

FLÁVIA SALDANHA KUBRUSLY

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida
a 28.06.84 e aprovada pela
Comissão Julgadora com con-
ceito A.

16.07.84

Alfello

AÇÃO DE COBRE E MERCÚRIO SOBRE ESTRUTURA NUCLEAR E

ATIVIDADE DE ALGUNS SISTEMAS ENZIMÁTICOS EM

Triatoma infestans KLUG

Dissertação de Mestrado apresenta-
da ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre
em Biologia - Área Biologia Celu-
lar

Orientadora: Profa.Dra. MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO

CAMPINAS
1984

A meus pais e

Violêta e Márcia

AGRADECIMENTOS

À Profa.Dra. Maria Luiza Silveira Mello pela orientação segura, objetiva e amiga, que permitiu a realização deste trabalho, não poupando esforços para criar as condições necessárias para seu desenvolvimento.

Aos Profs.Drs. Dejanira Francheschi De Angelis, Marina Staurengo da Cunha, Edson Rosa Pimentel e Hiroshi Aoyama pelas sugestões e críticas do manuscrito desta tese.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular da UNICAMP pelos valiosos ensinamentos, dedicação e perseverança na pesquisa científica.

Aos docentes e técnicos do Departamento de Biologia Celular e Centro de Microscopia Eletrônica da UNICAMP pelo convívio amigável e competente assessoria técnica e científica.

Às caras amigas da Seção de Biologia Celular, do Instituto Biológico de São Paulo pelo apoio e contribuição na minha formação profissional desde o início e também neste trabalho, em especial à Dra. Ignez Koseki, responsável pela minha iniciação científica.

À Seção de Fotomicrografia do Instituto Biológico de São Paulo pelo apoio técnico prestado na execução das fotos apresentadas nesta tese.

À SUCEN, na pessoa do Sr. Antenor Nascimento Ferraz Filho pela valiosa colaboração no fornecimento dos insetos utilizados neste trabalho.

Ao Prof.Dr. Nazzareno Ballatori pela doação do cloreto de metil-mercúrio.

Ao Prof.Dr. Anibal Vercesi pela doação do succinato de potássio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha família e amigos pela compreensão, colaboração, estímulo e amizade.

ÍNDICE

	PÁG.
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL	8
3. MÉTODOS	9
3.1. Fornecimento dos íons metálicos	9
3.2. Determinação de fenótipos nucleares	10
3.2.1. Banda C	11
3.2.2. Reação de Feulgen	11
3.2.3. Microscopia eletrônica	12
3.3. Pesquisa de algumas enzimas a nível cito- químico	12
3.3.1. Adenosina trifosfatase dependentes de Mg^{2+} (ATPases- Mg^{2+})	12
3.3.2. Fosfatases ácidas	14
3.3.3. Desidrogenases succínicas (SDH)	15
4. RESULTADOS	17
4.1. Fenótipos nucleares	18
4.1.1. Caracterização morfológica	18
4.1.2. Frequência de fenótipos nucleares após exposição aos íons de cobre e mercúrio	25
4.2. Resultados aos testes citoquímicos para algumas enzimas	27
4.2.1. Adenosina trifosfatases dependentes de Mg^{2+} (ATPases- Mg^{2+})	27

	PÁG.
4.2.2. Fosfatases ácidas	31
4.2.3. Desidrogenases succínicas	37
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	55
7. SUMÁRIO	57
SUMMARY	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

A poluição por metais pesados constitui um dos grandes problemas com que se deparam os estudiosos do meio ambiente em todo o mundo. O uso indiscriminado destes metais, em vários processos agrícolas, industriais e mesmo domésticos, introzuidos pelo homem, tem gerado níveis alarmantes destes contaminantes metálicos no meio ambiente.

Num exemplo, LACERDA (1982) relata que este tipo de poluição altera drasticamente comunidades naturais de plantas que crescem em áreas industrializadas, conduzindo a um selecionamento de espécies que acabam por tornar-se boas indicadoras desta poluição.

É então extremamente importante que se procure avaliar a importância toxicológica e ecotoxicológica dessas substâncias que ameaçam os recursos naturais e a sobrevivência dos organismos, através de estudos com os mais variados enfoques dentro desta problemática.

Assim, TOMMASI (1982) descreve a ocorrência de teores elevados de cádmio, cobre, chumbo, mercúrio e zinco nas vísceras e outros órgãos de organismos marinhos, típicos da dieta alimentar humana (peixes, ostras, mariscos, siris), provenientes de diferentes localidades brasileiras. Estudos em peixes, do mar de Andamau, na Índia, demonstram que os metais pesados se concentram mais no fígado destes organismos (KUREISHY et alii, 1981). Para o peixe marinho Fundulus heteroclitus observou-se resposta teratogênica na forma de três tipos de malformações quando seus ovos eclodiram em áreas altamente poluídas por metilmercúrio (WEIS et alii, 1981).

Este mesmo organismo e outras espécies de peixes marinhos têm seu transporte de aminoácidos comprometido na presença deste poluente (SOCCI et alii, 1982). Para o peixe marinho Boleophthalmus dussumieri, foram detectadas aberrações cromossômicas após exposição à mitomicina C e aos metais pesados (KRISHNAJA & REGE, 1982).

Os metais pesados (cádmio, cobre, mercúrio e zinco) perturbam a estrutura, função e desempenho das hemocianinas dos artrópodos Limulus polyphemus e Callinectes sapidus e do molusco Busycon carica (BROUWER et alii, 1982). Qualquer um desses metais pode induzir uma auto-associação indefinida com as proteínas transportadoras de oxigênio, ocasionando decréscimo na capacidade de ligação do pigmento respiratório ao oxigênio. Também a exposição a concentrações tóxicas de íons cobre no molusco Biomphalaria glabrata causa uma baixa significativa na taxa de consumo de oxigênio, chegando à letalidade. Neste exemplo, o cobre, na forma de sulfato de cobre, vem sendo usado há mais de cinquenta anos nas tentativas de controle das espécies da Biomphalaria, hospedeiras intermediárias do Schistosoma mansoni (SULLIVAN & CHENG, 1975).

