Labina (Purina).

Durante os períodos de jejum acima citados, os animais permaneceram isolados em gaiolas individuais.

11.2- *Triatoma infestans*:

Foram utilizados 20 exemplares de *Triatoma infestans* Klug (ninfas de quarto e quinto estadio), machos, bem alimentados, dos quais 4 foram utilizados como controle, 8 submetidos a jejum por 6 meses e 8 realimentados com sangue de galo após o jejum. Os insetos realimentados permaneceram 8 horas na presença do alimento e foram sacrificados 15 horas depois.

Durante o período de jejum, os exemplares de *Triatoma infestans* permaneceram isolados em recipientes de vidro (6 cm de altura/5 cm de diâmetro), os quais foram forrados com papel absorvente e vedados com gaze.

Estes insetos foram criados em laboratório e fornecidos pela SUCEN de Mogi-Guaçu (SP) e pelo Instituto de Pesquisas Reneé Rachou de Belo Horizonte (MG), através do Sr. Antenor Ferraz Filho e da Dra. Elizabeth Bronfen, respectivamente.

III- METODOS

III.1- Obtenção dos preparados:

Os camundongos foram sacrificados por decaptação e seus fígados dissecados e colocados em solução salina (NaCl a 0,9%). A seguir foram preparados decalques dos órgãos.

Das ninfas dos triatomíneos foram dissecados os túbulos de Malpighi, com auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss. Tão logo os órgãos eram removidos, procedia-se o seu estiramento sobre lâminas histológicas.

Os decalques e os túbulos de Malpighi estirados foram fixados em etanol-ácido acético 3:1 durante 1 minuto, banhados em álcool etílico a 70%, por 1 minuto, e então secados ao ar à temperatura ambiente.

III.2- Citoquímica:

Os preparados foram tratados durante 15 minutos com soluções a 0,025% de azul de toluidina em tampão McIlvaine a pH 4,0 contendo $MgCl_2$ (VIDAL & MELLO, 1987).

O tampão McIlvaine foi preparado segundo LISON (1960):

a- 0,1M de ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)

b- 0,2M de fosfato de sódio bibásico ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$).

Para o pH 4,0 se utilizaram (proporção): 12,3 ml de a e 7,7 ml de b.

Foram utilizadas concentrações crescentes de $MgCl_2$: 0,1M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,8M, 1,0M para os túbulos de Malpighi e 0,02M, 0,04M, 0,06M, 0,08M, 0,1M, 0,12M, 0,14M, 0,16M, 0,18M, 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,8M, e 1,0M para os decalques de fígado.

A solução controle não foi adicionado $MgCl_2$.

Dispensou-se o uso de RNase previamente à coloração por se saber de antemão que, com o jejum drástico como o aplicado nos materiais em estudo, a produção de mRNA e rRNA usuais nos núcleos é severamente reduzida ou mesmo interrompi-

da (ROSSO & WINICK, 1975; CONDE & SCORNICK, 1986; WINICK *et alii*, 1978; CONDE & FRANZE-FERNANDEZ, 1980; MELLO *et alii*, 1981; MITEVA & DIMOVSKA, 1987)

Quanto às fases de realimentação, se a participação de RNA recém-sintetizado afetasse os resultados referentes à eucromatina, isto seria facilmente detectável, pelo fato do RNA apresentar valores muito altos de CEC (SCOTT, 1973), embora o mecanismo deste comportamento não tenha sido ainda esclarecido.

Após a coloração, os preparados foram lavados rapidamente em água destilada e secados ao ar, segundo método de VIDAL (MELLO & VIDAL, 1980a). A montagem foi efetuada em bálsamo do Canadá após diafanização em xilol.

As observações foram efetuadas em fotomicroscópio Zeiss.

Prescindiu-se de uma determinação do espectro de absorção para os tipos cromatínicos de *Triatoma infestans*, por ter sido já demonstrado que as observações visuais permitiam discriminar as variações de cores previamente encontradas por microespectrofotometria (MELLO & VIDAL, 1987). Quanto aos núcleos de hepatócitos não foi possível efetuarem-se medidas absorciométricas dentro das exigências metodológicas, dado o tamanho reduzido das áreas heterocromáticas

IV- RESULTADOS

VI.1- Hepatócitos de camundongos:

Os dados de CEC expressos em molaridade do $MgCl_2$ acham-se apresentados nas Tabelas I a III.

As Figuras 1 a 7 documentam os aspectos nucleares da coloração pelo azul de toluidina em diferentes condições de nutrição.

Conforme observado na Tabela III, os valores de CEC para a eucromatina e para heterocromatina da maioria da população nuclear dos animais controle não diferiram entre si.

Com o jejum de até 72 horas a CEC, tanto da heterocromatina como da eucromatina, mostrou deslocamento para valores superiores de molaridade, não diferindo então os valores da heterocromatina com relação aos da eucromatina.

No jejum prolongado de 96 horas, no entanto, os valores de CEC, embora superiores aos do controle, foram mais baixos que os do jejum de 52 horas.

Já nos animais realimentados, embora não sejam atingidos os valores de CEC do controle, há uma tendência ao retorno a tal condição. Neste caso, os valores apresentados pela heterocromatina são superiores aos apresentados pela eucromatina (Tabela III).

A par das modificações da CEC, com o jejum foram também observadas alterações nos próprios fenótipos nucleares dos hepatócitos. A cromatina condensada apresentou-se mais densamente distribuída ao redor de áreas supostamente nucleolares (Figs. 1 a 3).

Nos animais realimentados o aspecto morfológico nuclear voltou a se assemelhar aos dos animais controle, com exceção da região nucleolar, a qual aparece razoavelmente expandida e se destaca por sua basofilia 24 horas após a realimentação.

No material controle e no experimental observou-se que o citoplasma dos hepatócitos exibe metacromasia mesmo quando a CEC da cromatina já foi atingida (Figs. 4 e 6).

TABELA I - Resposta ao método de coloração em eucromatina de hepatócitos de camundongo da linhagem CBA, após jejum de 52 horas (a), 72 horas (b), 96 horas (c) e realimentação seguida a 72 horas de jejum.

Condições de coloração	Condições de nutrição			
	controle	jejum (a)	jejum (b)	jejum (c) realimentação
Azul de toluidina (AT) (controle)	violeta	violeta	violeta	violeta
AT + $MgCl_2$ 0,02M	violeta	-violeta -azul violáceo	-violeta -azul	violeta
AT + $MgCl_2$ 0,04M	-violeta -azul	azul	azul	-violeta -azul esverdeado
AT + $MgCl_2$ 0,06M	-verde	-azul -azul violáceo	-azul -azul violáceo	azul esverdeado
AT + $MgCl_2$ 0,08M	verde	-azul -azul esverdeado	azul	-azul esverdeado -verde
AT + $MgCl_2$ 0,10M	verde	verde	azul	verde
AT + $MgCl_2$ 0,12M	verde	verde	azul esverdeado	verde

TABELA II - Resposta ao método de coloração em heterocromatina de hepatócitos de camundongo da linhagem CBA, após jejum de 52 horas (a), 72 horas (b), 96 horas (c) e realimentação seguida a 72 horas de jejum.

Condições de coloração	Condições de nutrição			
	controle	jejum (a)	jejum (b)	jejum (c) realimentação
Azul de toluidina (AT) (controle)	violeta	violeta	violeta	violeta
AT + MgCl_2 0,02M	violeta	violeta	violeta	violeta
AT + MgCl_2 0,04M	violeta	-violeta -azul	-violeta -azul	-violeta -azul violeta
AT + MgCl_2 0,06M	-violeta -verde	-violeta -azul	-violeta -azul	-violeta -azul violeta
AT + MgCl_2 0,08M	verde	azul	azul	verde -violeta -azul
AT + MgCl_2 0,10M	verde	verde	azul	verde -violeta -azul

TABELA III - Valores de CEC de eucromatina e heterocromatina de hepatócitos de camundongos da linhagem CBA, variando-se as condições de nutrição. (a = jejum de 52 h; b = jejum de 72 h; c = jejum de 96 h).

Tipos de cromatina	Condições de nutrição	CEC (molaridade de $MgCl_2$)
EUCROMATINA	controle	0,06
	jejum (a)	0,10
	jejum (b)	0,14
	jejum (c)	0,08
	realimentação após (b)	0,08 - 0,10
HETEROCROMATINA	controle	0,06 - 0,08
	jejum (a)	0,10
	jejum (b)	0,14
	jejum (c)	0,08
	realimentação após (b)	0,12

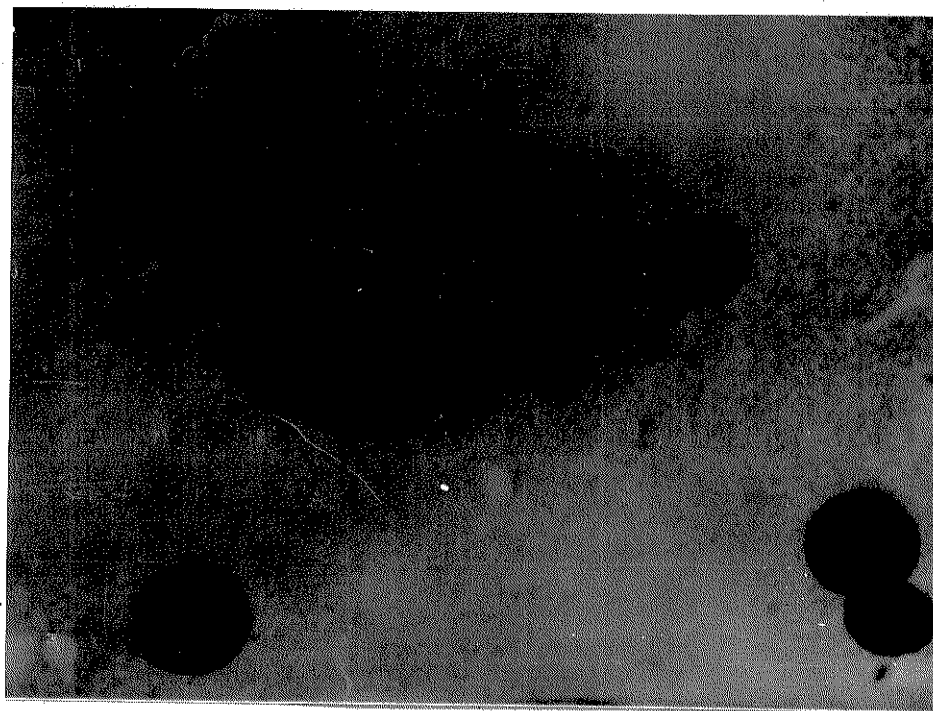


Fig.1 - Hepatócitos de camundongo alimentado (controle), corados com azul de toluidina a pH 4,0. Os pontos mais corados correspondem aos cromocentros (heterocromatina constitutiva). Aumento: X 950.