Em aves marinhas, o acúmulo de metais pesados e selênio está relacionado com o comportamento alimentar e extensão da contaminação do habitat (HUTTON, 1981).

Os efeitos dos metais pesados, principalmente na forma de metilmercúrio, nos mamíferos podem ser neurotóxicos (ABDELFATTAH & SHAMOO, 1981; MAGOS et alii, 1981; MURTHY et alii, 1981), embriotóxicos (MATSUMOTO & SPINDLE, 1982) ou teratogênicos (BURBACHER et alii, 1980; HIRATA et alii, 1980; JACQUET & LÉONARD, 1980) dependendo sobretudo da concentração

do metal, das diferentes espécies consideradas e do modo de exposição ao composto. Descrevem-se também, nesse contexto, efeitos nefrotóxicos relacionados com a reabsorção dos amino ácidos (FOULKES & BLANCK, 1982), além de sérios prejuízos no sistema endócrino (KAWADA et alii, 1981).

Neste sentido, outros estudos mostram que provavel mente a maior parte dos efeitos tóxicos dos metais pesados, destacados para os mamíferos, comprometendo principalmente o funcionamento dos sistemas nervosos, renal, hepático e endócrino, estejam relacionados com o fato destes metais alterarem drasticamente a atividade enzimática nos vários tecidos animais (MITCHELL et alii, 1980; CARLSSON & ERNSTER, 1981; KAWADA et alii, 1981; KUMAKAWA et alii, 1981; MACARTNEY & TSCHESCHE, 1981; SAUVÉ & NICHOOOLS, 1981; TSUZUKI, 1981; CÉSAR et alii, 1982; MINAMI et alii, 1982).

Além disso, nos mamíferos, tem sido demonstrado que os metais pesados (Cu, Zn, Hg, Cd, Pb, Ag) são excretados na bile, formando compostos estáveis com a glutatona (presente na bile), tendo este complexo uma importante função na detoxicação dos metais (ALEXANDER et alii, 1980; BALLATORI & CLARKSON, 1982a,b). Também como prováveis agentes detoxificantes, para os metais pesados, acham-se descritas, as metalo tioneínas, proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína e isoladas de diferentes espécies animais a partir do rim e do fígado. São induzidas nos tecidos e em células cultivadas in vitro pelos catíons Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} e Ag^{+} (ODOM & BRADY, 1980; HAYASHI & MIKAMI, 1981; WINGE et alii, 1981; GELLER & WINGE, 1982; PLONKA & METODIEWA, 1982).

A saúde humana afetada pela poluição por metais pesados é questão de prioridade desde o envenenamento em massa no Japão nos anos 50, quando descreveu-se a Doença de Minamata, entre a população que se alimentava de produtos marinhos, provenientes dessa baía (TAKEUCHI, 1957; TAKEUCHI et alii, 1957). Não sendo um problema estritamente local, posteriormente foram descritos em escala epidemiológica, os envenenamentos ocorridos no Iraque, Paquistão, Guatemala e no distrito de Niigata, Japão (YIP & CHANG, 1980). Um estudo epidemiológico recente no Canadá evidencia uma forma endêmica de envenenamento por metilmercúrio numa tribo indígena que consome peixe com elevado teor de mercúrio (MEHRA & CHOI, 1981). Os sintomas de envenenamento por metilmercúrio são diversos, tais como, cegueira, surdez, perda da coordenação motora, loucura e morte. Há variações na sensibilidade dos indivíduos à exposição ao metilmercúrio (GRAS & MONDAIN, 1981). Pelo fato da saúde humana ser questão de prioridade, os inúmeros estudos que permitam a extrapolação dos dados para o ser humano ficam, portanto, plenamente justificados.

Embora a ação tóxica dos metais pesados venha sendo bastante estudada nos animais e no homem, pouco se conhece a respeito da ação destes ao nível celular. Algumas alterações celulares, por ação destes, já relatadas, foram as descritas por NAKAZAWA et alii (1975) para uma linhagem celular de camundongo. No caso, foram detectados: retardamento da multiplicação celular, morte celular, inibição da incorporação das bases nitrogenadas e cisões numa das fitas do DNA. Também efeitos tóxicos no processo da divisão celular foram observados em células de Elodea densa (CZUBA & MORTIMER, 1981) e em

células de mamíferos (KHERA, 1979). Já, YIP & CHANG (1981) descreveram a vulnerabilidade dos neurônios e fibras nervosas aos metais pesados. Mesmo a ovulação pode ser inibida por eles (WATANABE et alii, 1982). O efeito de alguns metais pesados, principalmente o cobre, como agentes espermicidas, foi descrito por HOLLAND & WHITL (1982) como alterando irreversivelmente a motilidade dos espermatozoides. O efeito do metilmercúrio nos blastocistos é bem mais severo do que no estágio de mórula (MATSUMOTO & SPINDLE, 1982). O cobre ocasiona uma rápida hemólise dos eritrócitos pela ação deletéria na morfologia e nas funções do plasmalema (LOVSTAD, 1982). KIRSCHBAUM (1982) descreve a aglutinação das membranas do bordo estriado de células renais pelos metais pesados, semelhante a observada com o uso de lectinas. Em células do túbulo renal proximal, sob ação do metilmercúrio, o aumento do volume celular, acompanhado de ruptura da membrana plasmática e de alteração mitocondrial são características tardias na necrose celular (GANOTE et alii, 1979 - Apud CÉSAR et alii, 1982).

Menos frequentes ainda são os trabalhos referentes à ação de metais pesados a nível do núcleo celular. Entre estes, HAYASHI & MIKAMI (1981) descrevem a inibição da síntese de RNA pelos metais pesados bem como a supressão desse fenômeno em núcleos de células de rato. A partir de núcleos isolados do timo de bezerro, GRUENWEDEL (1982) demonstrou mudanças nas interações histona-histona no "core" nucleossômico pela ação do metilmercúrio. Além disso, RAMANUJAM & PRASAD (1979) observaram alterações na expressão gênica após tratamento crônico (40 dias) com metilmercúrio em núcleos de células de glioma de rato. Com relação a núcleos metafásicos, é sabido serem os metais pesados capazes da indução de aberrações

cromossômicas, como já mencionado para o peixe Boleophthalmus dussumieri (KRISHNAJA & REGE, 1982) como também em células de mamíferos (WATANABE et alii, 1982) incluindo células humanas de indivíduos expostos ocupacionalmente aos metais (POPESCU et alii, 1979).