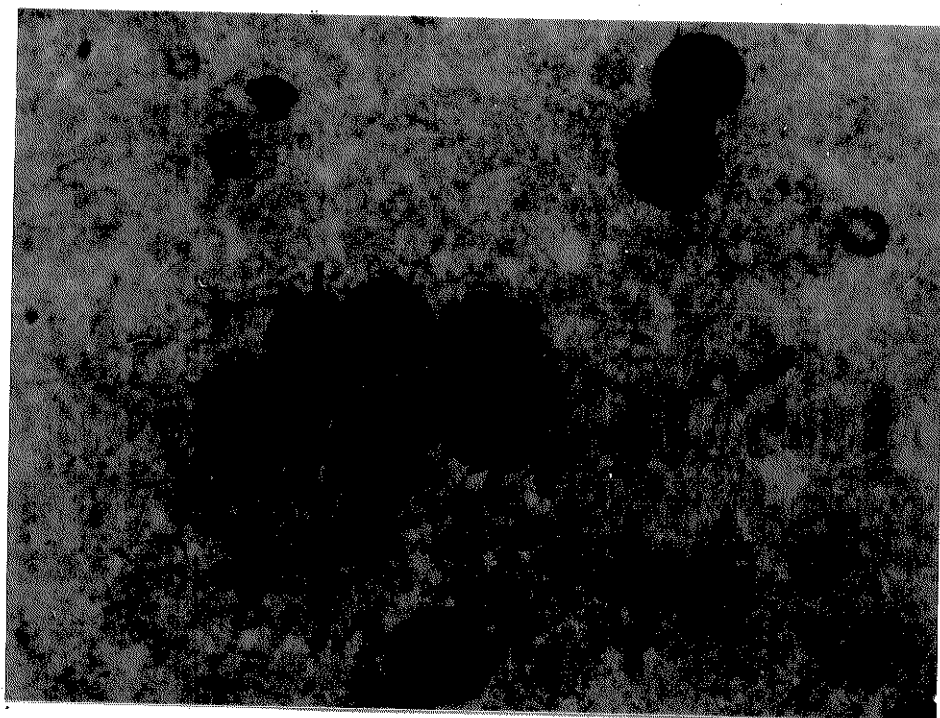


Fig.2 - Hepatócitos de camundongo submetido a um jejum de 52 horas, corados com azul de toluidina a pH 4,0. Notar que o fenótipo nuclear apresenta-se alterado, com aparente condensação cromatínica, mais densamente distribuída ao redor de áreas supostamente nucleolares. Aumento: X 950.

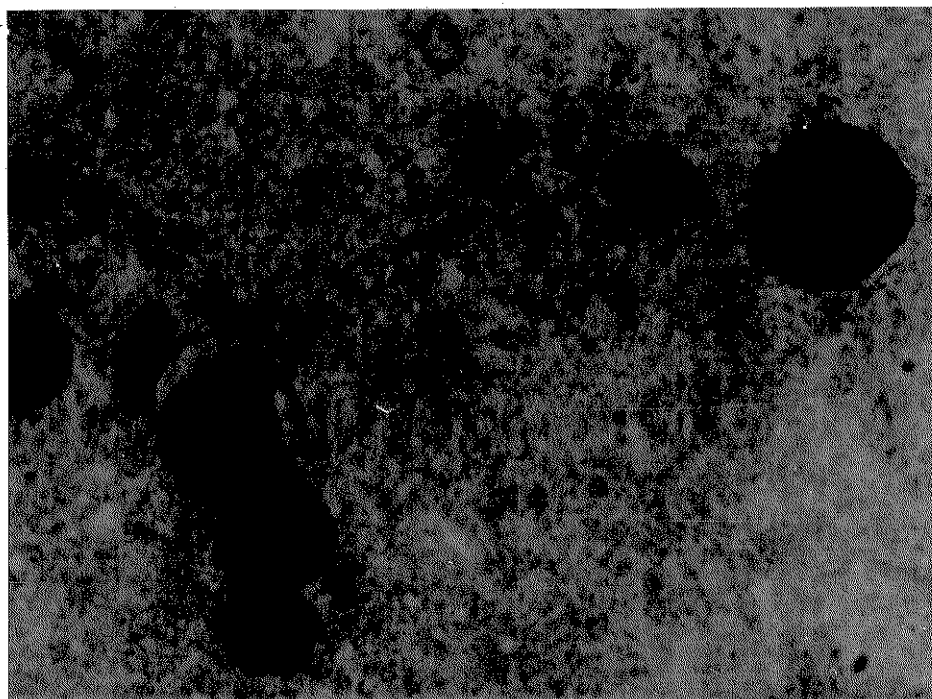


Fig.3 - Hepatócitos de camundongo submetidos a jejum de 72 horas, corados com azul de toluidina a pH 4,0. Notar que as áreas da cromatina condensada são mais conspícuas do que no controle, aparentemente circundando áreas supostamente nucleolares. Aumento: X 950.

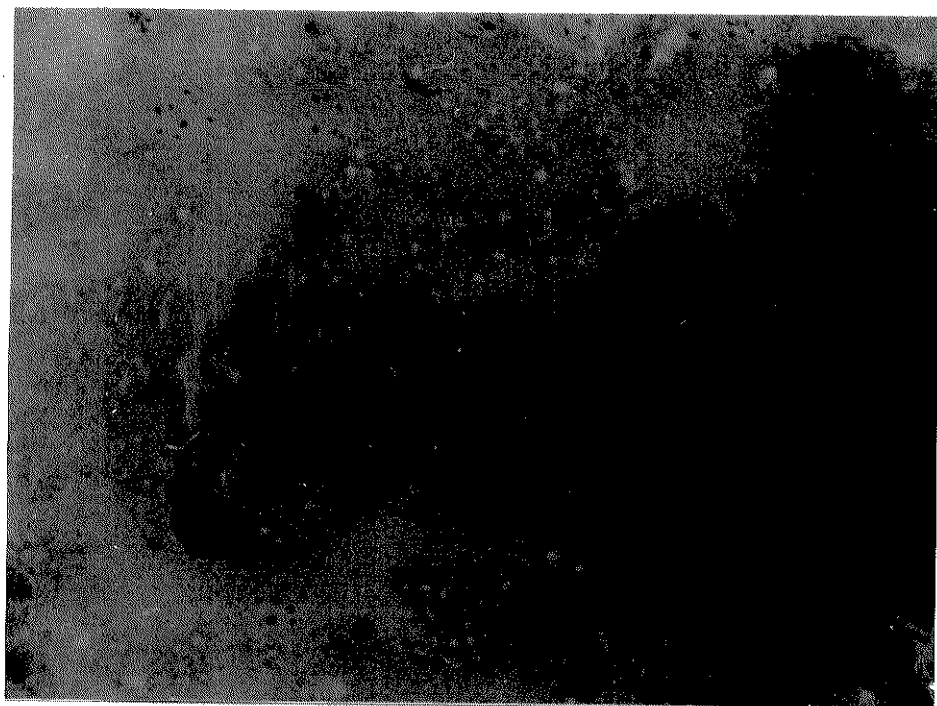


Fig.4 - Hepatócitos de camundongo alimentado (controle), corados com azul de toluidina a pH 4,0 + MgCl_2 0,06M. Notar que a população nuclear já atingiu a CEC (núcleo corado em verde), porém o citoplasma (seta) continua corado em violeta (metacromasia). Aumento: X 600.

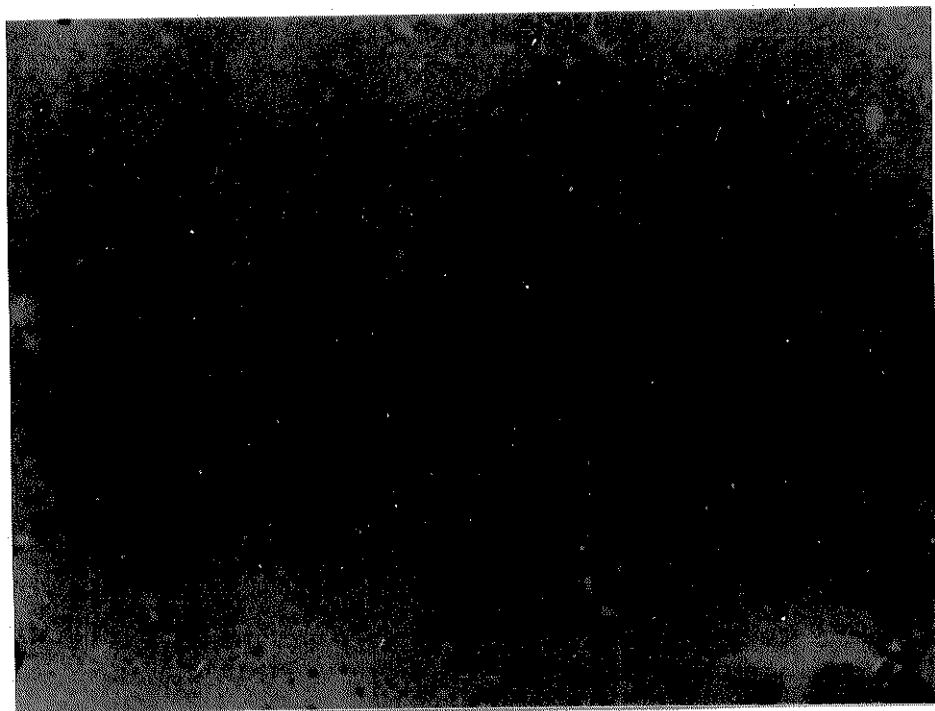


Fig.5 - Hepatócitos de camundongo submetido a jejum por 52 horas, corados com azul de toluidina a pH 4,0 + MgCl_2 0,10M. Tanto heterocromatina como eucromatina já atingiram a CEC. Observar metacromasia do citoplasma (seta). Aumento: X 950.