Em insetos, estudos preliminares demonstraram acúmulo de metais pesados principalmente nos tecidos dos adultos, seguidos pelos das pupas e das larvas, para o himenóptero, Solenopsis invicta, Buren (LEVY et alii, 1974). Outros estudos mostraram que os metais pesados podem ser estocados ao nível de lisossomos em órgãos envolvidos no processo de regulação mineral nos himenópteros e dictiópteros (JEANTET et alii, 1977; 1980; BALLAN-DUFRANÇAIS et alii, 1980).

A bioacumulação mineral é um mecanismo da regulação iônica bem conhecido nos insetos. Logo, se estes animais conseguem estocar inclusive metais pesados tidos como tóxicos, pesquisar a resposta celular à poluição mineral nos mesmos, torna-se extremamente interessante, ainda mais por serem eles considerados prováveis "bioconcentradores" destes metais (JEANTET et alii, 1977).

Assim, no presente trabalho, a ação de cobre e mercúrio foi investigada em órgãos excretores (túbulos de Malpighi) de ninfas de 5º estadio do inseto Triatoma infestans Klug, nos quais objetivou-se detectar prováveis alterações a nível de estrutura nuclear e de atividade de alguns sistemas enzimáticos, induzidas por esses metais. Deve-se ressaltar que os túbulos de Malpighi nos insetos filtram a hemolinfa (WIGGLESWORTH, 1965) e como tal têm a oportunidade de entrar em contato direto com os metais poluentes que possam vir a cair na mesma.

Considerando-se que, conforme mencionado mais acima, alterações cromatínicas a nível nucleossômico (GRUENWEDEL, 1982) e gênico (RAMANUJAM & PRASAD, 1979) podem ser induzidas por metais pesados, é de se esperar que se expressem na compactação cromatínica e em sua distribuição no núcleo, gerando fenótipos nucleares alterados. Estes espelhariam modificações na própria fisiologia cromatínica e/ou refletiriam etapas de um processo de necrose celular. Em T. infestans, em particular, os fenótipos nucleares normais de alguns órgãos, como os túbulos de Malpighi, já se acham amplamente descritos (MELLO, 1971, 1975, 1978, 1983). Alterações nos mesmos, por outro lado, já foram encontradas sob "stress" fisiológico (MELLO, 1983; ANDRADE, 1984). Além disso, nos túbulos de Malpighi de T. infestans o padrão de distribuição de algumas enzimas, tais como Adenosina trifosfatases dependentes de Mg^{2+} (ATPases- Mg^{2+}), fosfatases ácidas e alcalinas, e desidrogenases succínicas, já foi descrito para condições fisiológicas normais (AZEREDO-OLIVEIRA, 1982).

2. MATERIAL

Foram utilizadas ninfas não infectadas de 5º estadio de T. infestans KLUG (Hemiptera, Reduviidae), provenientes do insetário da SUCEN de Moji-Guaçu (São Paulo). Os insetos usados eram recém-alimentados com sangue de galo.

A ação de íons cobre e mercúrio a nível celular foi investigada nos túbulos de Malpighi desses insetos.

3. MÉTODOS

3.1. Fornecimento dos íons metálicos

Para o fornecimento dos íons metálicos, dois procedimentos básicos foram utilizados: no primeiro, os túbulos de Malpighi, recém-removidos de insetos, dissecados empregando-se lupa estereoscópica Zeiss, foram incubados em solução de 0,7% de NaCl em água destilada, acrescida de 20% de soro fetal bovino (PIMPINELLI et alii, 1975) durante 30 segundos, 1 minuto e 20 minutos, sendo estes, os controles. Para os tratamentos experimentais, o procedimento foi o mesmo, porém a solução acima descrita continha 10^{-5} M (2,5 ppm) (DUSTIN, 1978) ou 2×10^{-5} M (5 ppm) de CuSO_4 ou 20 ppm ($7,8 \times 10^{-5}$ M) de CH_3HgCl (JEANTET et alii, 1980). Os tempos de incubação dos túbulos de Malpighi nas soluções contendo CuSO_4 foram de 30 segundos 1 minuto e 5 minutos e de 20 minutos nas soluções contendo CH_3HgCl . O segundo procedimento consistiu em se injetar soluções aquosas de CuSO_4 nas concentrações de 10^{-5} M (2,5 ppm) ou de 2×10^{-5} M (5 ppm), ou ainda soluções aquosas de CH_3HgCl na concentração de 40 ppm ($1,56 \times 10^{-4}$ M) na porção ventral dos espécimes, passando esse líquido para a hemolinfa. As seringas descartáveis utilizadas foram de marca Plastipak de 1 ml. A dose administrada foi 0,05 ml. Os espécimes injetados foram sacrificados após 1 hora, 2 horas e 24 horas, quando então os túbulos de Malpighi eram removidos. Foram utilizados nos experimentos apenas os insetos que não sofreram injúria mecânica aparente após a injeção, apresentando-se ileso. Neste procedimento, como controles para a pesquisa de fenótipos nucleares, foram utilizados espécimes injetados

apenas com água destilada e para a pesquisa da ação enzimática, os não injetados. Após os dois procedimentos, os túbulos de Malpighi foram distribuídos em lâminas para microscopia e preparados de acordo com o objetivo a que se destinavam.

3.2. Determinação de fenótipos nucleares

Com relação ao material incubado nas soluções contendo íons metálicos foram utilizados segmentos de órgãos de pe-lo menos 5 insetos para o estudo de fenótipos nucleares em cada condição experimental. No caso dos insetos injetados, 4 a 5 insetos tiveram seus túbulos de Malpighi integralmente re-movidos e distribuídos sobre várias lâminas, dado ao fato dos órgãos não caberem totalmente sobre uma única lâmina.

Esses fenótipos nucleares foram determinados nos tú-bulos de Malpighi tratados com os íons metálicos segundo os dois diferentes procedimentos descritos no item 3.1. A frequência de cada tipo nuclear, foi determinada apenas para os insetos injetados, dos quais houve possibilidade de remoção integral dos órgãos excretores, pois no caso do material incu-bado, o manuseio dos órgãos ocasionou perda de muitos segmentos dos mesmos. O cálculo da frequência foi feito a partir da contagem, ao microscópio binocular Zeiss com objetiva de 40x e ocular 8x, do número total de cada fenótipo nuclear ob-servado em relação ao número total de núcleos presentes nos túbulos de Malpighi de cada inseto.

Os fenótipos nucleares foram estudados em prepara-dos submetidos à técnica de Banda C, segundo a metodologia de SUMNER (1972), e à reação de Feulgen, em condições de hidrólise,

que propiciam máxima depuração (MELLO, 1983). Tais preparados haviam sido obtidos a partir dos túbulos de Malpighi fixados em uma gota de etanol-ácido acético na proporção de 3:1, por cerca de 2 minutos e a seguir expostas ao ar para secagem.

3.2.1. Banda C

A denaturação dos preparados foi feita em uma solução saturada de $\text{Ba}(\text{OH}_2)$, 5%, a 50°C por 90 segundos. Após isto, os preparados foram lavados delicadamente em água destilada e submetidos a tratamento em solução 2SSC (cloreto de sôdio 0,3 M e citrato de sôdio 0,03 M) por 4 horas e 30 minutos, a temperatura de 65°C , quando foram novamente lavados, secados ao ar, corados com uma solução de Giemsa (Merck) a pH 6,8-7,0, durante 10 minutos; diafanizados em xilol por 15 minutos montados em bálsamo do Canadá ($n_d = 1,54$) e analisados ao microscópio de luz.

3.2.2. Reação de Feulgen

A hidrólise dos preparados foi feita em HCl 4N a temperatura ambiente (24°C) durante 1 hora e 10 minutos. Após a hidrólise, estes foram lavados em água destilada várias vezes, corados com o Reativo de Schiff durante 40 minutos a mesma temperatura e submetidos a 3 banhos de 5 minutos cada, em água sulfurosa (metabissulfito de sôdio 10%, HCl 1 N e água destilada 1:1:18). Os preparados foram montados em bálsamo do Canadá, depois de terem sido lavados em água destilada por 2 minutos, desidratados em série etanólica e diafanizados em xilol. A análise foi feita ao microscópio de luz.

3.2.3. Microscopia eletrônica

Os túbulos de Malpighi após terem sido incubados por 5 minutos na solução contendo CuSO_4 nas concentrações de 10^{-5} M (2,5 ppm) onde 2×10^{-5} M (5 ppm) ou 20 minutos na solução contendo CH_3HgCl na concentração de 20 ppm ($7,8 \times 10^{-5}$ M) foram rapidamente lavados na solução controle (PIMPINELLI et alii, 1975), fixados em glutaraldeído a 3% (Merck) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 1 hora e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora. Depois de um banho em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 por cerca de 30 minutos, os preparados foram desidratados em série etanólica e óxido de propileno e incluídos em Epon 812. Os cortes ultrafinos de aproximadamente 60 a 80 nm de espessura foram obtidos em ultramicrotomo LKB, coletados em telas de cobre, 200 mesh, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao ME Zeiss 9S operado a 60 KV. Foram utilizados segmentos de órgãos de 5 espécimes. Foram processados da mesma maneira os túbulos incubados por 5 minutos e 20 minutos na solução controle.

3.3. Pesquisa de algumas enzimas a nível citoquímico

3.3.1. Adenosina trifosfatases dependentes de Mg^{2+} (ATPases- Mg^{2+})

As ATPases dependentes de Mg^{2+} a nível de microscopia de luz, foram pesquisadas empregando-se o método de SLATER (1958), modificado segundo WEGMANN & BANKOWSKI (1960, apud AZEREDO-OLIVEIRA, 1982). Nesta técnica, as ATPases dependentes de Mg^{2+} hidrolisam o substrato (ATP) ao redor do pH 9,4. Os íons fosfatos liberados, são precipitados na

forma de fosfato de cálcio nos sítios de atividade enzimática. Este último é convertido primeiro em fosfato de cobalto e num segundo passo, no sulfeto de cobalto. No meio de incubação, foi utilizado como agente "capturante", o cloreto de cálcio, e a seguir, como agentes de "conversão simultânea", o nitrato de cobalto e sulfeto de amônia, sendo o produto final da reação completamente insolúvel e de cor negra. Foram usados fragmentos de túbulos de Malpighi de 5 ninfas de 5º estadio, não fixados, porém previamente incubados por 5 minutos e 20 minutos nas soluções controle (PIMPINELLI et alii, 1975) e experimentais (CuSO_4 10^{-5} M (2,5 ppm), CuSO_4 2×10^{-5} M (5 ppm) e 20 ppm ($7,8 \times 10^{-5}$ M) CH_3HgCl) e rapidamente lavados em solução de Ringer (0,75 g de NaCl, 0,035 g de KCl, 0,021 g de cálcio, para 100 ml de H_2O destilada) para insetos antes de serem submetidos ao método para ATPases propriamente dito.

Neste estudo foi utilizada uma solução estoque composta de:

Cloreto de Potássio (Reagen).....	885 mg
Tris (hidroximetilaminometano) (Merck)	980 mg
Sacarose (Reagen, ACS)	225 mg
Cloreto de Magnésio (Reagen)	30 mg
Cloreto de Cálcio (Baker).....	3,96 mg
Água destilada	150 cc
pH	9,4

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 seguir homogeneizada e filtrada.

Os túbulos sobre lâminas foram incubados com e sem o substrato (ATP) durante 30 minutos a 37°C (PAUTRAT & BENKÖEL,

1977). A seguir, foram lavados em água destilada por 10 minutos e submetidos ao tratamento com nitrato de cobalto a 2% durante 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 dos preparados com água destilada, estes foram secos e montados em gelatina-glicerinada (BEHMER et alii, 1976).