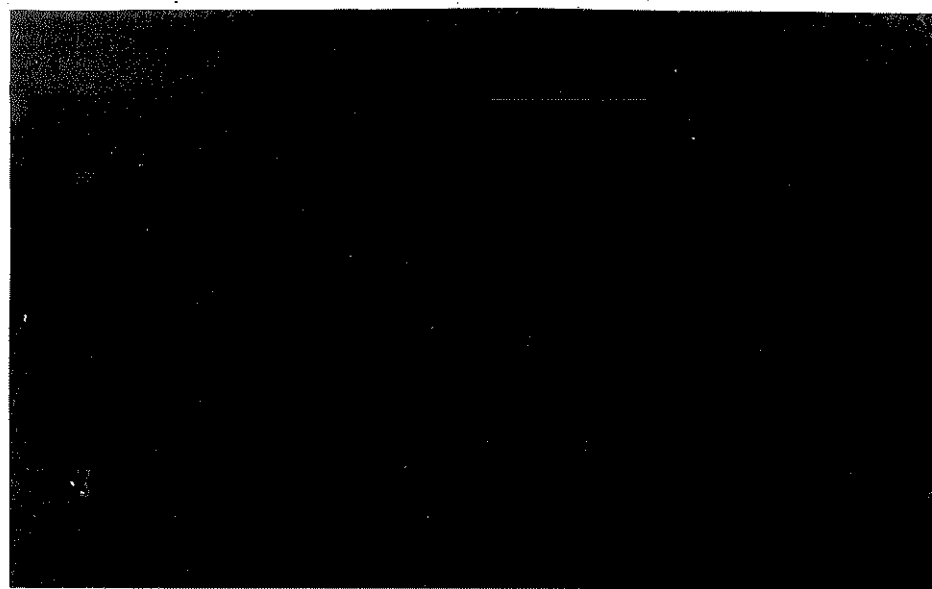


Fig.6 - Hepatócitos de camundongo submetido a jejum por 72 horas, corados com azul de toluidina a pH 4,0 + MgCl_2 0,12M. Hetero- e eucromatina estão coradas em azul-esverdeado. A CEC será alcançada em molaridade próxima a esta, ou seja, 0,14M. Aumento: X 950.

VI.2- Células epiteliais de túbulos de Malpighi

de *Triatoma infestans*

Os resultados de CEC, expressos em termos de molaridade do sal; encontram-se nas tabelas IV a VI. Os valores de CEC para os insetos bem alimentados já haviam sido determinados previamente (MELLO & VIDAL, 1987) e por apresentarem alta repetitividade para espécimens de mesmo estadio ninfal e mesma condição de nutrição, foram aqui reproduzidos diretamente para efeito de comparação.

As figuras 7 a 15 salientam alguns aspectos da colorabilidade dos núcleos de insetos controle e submetidos ao jejum.

A basofilia citoplasmática exibida pelos túbulos de Malpighi se deve à presença de RNA (MELLO *et alii*, 1973). As cores variáveis dessa basofilia às vezes em túbulos corados em mesmas condições, como mostrado nas Figs. 10 a 16, refletem uma concentração individual variável de ribossomos, já comprovada ao microscópio eletrônico (MELLO *et alii*, 1981)

Da mesma forma que para insetos bem alimentados, os espécimens submetidos ao jejum geralmente mostram que a CEC da heterocromatina difere da CEC da eucromatina, seja em nú-

cleos com 1 cromocentro, seja naqueles com vários cromocentros (Tabela VI). Todavia, em núcleos em degeneração dos insetos submetidos ao jejum foi encontrado o mesmo valor de CEC para heterocromatina e eucromatina. Em núcleos gigantes dos espécimes sob jejum a mesma situação foi verificada.

Quanto aos insetos realimentados, os valores de CEC foram os mesmos para heterocromatina e eucromatina (Tabela VI).

Com o jejum os valores de CEC para a eucromatina não se modificaram, mas os da heterocromatina decresceram significativamente (Tabela VI). A CEC da heterocromatina que era atingida em valores mais elevados do que a eucromatina nos insetos controle, passa a ser menor que a da eucromatina após o jejum (Tabela VI).

Nos espécimes alimentados após o jejum, os valores da CEC para a eucromatina foram iguais aos verificados nos espécimens submetidos ao jejum e controle, sendo o mesmo verificado em núcleos com um e vários cromocentros e fenótipos normais.

Já os valores de CEC para heterocromatina de núcleos com um ou vários cromocentros e fenótipos considerados normais, em insetos realimentados após o jejum, mostraram-se superiores aos dos espécimens submetidos ao jejum, porém inferiores ao controle.

Como nos insetos bem alimentados (MELLO & VIDAL, 1987), verificou-se nos insetos submetidos ao jejum e realimentados, que usando-se molaridades de $MgCl_2$ que ultrapassam

àquela da CEC, há uma tendência à recuperação da metacromasia, especialmente na eucromatina (Tabelas IV e V).

A semelhança ao que ocorre nos hepatócitos, foi verificado que o citoplasma continua a exibir metacromasia mesmo quando os núcleos dos túbulos de Malpighi exibem a CEC (Figs. 10-15).

A par destes resultados de CEC e suas modificações, foi verificado que com a realimentação, os fenótipos nucleares resultantes do jejum (núcleos gigantes e degenerados) são encontrados em menor frequência, chegando mesmo a desaparecer.

TABELA V - Resposta ao método de coloração em heterocromatina de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Iriatoma infestans*, após jejum prolongado (6 meses) e realimentação seguida ao jejum.

Condições de coloração	Condições de nutrição					
	Controle ¹		Jejum			
	Núcleos com 1 cromocentro	Núcleos com vários cromocentros	Núcleos com 1 cromocentro	Núcleos com vários cromocentros normais	Núcleos em degeneração	Núcleos com vários cromocentros Normais Gigantes Núcleos em degeneração
Azul de toluidina (AT) controle	violeta	violeta	violeta	violeta	violeta	violeta violeta violeta
AT + MgCl ₂ 0,1M	violeta	violeta	-azul -verde	-azul -verde	violeta	-azul -verde violeta
AT + MgCl ₂ 0,2M	violeta	violeta	-azul -verde	-azul -verde	-azul -verde	azul verde azul -verde -verde
AT + MgCl ₂ 0,3M	-violeta -azul	-azul -verde	-azul -verde	azul	-azul -verde	-verde -violeta -azul
AT + MgCl ₂ 0,4M	-verde -azul esverdeado	-verde -violeta	verde	-azul -violeta	verde	* -verde -azul verde
AT + MgCl ₂ 0,5M	azul esverdeado	violeta azulado	-azul -verde	-azul ² -violeta	verde	* * *
AT + MgCl ₂ 0,8M	azul esverdeado	violeta	-azul -verde	-azul -violeta	*	* * *
AT + MgCl ₂ 1,0M	azul esverdeado	violeta	-verde -violeta ² -azul	-azul -violeta	*	* * *

¹ Os dados controle são de MEIIO & UJDAL (1987).

² Menos frequente

* Dados não observados

TABELA IV - Resposta ao método de coloração em eucromatina de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, após jejum prolongado (6 meses) e realimentação seguida ao jejum.

Condições de coloração	Condições de nutrição					
	controle ¹	Jejum				Realimentação
	Núcleos com 1 cromocentro	Núcleos com vários cromocentros	Núcleos com 1 cromocentro	Núcleos com vários cromocentros	Núcleos com 1 cromocentro	Núcleos com vários cromocentros
			normais	gigantes	normais	gigantes
				degeneração		degeneração
Azul de toluidina (AT) controle	violeta	violeta	violeta	violeta	violeta	violeta
AT + MgCl ₂ 0,1M	violeta	violeta	azul	-violeta ² -azul	-azul -azul esverdeado	-azul -verde
AT + MgCl ₂ 0,2M	verde	verde	verde	violeta -azul -verde	verde	azul esverdeado verde
AT + MgCl ₂ 0,3M	verde	verde	azul esverdeado	azul	violeta -azul -verde	-verde -violeta -azul
AT + MgCl ₂ 0,4M	violeta	violeta	violeta	violeta	-azul -verde	-verde -azul
AT + MgCl ₂ 0,5M	violeta	violeta	violeta	violeta	-azul -verde	-verde -azul
AT + MgCl ₂ 0,8M	violeta	violeta	violeta	violeta	-azul -verde	-verde -azul
AT + MgCl ₂ 1,0M	violeta	violeta	violeta	violeta	-azul -verde	-verde -azul

¹Os dados controles são de MELLO & VIDAL (1987)

²Menos frequente

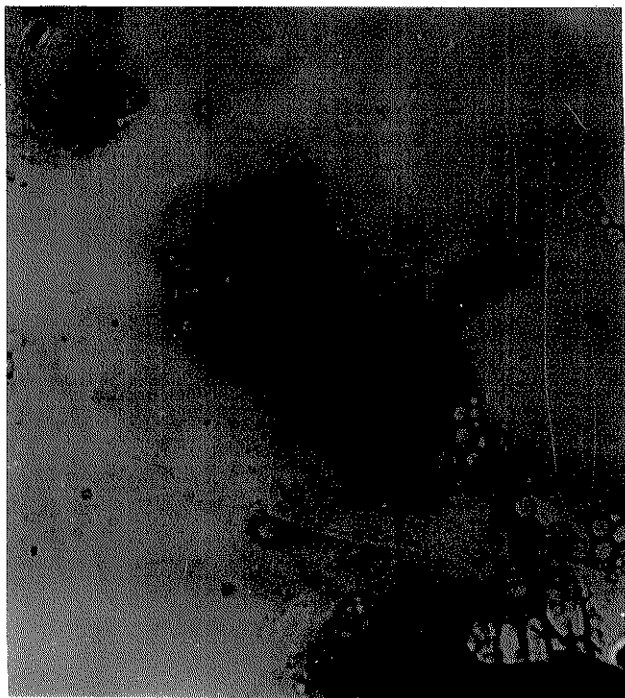
* Dados não observados

TABELA VI - Valores de CEC de eucromatina e heterocromatina de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug, variando-se as condições de nutrição.

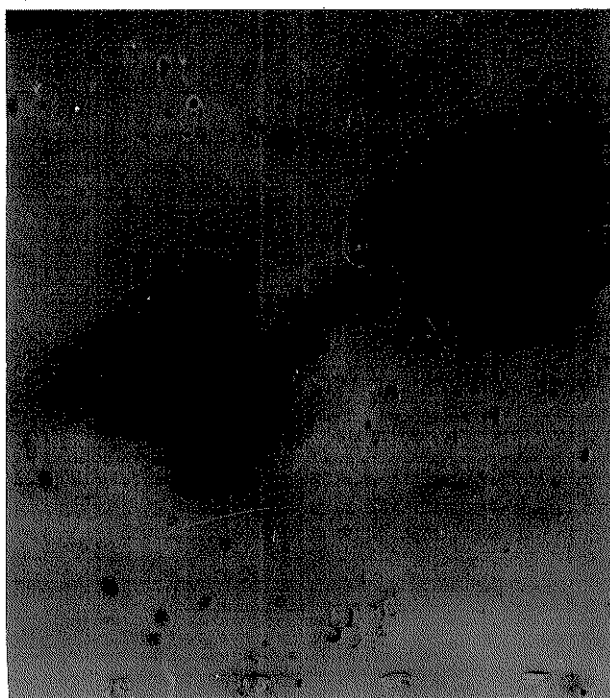
Tipos de cromatina	condições de nutrição	CEC (Molaridade de $MgCl_2$)		
		núcleos com 1 cromocentro	núcleos com vários cromocentros	núcleos em degeneração
		normais gigantes		
EUCROMATINA	controle ¹	0,2	0,2	-
	jejum	0,2	0,2	0,2
	realimentado	0,2	0,2	0,2
HETERO CROMATINA	controle ¹	0,4	0,3	-
	jejum	0,1	0,1	0,2
	realimentado	0,2	0,2	0,2

¹Os dados controle são de MELLO & VIDAL (1987).

7



8



Figs. 7 e 8 - Núcleos de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* alimentado (controle), corados com azul de toluidina a pH 4,0. Na figura 7 vêem-se núcleos com 1 cromocentro (c) e na figura 8 núcleos com vários cromocentros. Aumento: X 950.

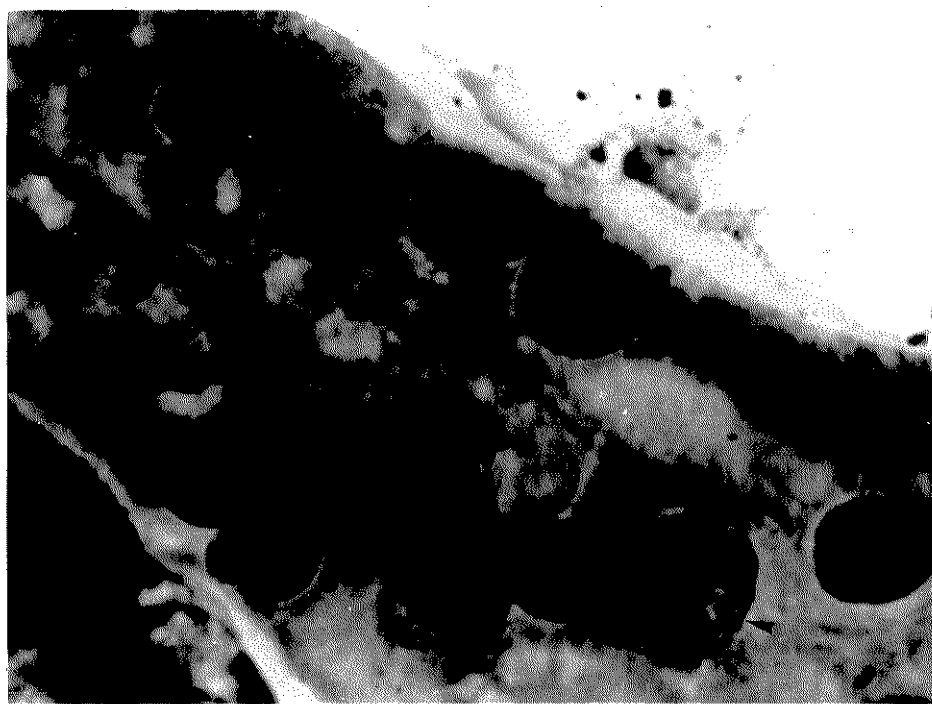


Fig. 9 - Núcleos de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetido a jejum por 6 meses, corados com azul de toluidina a pH 4,0. Notar nesta figura que os núcleos encontram-se degenerados (setas), mas altamente metacromáticos. Aumento: X 950.

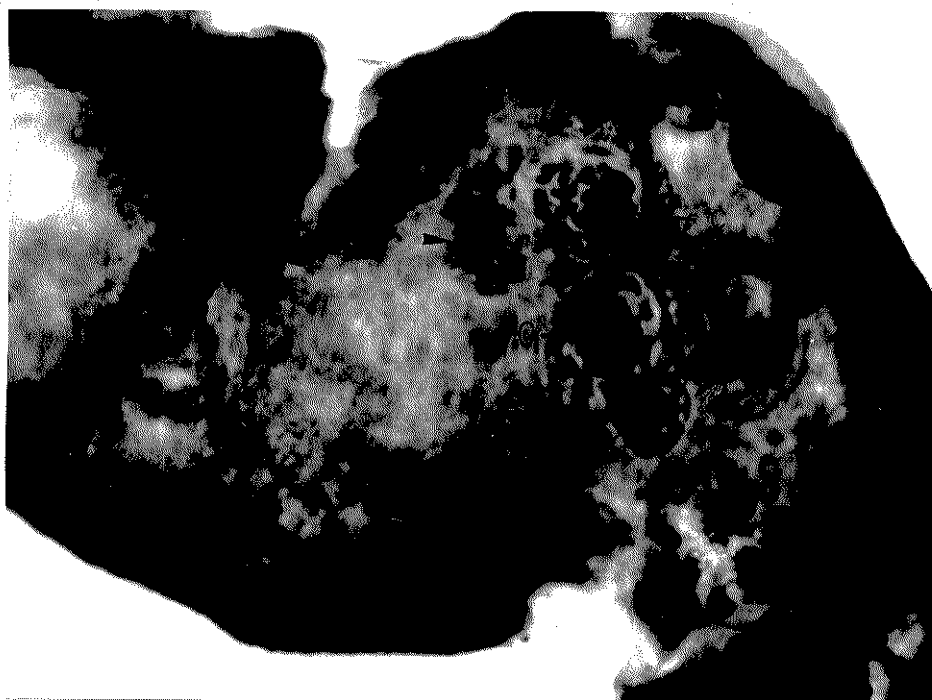


Fig. 10 - Nucleos de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetido a jejum por 6 meses, corados com azul de toluidina a pH 4,0. Nesta figura, vêem-se núcleos com um cromocentro normal (c) ao lado de núcleo com cromocentro descompactado (seta). A metacromasia do citoplasma talvez seja devida ao RNA. Aumento: X 950

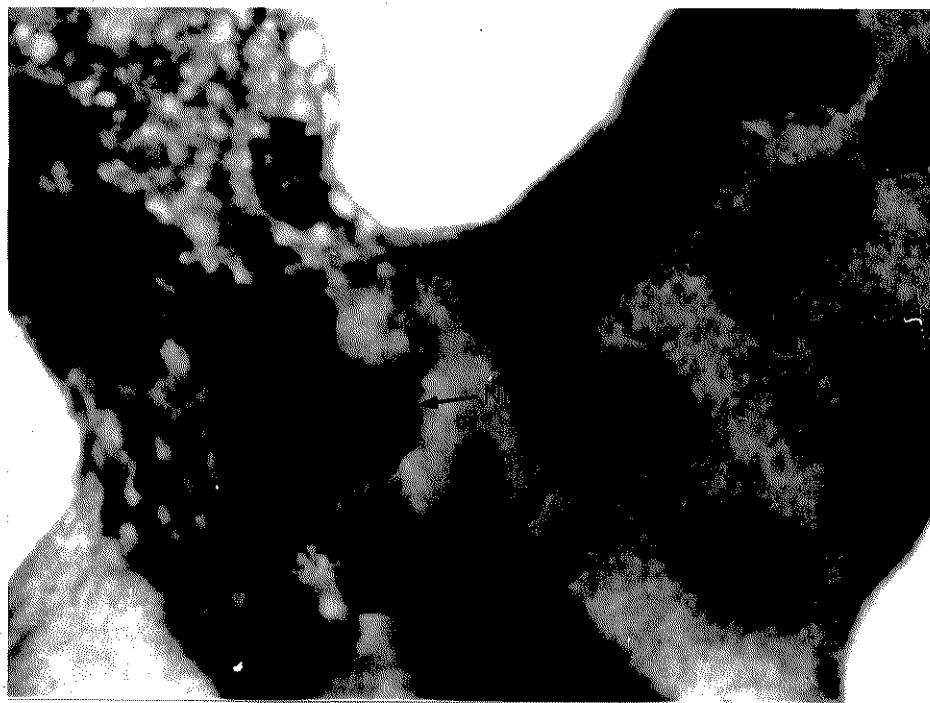


Fig. 11 - Detalhe de núcleos de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetido a jejum por 6 meses, corados com azul de toluidina a pH 4,0. Nesta figura é possível observar núcleos degenerados (NN) ao lado de núcleos aparentemente normais (N). A metacromasia do citoplasma talvez seja devida ao RNA. Aumento: X 950.