3.3.2. Fosfatases ácidas

A técnica utilizada para a microscopia fotônica foi uma modificação da de GÔMORI, apud AZEREDO-OLIVEIRA (1982). Nesta técnica, a fosfatase ácida hidrolisa o glicerofosfato (substrato) ao redor do pH 5,0. Os íons fosfatos liberados são precipitados, nos sítios da atividade enzimática, na forma de fosfato de chumbo, uma vez que foi usado no meio de incubação junto com o substrato, o agente "capturante", nitrato de chumbo. O produto primário da reação (fosfato de chumbo) é então convertido em sulfeto de chumbo (marrom-enegrecido), altamente insolúvel em água e lípidos, pelo sulfeto de amônia (amarelo). Túbulos de Malpighi não fixados, removidos após 2 horas de injeção com as soluções de $\text{CuSO}_4 \cdot 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (5 ppm) e CH_3HgCl na concentração de 40 ppm ($1,56 \times 10^{-4} \text{ M}$) foram incubados em lâminas com substrato abaixo descrito durante 30 minutos a 37°C :

Tampão acetato 0,05 M (pH 5,0)

Beta-glicerofosfato de sódio (Merck) 0,36 g em 5 ml de
H₂O destilada

Nitrato de chumbo (Merck) 0,264 g em 200 ml de
tampão acetato

No preparo de substrato acima foi dada atenção especial à precipitação antecipada do nitrato de chumbo. Daí, a solução de Beta-glicerofosfato de sódio ter sido gotejada sob agitação constante, em um Erlenmeyer contendo a solução de nitrato de chumbo e tampão acetato. O substrato permaneceu em estufa a 37°C durante 12 horas, havendo então precipitação do nitrato de chumbo sendo filtrado antes do uso.

Após os 30 minutos de incubação nesse substrato, o material sobre lâminas foi lavado com água destilada e então mergulhado em sulfeto de amônia a 1%, recém-preparado, durante 1 minuto. Novamente os preparados foram lavados, secos e montados em gelatina-glicerina. Como controle da reação foi utilizado o meio incubador sem β -glicerofosfato, além do meio incubador completo acrescido de um inibidor, fluoreto de sódio 0,1 M.

Nesta pesquisa foram utilizados 9 espécimes, sendo 3 deles não injetados (controles).

3.3.3. Desidrogenases succínicas

A técnica utilizada foi introduzida por NACHLAS et alii (1957) e modificada por WEGMANN & TORDET-CARIDROIT (1960, apud AZEREDO-OLIVEIRA, 1982). Nesta técnica, na presença do substrato (succinato de potássio), a SDH reduz o NBT (um sal de ditetrazolium incolor) em cristais de formazanas, altamente insolúveis e coloridos (azul-profundo), que precipitam-se nos sítios de atividade enzimática. Este é o único sistema desidrogenásico demonstrável histoquimicamente que não necessita de nenhuma coenzima. O produto (fumarato) não inibe a reação e portanto nenhum agente "aprisionador" precisa ser empregado (PEARSE, 1961).

Túbulos de Malpighi não fixados, removidos dos insetos, após 2 horas de tratamento por injeção com as soluções de $\text{CuSO}_4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (2,5 ppm), $\text{CuSO}_4 \cdot 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (5 ppm) e CH_3HgCl na concentração de 40 ppm ($1,56 \times 10^{-4} \text{ M}$) foram incubados em lâminas durante 30 minutos em estufa a 37°C , num meio constituído de:

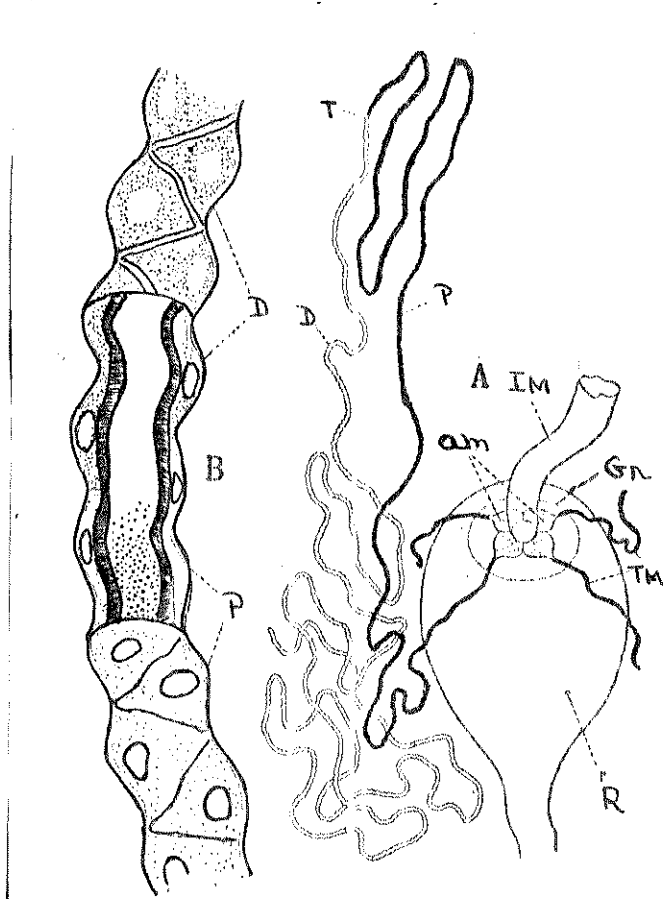
Succinato de Potássio 0,2 M.....	3 ml
NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma) 0,5 mg/ml.....	2 ml
Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4	3 ml

Os preparados foram então lavados em água destilada, passados por formol neutro a 10% (pH 7,0) por 5 minutos, relavados em água destilada e finalmente montados em gelatina-glicerina. Como controle da reação, utilizou-se incubação do material em meio sem substrato (succinato de potássio).

Nesta pesquisa foram utilizados 8 espécimes, sendo 2 deles não injetados.

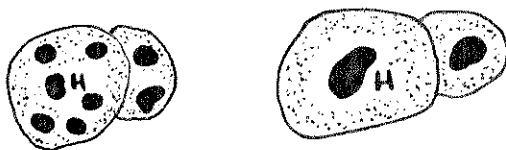
4. RESULTADOS

O Esquema I mostra aspectos de anatomia (A) e morfologia microscópica (B) dos túbulos de Malpighi de T. infestans observados em lupa estereoscópica (A) e microscópio de luz convencional (B). Os fenótipos nucleares normais encontrados estão representados no Esquema II.



Esquema I - A - Sistema excretor de triatomíneo. Somente 1 túbulo está sendo representado. B- Detalhe dos segmentos proximal (p) e distal (d) (Segundo WIGGLESWORTH, 1965). T = Região de transição (junção dos segmentos distal e proximal dos túbulos); IM = Intestino médio; Gr = Glândula retal; TM = Túbulo de Malpighi; R = Reto; am = Ampola.

Esquema I



Esquema II

Esquema II - (Segundo MELLO e DOLDER, 1977). H = Heterocromatina.

4.1. Fenótipos nucleares

4.1.1. Caracterização morfológica

As *Figuras* 1 a 12 representam os fenótipos nucleares encontrados nos preparados ao nível da microscopia de luz, obtidos a partir dos dois procedimentos experimentais básicos (incubação e injeção), durante o estudo da ação dos íons cobre nas concentrações de 10^{-5} M (2,5 ppm), 2×10^{-5} M (5 ppm) e íons mercúrio nas de 20 ppm ($7,8 \times 10^{-5}$ M) e 40 ppm ($1,56 \times 10^{-4}$ M). As *Figuras* 13 a 16 mostram aspectos ultraestruturais de alguns desses tipos.

Os vários fenótipos nucleares encontrados nos preparados ao nível da microscopia de luz apareceram após os procedimentos experimentais básicos. Foram observados oito tipos nucleares morfolologicamente distintos. De imediato, descreveu-se apenas as características morfológicas de cada tipo, sem relacioná-las com as condições experimentais e/ou exposição aos íons, bem como, com suas frequências relativas.

Morfolologicamente, o fenótipo tipo 1, é um núcleo arredondado ou elipsoidal, com apenas um cromocentro, também arredondado bem destacável, e com a eucromatina pulverizada e clara. Algumas vezes, os grânulos de eucromatina tornam-se grosseiros, contudo a delimitação entre os dois aspectos da cromatina é sempre muito bem visível. O corpo heterocromático neste tipo, tem uma aparente regularidade de tamanho e disposição cêntrica (Fig. 1).

O fenótipo tipo 2, apresenta-se como um núcleo semelhante em tamanho e forma ao tipo 1, apenas tendo dois cromocentros nítidos, geralmente bem próximos um do outro, sendo

que os dois corpos heterocromáticos podem diferir um do outro com relação ao tamanho. A eucromatina também apresenta granulação fina, clara, podendo no entanto tornar-se grosseira.

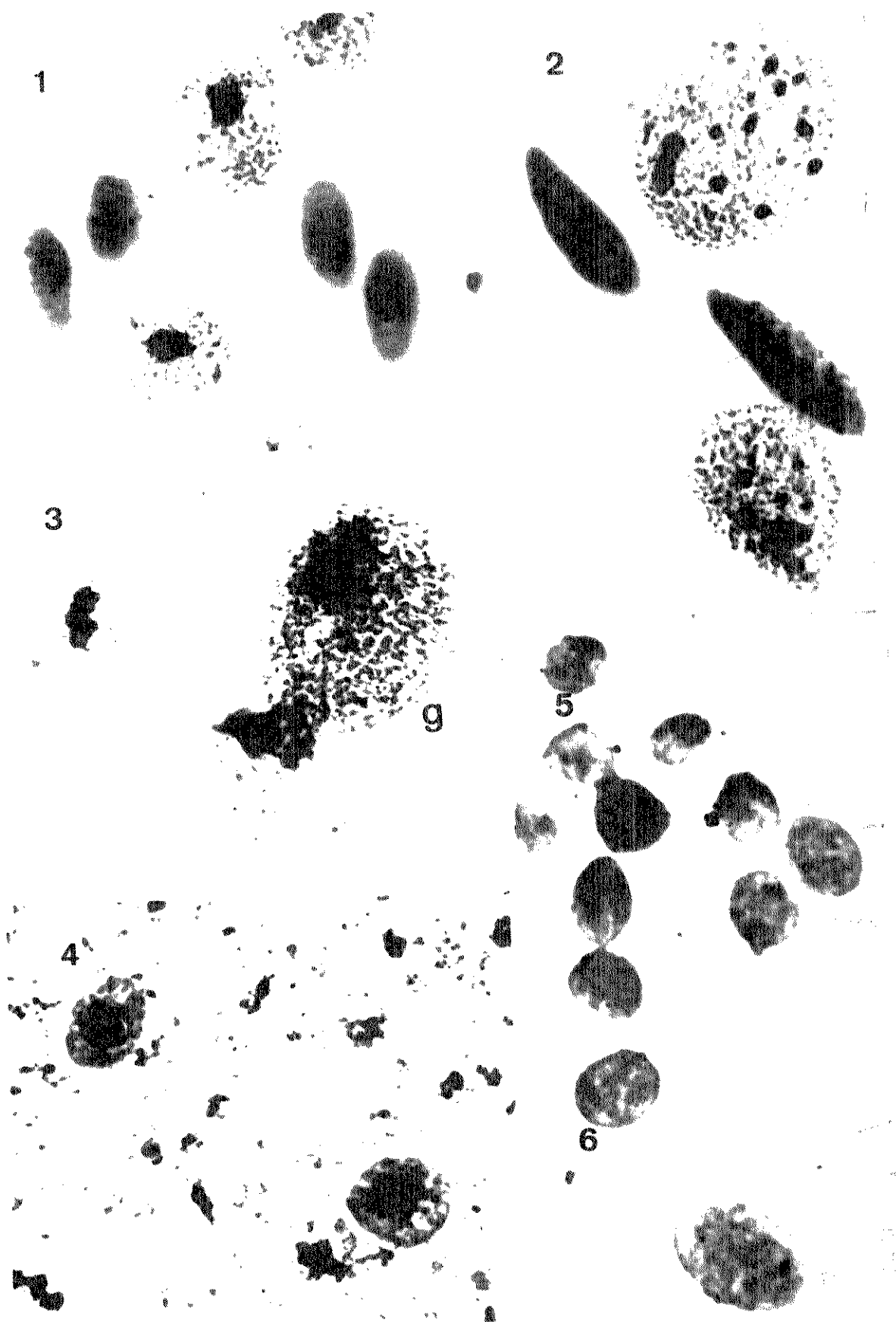
O fenótipo tipo 3, apresenta uma forma elipsoidal, ovalada ou mesmo irregular, com três, quatro ou mais corpúsculos heterocromáticos (Fig. 2). O tamanho é semelhante ao dos outros dois tipos.