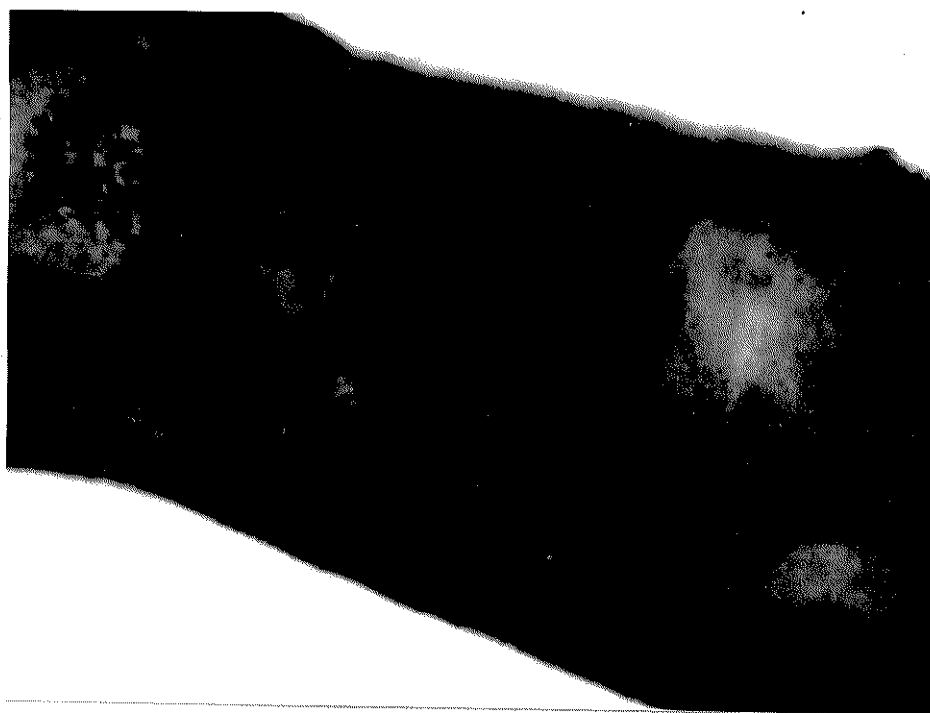


Fig. 12 - Núcleos de células epiteliaes de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetido a jejum por 6 meses, corados com azul de toluidina a pH 4,0 + MgCl_2 0,1M. Notar que a heterocromatina já atingiu a CEC (seta) e a eucromatina aparece corada em violeta. A metacromasia do citoplasma talvez seja devida ao RNA. Aumento: X 950.



Fig. 13 - Núcleos de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetido a jejum por 6 meses, corados com azul de toluidina a pH 4,0 + MgCl_2 0,2M. Notar a CEC de eucromatina e heterocromatina de núcleos aparentemente normais (seta), de núcleos degenerados (NN) e metacromasia de núcleos diplóides (ND). Aumento: X 950.

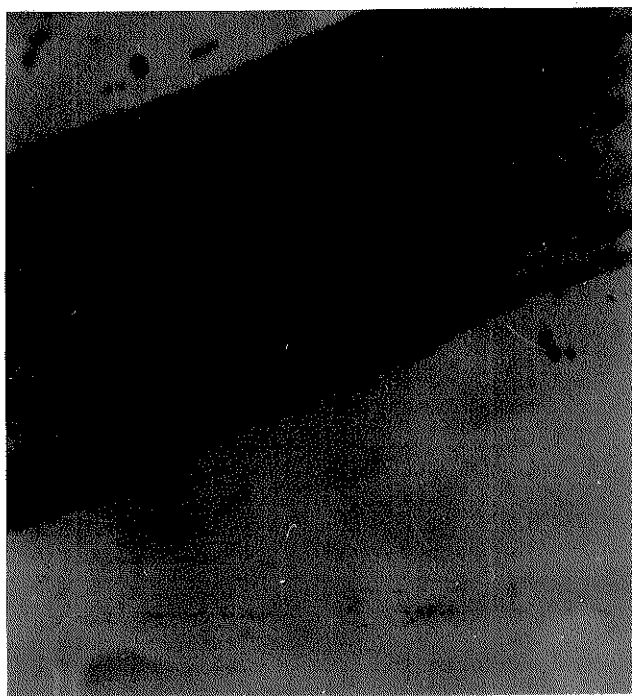


Fig. 14 - Núcleo gigante em túbulo de Malpighi de *Triatoma infestans* submetido a jejum por 6 meses, corado com azul de toluidina a pH 4,0 + MgCl_2 0,2M. Nesta molaridade foi atingida a CEC da heterocromatina, mas a eucromatina mostra retorno à metacromasia (seta), possivelmente por extração de histonas. A metacromasia do citoplasma talvez seja devida ao RNA. Aumento: X 950.

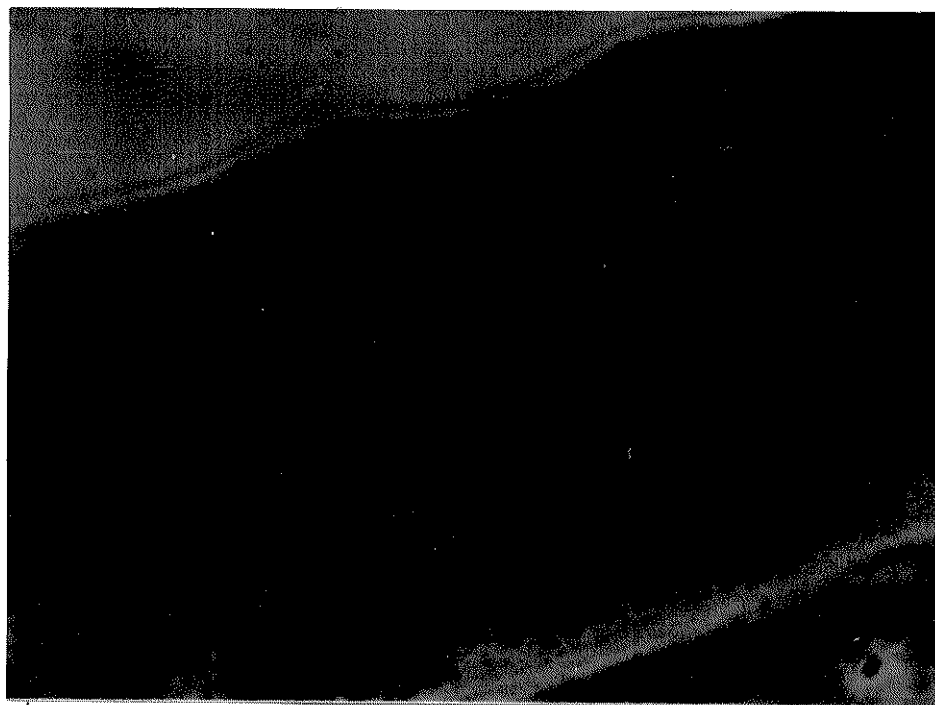


Fig. 15 - Núcleos de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetido a jejum por 6 meses, corados com azul de toluidina a pH. 4,0 + MgCl_2 0,4M. Heterocromatina em verde e eucromatina em violeta (fase de extração de histonas?). Aumento: X 950.

V- DISCUSSÃO

Os presentes resultados indicam que, em condições normais de alimentação, os valores de CEC (Concentração Eletrolítica Crítica) diferem quando se consideram heterocromatina vs. eucromatina de diferentes materiais. Com o jejum, os valores de CEC se alteraram, tanto para hetero- como para eucromatina, nas células dos materiais analisados, exceto em eucromatina de núcleos com um e com vários cromocentros, em *Triatoma infestans*. A resposta ao jejum, em termos de CEC seguiu diferentes padrões, conforme o tipo de material.

Os valores de CEC de hetero- e eucromatina de hepatócitos de camundongo não diferiram entre si, sob condições de jejum, uma situação diferente da verificada nas células de *Triatoma infestans*. Não foram iguais, no entanto, após realimentação, uma situação que de novo difere daquela constatada em células de *Triatoma infestans*. Estes dados sugerem diferenças estruturais entre os tipos de heterocromatina e eucromatina considerados (hemíptero vs. camundongo) bem como do comportamento destas cromatinas frente ao jejum.

Tanto a CEC da hetero- como da eucromatina em hepatócitos são atingidas em concentrações de $MgCl_2$ inferiores às de DNA puro e complexos DNA/ H_1 determinadas *in vitro* (VIDAL & MELLO, 1987). Isto se deve possivelmente ao menor número de grupamentos fosfatos livres disponíveis seja para o corante catiônico seja para os microcátions nas condições de cromatina *in situ* e/ou a seu grau de empacotamento.

Já em *Triatoma infestans* a CEC de eucromatina em condições normais de nutrição ou sob condições de jejum correspondem à do DNA puro *in vitro* (VIDAL & MELLO, 1987), com exceção da eucromatina dos núcleos gigantes. A CEC da heterocromatina, que em insetos bem nutridos era atingida em valores altos (MELLO & VIDAL, 1987), passa a ser alcançada em concentrações de $MgCl_2$ menores do que aquelas detectadas para a eucromatina. Esta alteração possivelmente seja promovida pela descompactação da heterocromatina que se observa neste material com o jejum (MELLO, 1983, 1987; ANDRADE & MELLO, 1987).

Ao afrouxamento da heterocromatina de *Triatoma infestans* com o jejum provavelmente se relacione uma ativação de genes normalmente não expressos ai presentes, como já sugerido por MELLO (1983, 1987) e para outros materiais e situações, por DIAS e colaboradores (1969), SANDRITTER e colaboradores (1974), SIMÕES e colaboradores (1975) e SIMÕES e CESTARI (1982). Possivelmente estejam envolvidos os genes *hsp* (heat shock protein) ativados por choque de temperatura e outros agentes indutores de "stress" (ATKINSON & WALDEN, 1985).

Para o discreto afrouxamento da eucromatina dos núcleos gigantes de *Triatoma infestans*, sugere-se uma alteração na composição de proteínas histônicas e também algumas proteínas não histônicas, observada em outros sistemas sob condições de jejum (CASTRO *et alii*, 1986), o que possivelmente modificaria seu arranjo conformacional.

O achado de altos valores de CEC na heterocromatina dos insetos bem nutridos parece estar relacionado ao alto grau de empacotamento da heterocromatina nos cromocentros, fazendo com que nestes haja uma concentração muito elevada de DNA ocupando uma pequena área. Assim, haveria necessidade de uma concentração maior de íons Mg^{2+} nesta heterocromatina, para que fosse bloqueado o seu grande número de fosfatos disponíveis (MELLO & VIDAL, 1987).

A recuperação da metacromasia exibida principalmente por eucromatinas de *Triatoma infestans* quando se utilizam molaridades salinas que ultrapassem àquela da CEC se deve à remoção de proteínas histônicas causada pela alta concentração de sal (PIMENTEL, 1983; MELLO & VIDAL, 1987).

Observou-se também que os núcleos diplóides de traquéias e musculatura contíguas aos túbulos de Malpighi, exibem metacromasia mesmo em concentrações de Mg^{2+} nas quais a cromatina dos núcleos poliplóides se cora em verde. Uma vez que o conteúdo de componentes nucleoproteicos das células diplóides é muito menor do que o dos núcleos das células epiteliais de túbulos de Malpighi, da mesma forma que sua área heterocromática, é de se supor que os tipos cromatínicos de núcleos di-

plóides atinjam o valor de CEC muito antes que os núcleos poliplóides. A metacromasia destes núcleos diplóides se deveria, então, à citada remoção de proteínas histônicas, expondo os radicais fosfatos do DNA, graças a uma concentração de $MgCl_2$ relativamente alta para eles, à semelhança do encontrado por PIMENTEL (1983), utilizando no entanto NaCl como sal, em pesquisa de complexos nucleoproteicos de eritrócitos de frangos.

O aumento do tempo de jejum fez com que a CEC em cromatina de hepatócitos de início (52 e 72 horas) aumentasse e então (96 horas) decrescesse. O aumento de CEC nos tempos de 52 e 72 horas parece correlacionado a um aumento generalizado de compactação cromatínica, o que foi confirmado pela própria observação do aspecto morfológico nuclear. Aumentando-se o tempo de jejum para 96 horas a CEC retorna para valores mais baixos, o que indicará um certo afrouxamento cromatínico, o qual poderia contribuir para o início da ativação de alguns genes, e que talvez se manifestassem apenas em atividades metabólicas extremamente baixas, como resposta ao "stress", à semelhança com o que ocorre em *Triatoma infestans*.

Como os valores de CEC tanto da heterocromatina como da eucromatina se alteraram, conforme variava-se o tempo de jejum, supõem-se que os genes ativados como resposta ao "stress" estejam presentes nos dois tipos cromatínicos, no caso dos hepatócitos. Ao se realimentarem os animais, os valores de CEC se modificaram, mostrando um retorno à condição exibida pelos animais controle, pois a realimentação propicia um retorno às condições normais de metabolismo, pelo menos no

fígado (DERENZINI *et alii*, 1980), influenciando inclusive o seu fenótipo nuclear, que se assemelha ao normal.

Nos insetos realimentados após jejum, diferindo do que ocorre na eucromatina, os valores de CEC para a heterocromatina, tanto em núcleos com um cromocentro como em núcleos com vários cromocentros e fenótipo normal, mostraram-se superiores quando comparados aos dos insetos submetidos ao jejum. Isto indicaria que a heterocromatina começa a se compactar novamente, uma vez que são retomadas as condições normais de metabolismo do núcleo. Possivelmente não mais ocorra a transcrição de genes presentes na heterocromatina. Tais dados estão de acordo com aqueles de WIGGLESWORTH (1967a).

Também na condição de realimentação não foram observados núcleos gigantes, encontrados nos insetos submetidos ao jejum. Uma vez que tais núcleos são o reflexo da baixa atividade metabólica e representam um mecanismo de sobrevivência para o inseto em condições de "stress" (WIGGLESWORTH, 1967a; MELLO & VIDAL, 1979; MELLO, 1987), com a atividade normal celular, tal recurso não seria necessário e possivelmente tais tipos de núcleos degenerem.

Nos hepatócitos de camundongo constatou-se metacromasia na região do nucléolo (animais controle e realimentados) até a concentração de 0,08M de Mg^{2+} , e no citoplasma destas células e em células de túbulos de Malpighi a metacromasia é observada mesmo em concentrações elevadas de sal. Esta metacromasia é devida ao RNA e é detectável mesmo em concentrações salinas que aboliriam a metacromasia do DNA, o

que estaria de acordo com relatos de que a CEC de RNA se verifica em concentrações salinas elevadas (Scott, 1973) o que indica diferente resposta à competição azul de toluidina- Mg^{2+} em complexos RNA-proteínas, comparados aos complexos DNA-proteínas.

II- CONCLUSÕES

- 01- Em condições normais de alimentação os valores de CEC diferem quando se comparam hetero- e eucromatina, e se consideram diferentes materiais (camundongos e *T. infestans*) usando-se azul de toluidina como corante catiônico e Mg^{2+} como microcátion competidor.
- 02- O jejum induz diferenças nos valores de CEC de hetero- e eucromatina, em hepatócitos de camundongo, porém apenas nos valores da heterocromatina, em células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*.
- 03- Os valores da CEC de hetero- e eucromatina de hepatócitos de camundongo não diferem entre si, após jejum, diferindo da situação verificada nas células de *Triatoma infestans*. Portanto, a resposta ao jejum, em termos de CEC, seguiu diferentes padrões conforme o tipo de material, o que sugere diferenças estruturais entre os tipos de cromatina considerados.

04- Tanto a CEC da heterocromatina como da eucromatina em hepatócitos são atingidas em concentrações inferiores às de DNA puro ou complexado com histona H_1 *in vitro*, devido possivelmente ao menor número de grupamentos fosfatos livres disponíveis ao corante ou aos microcátions e/ou ao grau de distensão destes tipos cromatínicos por área ocupada pelos mesmos.

05- A CEC da eucromatina de células epiteliais de *Triatoma infestans*, em insetos bem alimentados ou em condição de jejum, corresponde à do DNA puro *in vitro*, com exceção a dos núcleos gigantes, que mostraram um decréscimo nos valores de CEC.

06- Na heterocromatina dos insetos, em condição de jejum, há decréscimo da CEC quando comparada à dos insetos bem nutridos, e isso se deve a uma descompactação do tipo cromatínico considerado, possivelmente relacionado à ativação de genes que respondem a "stress".

07- A CEC dos hepatócitos aumentou com o jejum de 52 e 72 horas, possivelmente devido a um aumento generalizado da com

pactação cromatínica (confirmado pelo próprio aspecto morfológico de distribuição cromatínica). Ao se aumentar o tempo de jejum para 96 horas, a CEC decresceu o que sugere um afrouxamento cromatínico que talvez contribua para a ativação de genes que apenas se manifestem em atividades metabólicas extremamente baixas.

08- Nos hepatócitos, a CEC de hetero- e eucromatina variando conforme variou o tempo de jejum, leva a supor que os genes ativados como resposta ao "stress", estejam presentes nos dois tipos cromatínicos, o que diferiria de *Triatoma infestans*, onde se supõe que apenas a heterocromatina contenha tais genes.

09 Com a realimentação, a CEC dos hepatócitos e o próprio fenótipo nuclear mostram um retorno aos valores exibidos por animais controle, confirmando outros dados de que a realimentação propicia um retorno às condições normais de metabolismo. Nos insetos, há indicação de que a realimentação também de alguma forma propicie o retorno a atividades metabólicas normais.

10- Nos hepatócitos de camundongos, foi verificada metacromasia na região do nucléolo (animais controle e realimen-

tados), e no citoplasma, mesmo quando a cromatina já havia atingido a CEC, o que indica diferente resposta à competição azul de toluidina- Mg^{2+} em complexos RNA-proteínas, comparados aos complexos DNA-proteínas.

11- Há uma recuperação da metacromasia, principalmente na eu-cromatina de *Triatoma infestans*, quando se utilizam molaridades salinas que ultrapassam àquela da CEC, o que provavelmente se deva à remoção de proteínas histônicas causadas pela alta concentração do sal.

12- Os núcleos diplóides de traquéias e musculaturas contíguas aos túbulos de Malpighi, exibem metacromasia mesmo em concentrações de Mg^{2+} para as quais a cromatina dos núcleos poliplóides aparece corada em verde. Como o conteúdo nucleoproteico dos núcleos diplóides é muito menor que dos núcleos poliplóides, da mesma forma que sua área heterocromática, supõem-se que os tipos cromatínicos dos primeiros atinjam muito antes a CEC, e se mostram metacromáticos devido à remoção de proteínas histônicas causadas pela alta concentração do sal ($MgCl_2$).