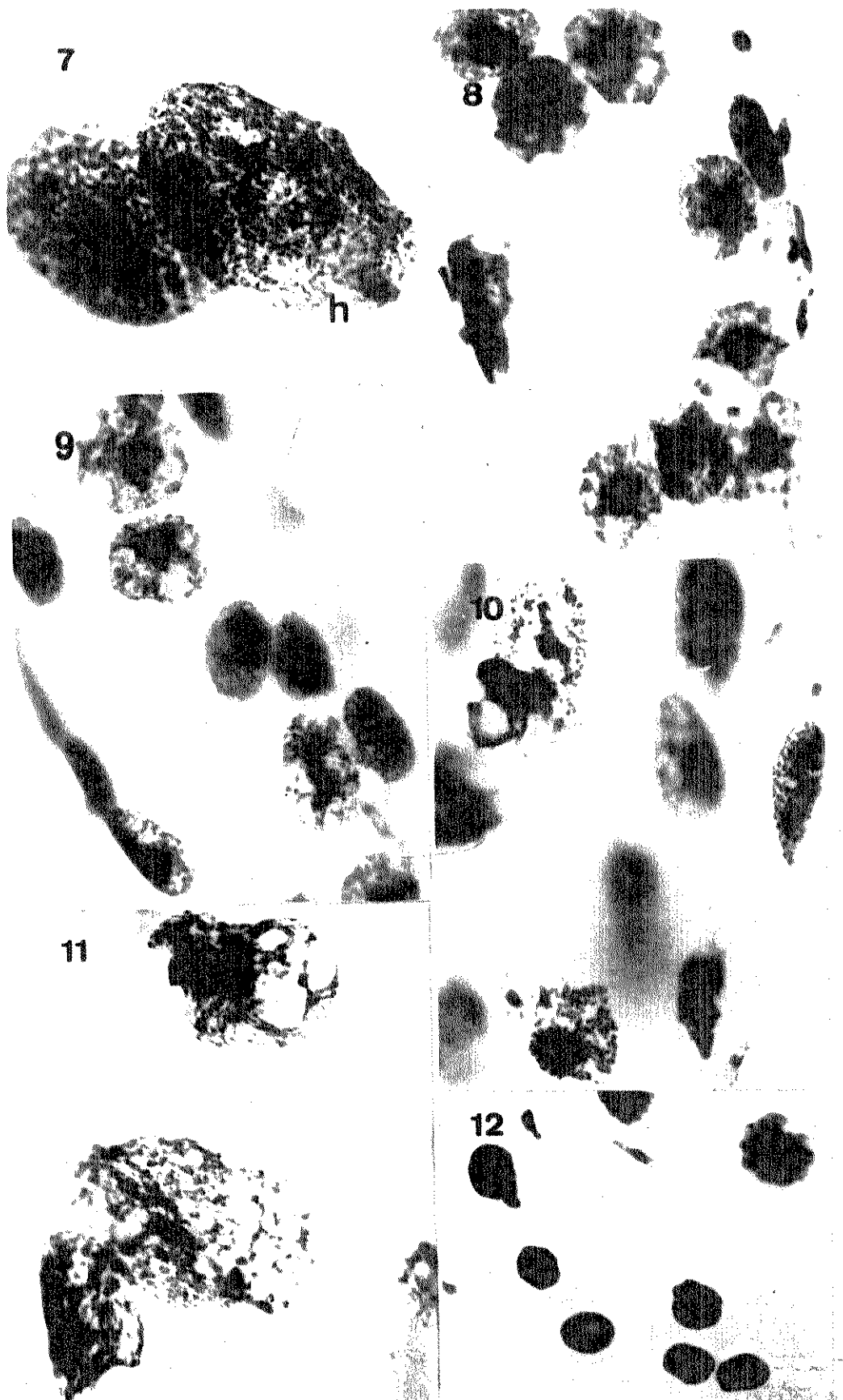
O tipo 4, tem como característica principal o grande tamanho, tendo sido denominado neste trabalho de "gigante". Com relação à presença de corpos heterocromáticos pode se apresentar semelhante tanto ao tipo 2 quanto ao tipo 3 (Fig. 3).