VII-RESUMO

A concentração eletrolítica crítica (CEC) da cromatina corresponde à concentração salina na qual se constata total abolição do fenômeno de metacromasia, quando se usam azul de toluidina como corante catiônico e íons Mg^{2+} como microcátions. Neste trabalho a CEC foi determinada em hetero- e eucromatina de hepatócitos de camundongo e de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetidos a jejum. O objetivo foi determinar variações de CEC que pudessem ser correlacionadas a alterações estruturais e/ou de composição desses tipos cromatínicos, induzidas pelo "stress" do jejum.

Constataram-se alterações de CEC na hetero- e na eucromatina de hepatócitos de camundongos e na heterocromatina de células de *Triatoma infestans*, nas condições de jejum. O padrão de resposta ao jejum, no entanto, variou conforme o material, sugerindo diferenças estruturais entre os tipos cromatínicos considerados.

O sensível decréscimo no valor da CEC na heterocromatina de *Triatoma infestans* após o jejum certamente se relaciona à sua nítida descompactação nesta situação fisiológica. Já nos hepatócitos, com o jejum, há de início uma compactação de hetero- e eucromatina, evidenciada através do aumento dos valores de CEC e mesmo visualmente, e só então, após tempo mais elevado, decréscimo no valor de CEC e também em compactação cromatínica.

A realimentação propiciou a que os valores de CEC se aproximassem aos do controle, sugerindo retomada da compactação cromatínica normal e possivelmente de suas funções.

VIII- SUMMARY

The critical electrolyte concentration (CEC) of chromatin corresponds to the salt concentration at which the phenomenon of metachromasy is completely abolished when toluidine blue is used as the cationic dye and Mg^{2+} ions as microcations. In this work the CEC values were determined in the hetero- and euchromatin of mouse hepatocytes, and in the epithelial cells of the Malpighian tubules of *Triatoma infestans* all after being submitted to starvation. The objective was to determine variations in CEC which could be correlated to structural alterations and/or to the composition of these types of chromatin induced by the stress of starvation.

Under starvation conditions, alterations of the CEC were shown in the hetero- and euchromatin of the hepatocytes and in the heterochromatin of the *Triatoma infestans* cells. The pattern of response to starvation, however, varied according to the material, suggesting structural differences between the types of chromatin considered.

The noticeable decrease in the CEC value of the heterochromatin of *Triatoma infestans* after starvation is certainly related to the clearly defined unravelling which occurs under this physiological situation. In the case of starved hepatocytes, there is initially a condensation of hetero- and euchromatin as measured both by an increase in the CEC values and visually, which is followed after a certain time by a decrease in the CEC value and also unpackage of the chromatin.

With the resumption of feeding the CEC values approximate those of the control, suggesting a return to normal packing state of the chromatin and possibly a normalization of its functions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C.G.T.J. & MELLO, M.L.S. Phenotypes and number of Malpighian tubule nuclei in *Triatoma infestans* Klug along development and starvation. *Rev.bras.Genet.*, 10: 449-57, 1987.
- ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; SAUNDERS, P. & SAUNDERS, G.F. Localization of repetitive DNA in the chromosomes of *Microtus agrestis* by means of *in situ* hybridization. *Chromosoma*, 32: 224-36, 1970.
- ATKINSON, B.C. & WALDEN, D.B. *Changes in eukariotic gene expression in response to environmental stress*. Orlando, Academic Press, 1985.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. & MELLO, M.L.S. Mg^{2+} -dependent ATPase activity investigated in heterochromatin, euchromatin and nucleoli of *Triatoma infestans*. *Rev.bras.Genet.*, 9 : 223-9, 1986.

BERGERON, J.A. & SINGER, M. Metachromasy: an experimental and theoretical reevaluation. *J.Biophys.Biochem.Cytol.*, 4 : 433-57, 1958.

BURKHOLDER, G.D. & WEAVER, M.C. DNA-protein interactions in condensed and extended chromatin. *J.Cell.Biol.*, 63 : 43a, 1974.

CALZONE F.J., STATOPOULOS, V.A.; GRASS, D. GOROVSKY, M.A. & ANCERER, R.C. Regulation of protein synthesis in *Tetrahymena*. RNA sequence sets of growing and starved cells. *J.biol.Chem.*, 258 : 6869-905, 1983.

CARSTEN, S. & STORCH, V. Beeinfassung der Ultrastruktur von Fettkorper und Mitteldarm des Staphyliniden *Atheta fungi* (Grav.) durch Umwelteinflusse. *Zool.Jb.Anat.*, 103 : 73-80, 1980.

CASTRO, C.E.; MAJOR-ARMSTRONG, J. & RAMIREZ, M.E. Diet mediated alteration of chromatin structure. *Fed.Proc.*, 45 : 2394-8, 1986.

CLIFFORD, B. & WITTKUS, E.R. The fine structure of the hepatopancreas of the woodlouse, *Oniscus asellus*. *J.Morphol.*, 135 : 355-49, 1971.

COMINGS, D.E. The structure and function of chromatin.
Adv.Human Genet., 3 : 237-31, 1972.

CONDE, R.D. & SCORNIK, O.A. Role of degradation in the growth
of the liver after a nutritional shift. *Biochem.J.*, 158 :
385-90, 1976.

CZUPRYN, M.; FRONK, J. & TOCZKO, K. Chromatin reorganization
during early differentiation of *Physarum polycephalum*.
Biochim.Biophys.Acta, 826 : 995-100, 1985.

DERENZINE, M.; NOVELO, F. & PESSION-BRIZZI, A. Relationship
between the fine structure and the transcription activity
of intranuclear chromatin in rat hepatocytes. *Eur.J.Cell
Biol.*, 22 : 48, 1980.

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

GALEGO, L.; BARAHONA, J. & RODRIGUES-POUSADA. Response of
Tetrahymena pyriformes to stress induced by starvation.
Eur.J.Biochem., 139 : 163-71, 1984.

GAS, N. & NOAILLIAC-DEPEYRE, J. Studies on intestinal
epithelium involution during prolonged fasting.
J.Ultrastruct.Res., 56 : 137-51, 1976.

HEITZ, E. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb.Wiss.Bot.*, 69: 726-818, 1928.

HEITZ, E. Ueber α - und β -heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromomeren bei *Drosophila*. *Biol.Zbl.*, 54 : 588-609, 1934.

HOFF-JORGENSEN, E.; LOUTRUP, E. & LOUTRUP, S. Changes in deoxyribonucleic acid and total nitrogen in planarian worms during starvation. *J.Embriol.Exp.Morphol.*, 1 : 161-5, 1953.

IOZZO, R.V.; BOLENDER, R.P. & WIGHT, T.N. Proteoglycan changes in the intercellular matrix of human colon carcinoma. An interated biochemical and stereologic analysis. *Lab.Invest.*, 47 : 124-38, 1982.

KUBRUSLY, F.S. Ação do cobre e mercúrio sobre a estrutura nuclear e atividade de alguns sistemas enzimáticos em *Triatoma infestans* Klug. Campinas, 1984. 71p. Tese (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

LEE, J.C. & YUNIS, J.J. Constitutive heterochromatin during early embriogenesis of *Microtus agrestis*. *Exp.Cell Res.*, 5 : 339-41, 1970.

LEE, J.C. & YUNIS, J.J. Cytological variations in the constitutive heterochromatin in *Microtus agrestis*. *Chromosoma*, 35 : 117-24, 1971.

LISON, L. Acides nucléiques, nucleoprotéines, nucleotides. In: ----- *Histochemie et cytochemie animales*. Paris. Gauthier Villars, 1960. v.1 cap.12 p.355-397.

LISON, L. & MUTSAARS, W. Metachromasy of nucleic acids. *Quart.J.Microsc.Sci.*, 91 : 309-13, 1950.

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

MELLO, M.L.S. Estudo citofísico e citoquímico de algumas hetero- e eucromatinas. Campinas, 1976. 205p. Dissertação (Livro Docência). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

MELLO, M.L.S. Dados citoquímicos sobre as histonas de heterocromatinas e eucromatinas de *Triatoma infestans* Klug. *Rev.bras.Pesq.med.Biol.*, 10 : 305-9, 1977.

MELLO, M.L.S. Feulgen-DNA absorption spectrum of euchromatin and constitutive heterochromatin. *J.Histochem.Cytochem.*, 26 : 1082-86, 1978a.

MELLO, M.L.S. Heterocromatina. *Ciênc.Cult.*, São Paulo, 30 : 290-303, 1978b.

MELLO, M.L.S. Patters of lability towards acid hydrolysis in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. *Cell.molec.Biol.*, 24 : 1-16, 1979

MELLO, M.L.S. Feulgen-DNA absorption curves of polytene chromosome regions of *Rhynchosciara americana*. *Histochem.J.*, 12 : 499-511, 1980a.

MELLO, M.L.S. Toluidine blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. *Histochemistry*, 69 : 181-7, 1980b.

MELLO, M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *Histochem.J.*, 15 : 739-51, 1983.

MELLO, M.L.S. Different affinity for clupein in heterochromatin of *Triatoma infestans*. *Rev.bras.Genet.*, 8 : 755-8, 1985.

MELLO, M.L.S. Nuclear fusion and heterochromatin unravelling in response to starvation in *Triatoma infestans*. 1987. (in press).

MELLO, M.L.S.; DOLDER, H. & VIDAL, B.C. Alterações ultra-estruturais em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetidos a jejum. Colóquio Brasil .Micr. Eletr., 8, Rio de Janeiro. Resumos, p.26, 1981.

MELLO, M.L.S.; PRETTI, M.C.M. & ZANARDI, V.A. The connective tissue layer of the Malpighian tubes of some blood-sucking bugs: basophilia and histophysical aspects. *Studia Entomol.* 16: 511-22, 1973.

MELLO, M.L.S. & RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in starving blood-sucking Hemipteran. *Rev.Micr.Eletr.*, 5 : 298, 1978.

MELLO, M.L.S. & RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a blood-sucking Hemipterans. *Cytologia*, 45 : 203-9, 1980.

MELLO, M.L.S. & RECCO-PIMENTEL, S.M. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromosomes of malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. *Cytobios*, 52 : 175-184, 1987.

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

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

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Acid lability of deoxyribonucleic acids of some polytene chromosomes regions of *Rhynchosciara americana*. *Chromosoma*, 81 : 419-29, 1980b.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Critical electrolyte concentration of hetero- and euchromatin in *Triatoma infestans*. 1987 (in press).

MITEVA, N. & DIMOVSKA, A. Cytological aspects of the hepatocytes of rats in starvation and long term hyperthermic conditions. *Acta Anat.*, 130 : 64, 1987.

MITTERMAYER, C.; MADREITER, H.; LEDERER, B. & SANDRITTER, W. Differential acid hidrolisis of euchromatin and heterochromatin (biochemical, histochemical and morphological studies). *Beitr. Path.*, 134 : 157-71, 1971.

MIURA, A. & OHBA, Y. Structure of nucleohistone. III. Interaction with toluidine blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 145 : 436-45, 1967.

MÓDIS, L. Topo-optical investigations of mucopolysaccharides (acid glycosaminoglycans). In: GRAUMANN, W. & NEUMANN, K., *Handbuch der Histochemie*, Stuttgart, Gustav Fisher Verlag, 1974. v.2., Part 4, p.1-170.

OUDET, P.; CROSS-BELARD, M. & CHAMBON, P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 4 : 281-300, 1975.

PALLOTA, D.; BERLOWITS, L. & RODRIGUES, C. Histones of genetically active and inactive chromatin in mealy bugs. *Exp.Cell.Res.*, 68 : 747, 1970.

PARDUE, M.L. & GALL, J.C. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168 : 1356-8, 1970.

PIMENTEL, E.R. Fração rica em histona H5 : isolamento, caracterização, orientação macromolecular e interação com o DNA. Campinas, 1983. 100p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

RANDI, M.A.F. & MELLO, M.L.S. Variação na concentração eletrolítica crítica nuclear de *Triatoma infestans* induzida por cobre. 1987. (in press).

RATCLIFFE, N.A. & KING, P.E. The effects of starvation on the fine structure of the venom systems in *Nasonia vitripennis*. *Insect. Physiol.*, 16 : 885-903, 1970.

RECCO-PIMENTEL, S.M. & MELLO, M.L.S. Toluidina blue binding affinity and Feulgen-DNA spectrum of euchromatin and β -heterochromatin of *Drosophyla nebulosa*. *Rev.bras.Biol.*, 44 : 25-9, 1984.

ROSSO, P. & WINICK, M. Effects of early undernutrition and subsequent refeeding on alkaline ribonuclease activity of rat cerebellum and liver. *J.Nutr.* , 105 : 1104-10, 1975.

SAHEBJAMI, H. & MACGEE, J. Effects of starvation on lung mechanics and biochemistry in young and old rats. *J.Appl.Physiol.*, 58 : 778-84, 1985.

SANDRITTER, W.; KIEFER, C.; SALM, R.; MOORE, C.W.; GRIM, H. & KIEFER, R. DNA in heterochromatin: cytophotometric pattern recognition image analysis among cell nuclei in duct epithelium and carcinoma of human breast. *Beitr.Path.*, 151 : 87-96, 1974.

SCARRER, B. Ultrastructural studies of the regressing prothoracic glands of blattarian insects. *Z.Zellforsch.*, 61 : 1-21, 1965.

SCHAIM, R.J.; WATANABE, K. & HAREL, S. Effects of brief postnatal fasting upon brain development of rabbits. *Pediatrics*, 51 : 240-50, 1973.

SCOTT, J.E. Aliphatic ammonium salts in assay of acidic polysaccharides from tissues. *Meth.biochem.Analysis*, 8 : 145-197, 1960.

SCOTT, J.E. The fractionation of polyanions by long chain aliphatic ammonium salts. *Biochem.J.*, 78 : 4, 1961.

SCOTT, J.E. The precipitation of polyanions by long chain aliphatic ammonium salts, part VI. The affinity of substituted ammonium cation groups of some biological polymers. *Biochem.J.*, 84 : 270-5, 1962.

SCOTT, J.E. A new classification of cation dyes based on their affinity for ionized groups of polyanions. *Proc.Biochem. Soc.*, 4: 3-4, 1966.

SCOTT, J.E. On the mechanisms of the methyl green-pyronin stain for nucleic acids. *Histochemie*, 9 : 30-47, 1967.

SCOTT, J.E. Patterns of specificity on the interaction of organic cations with acid mucopolysaccharides. In: QUINTARELLI, C. *The Chemical Physiology of Mucopolysaccharides*, Boston, Little Brown, 1968, v.2, p.219-231.

SCOTT, J.E. Critical electrolyte concentration (CEC) effects in interaction between acid glycosaminoglycans and organic cations and polycations. In: BALALZS, E.A. *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*, London, Academic Press, 1970. v.2, p.1105-1119.

SCOTT, J.E. Histochemistry of alcian blue. III. The molecular biological basis of staining by alcian blue 8GX and analogous phthalocyanins. *Histochemie*, 32 : 191-212, 1972.

SCOTT, J.E. Affinity, competition and specific interaction in the biochemistry of polyelectrolytes. *Biochem.Soc. Trans.*, 1 : 787-860, 1973.

SCOTT, J.E. & DORLING, J. Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. *Histochemie*, 5 : 221, 1965.

SCOTT, J.E.; DORLING, J. & QUINTARELLI, G. Differential staining of acid glycosaminoglycans by alcian blue in salt solutions. *Biochem.J.*, 90 : 4-5, 1964.

SCOTT, J.E. & STOCKWELL, R.A. On the use and abuse of the critical electrolyte concentration approach to the localization of tissue polyanions. *J.Histochem.Cytochem.*, 15 : 111-3, 1967.

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

SIMÕES, L.C.C. & CESTARI, A.N. Cromossomos politênicos-Sistemas experimentais *in vivo e in vitro*. *Ciênc.Cult.*, São Paulo, 34 : 480-85, 1982.

SIMONI, I.C. & MELLO, M.L.S. Investigation of hycanthone binding to DNA in chromatin with different supra-organization, composition and function. *Acta Histochem.*, 79 : 97-105, 1986.

SRIVASTAVA, S.U. Nucleic acid and protein metabolism in undernutrition and protein deficiency. *Prog.Food Nutr.Sci.*, 9 : 63-107, 1985.

SRIVASTAVA, S.U. & TANG, T.U. Synthèse des protéines et d'ARN dans l'omogénat et diverses fractions cellulaires du cerveau des rats sous alimentés. *Ann.ACFAS.*, 46 : 140, 1979.

SRIVASTAVA, S.U. & OMOLOKO, C. Metabolism of adenine nucleotide, nucleic acids and proteins in liver, brain and kidney of undernourished female rats. *Nutr.Rep.Inter.*, 23 : 1021-34, 1981.

STOKWELL, R.A. & SCOTT, J.E. Distribution of glycosaminoglycans in human articular cartilage. *Nature*, 215 : 1376-77, 1977.

STORCH, V. & LEHNERT-MORITZ, K. The effects of starvation on the hepatopancreas of the isopod *Ligia oceanica*. *Zool.Anz.*, 24 : 137-46, 1980.

Thimic function in malnutrition. *Nutr.Rev.*, 32 : 180-2, 1974.

TOEPFER, K. Die Thiazinfarbstoffe. *Progr.Histochem.Cytochem.*, 1 : 277-354, 1970.

VIDAL, B.C. Doppelbrechungsdispersion und Linear Dichroismus von Eu- und Heterochromatin nach Färbung mit Toluidinblau nachweis eines Cotton Effets. *Beitr.Path.*, 145 : 269-85, 1972.

VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification . Microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell.molec.Biol.*, 22 : 45-64, 1977.

VIDAL, B.C. The effects of clupein on anisotropy and basophilia of polytene chromosomes. *Histochemistry*, 60 : 309-16, 1979.

VIDAL, B.C. Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. *Biologia Celular*. São Paulo, Atheneu, 1987. p.5-40.

VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes *in vitro*. 1987. (in press).

VIDAL, B.C. & PIMENTEL, E.R. DNA strand separation in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. In: International Histochemistry and Cytochemistry Congress, 6, Brighton, Inglaterra, 1980.

YUNIS, J.J. & YASMINEH, W.G. Heterochromatin, DNA and cell function. *Science*, 174 : 1200-9, 1971.

WIGGLESWORTH, V.B. Cytological changes in the fat body of *Rhodnius* during starvation, feeding and oxygen want. *J.Cell.Sci.*, 2 : 243-56, 1967a.

WIGGLESWORTH, V.B. Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of *Rhodnius* (Hemiptera). *J.Cell.Sci.*, 2 : 603-16, 1967b.

WIGGLESWORTH, V.B. Fine structure changes in the fat body cells of *Rhodnius* (Hemiptera) during extreme starvation and recovery. *J.Cell.Sci.*, 53 : 337-46, 1982.

WINICK, W.; BRASSEL, J.A. & ROSSO, P. Nutrition and Cell growth. In: WINICK, M. *Nutritional and development*. New York, John Willey & Sons, 1978. p.49-97.

ZAMENHOF, S.; VAN-MARTHENS, E. & MARGOLIS, F.L. DNA (cell number) and protein in neonatal brain. Alteration by maternal dietary protein restriction. *Nutr.Metab.* , 14 : 62-70, 1972.

ZEMAN, F.J. Effects on the young rat of maternal restriction. *J.Nutr.* , 93 : 167-73, 1967.