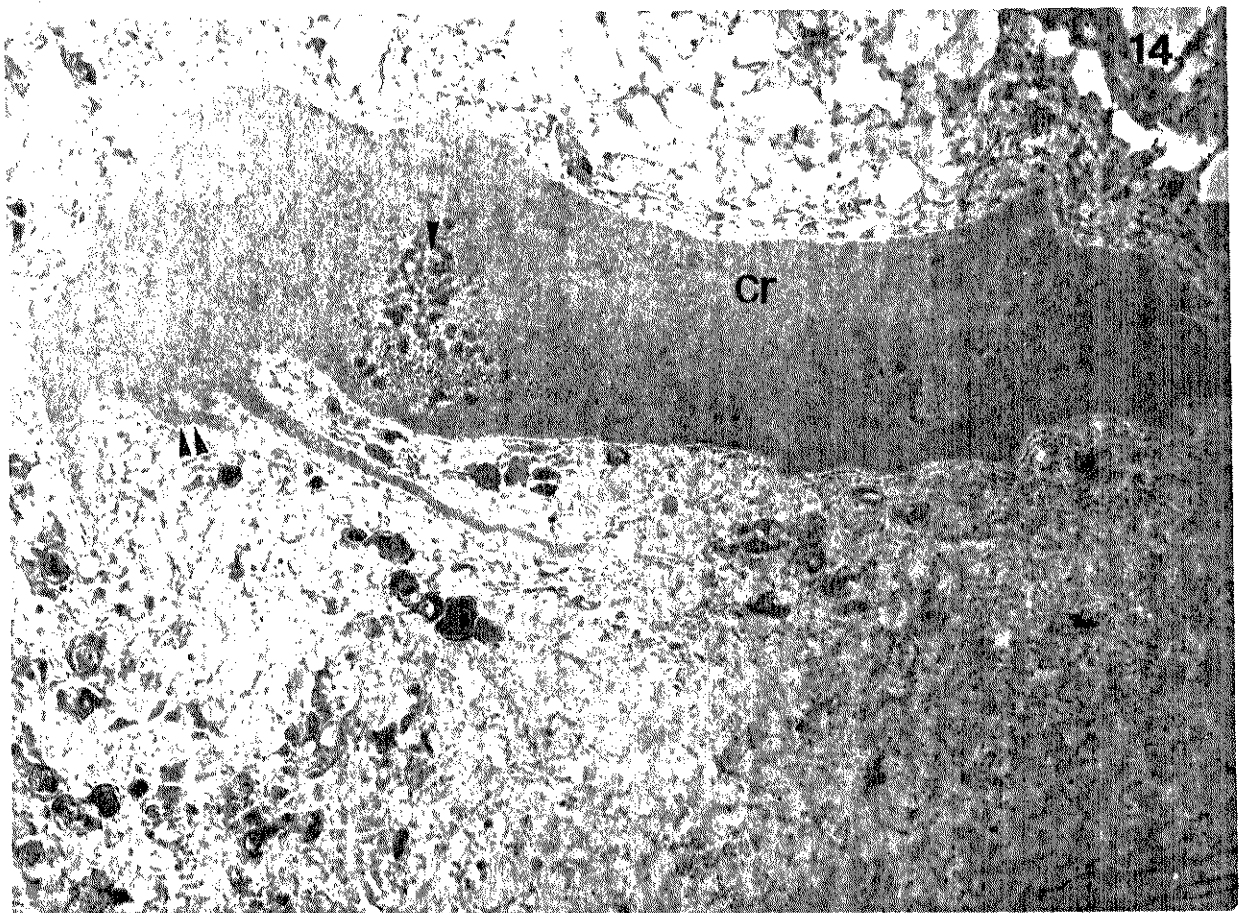
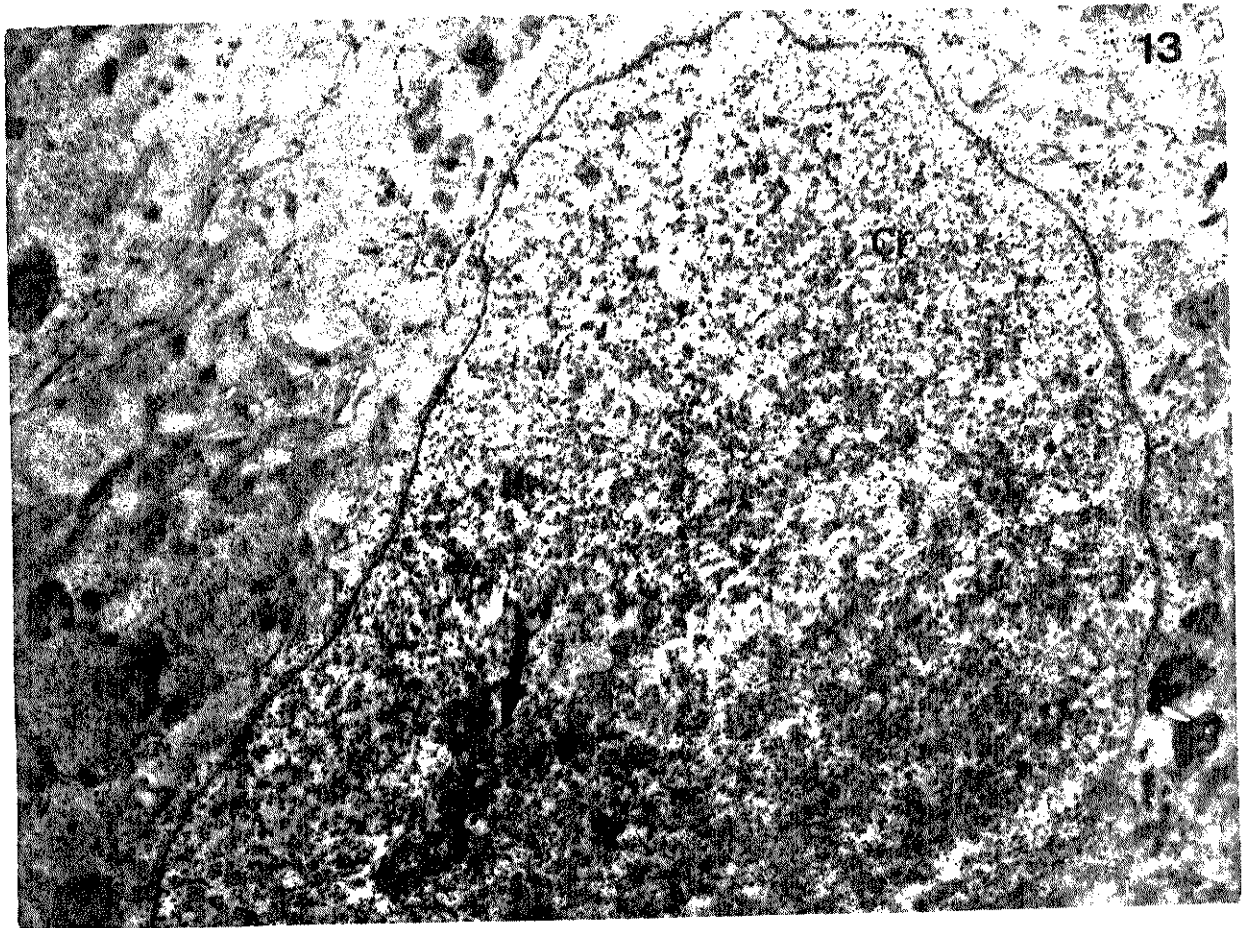
O fenótipo nuclear tipo 5 foi denominado "descompactado". Estes núcleos apresentam forma arredondada, tamanho semelhante ao dos tipos 1, 2 e 3, caracteriza-se por apresentar o cromocentro único sensivelmente dilatado e a eucromatina mais difusa (Fig. 4).

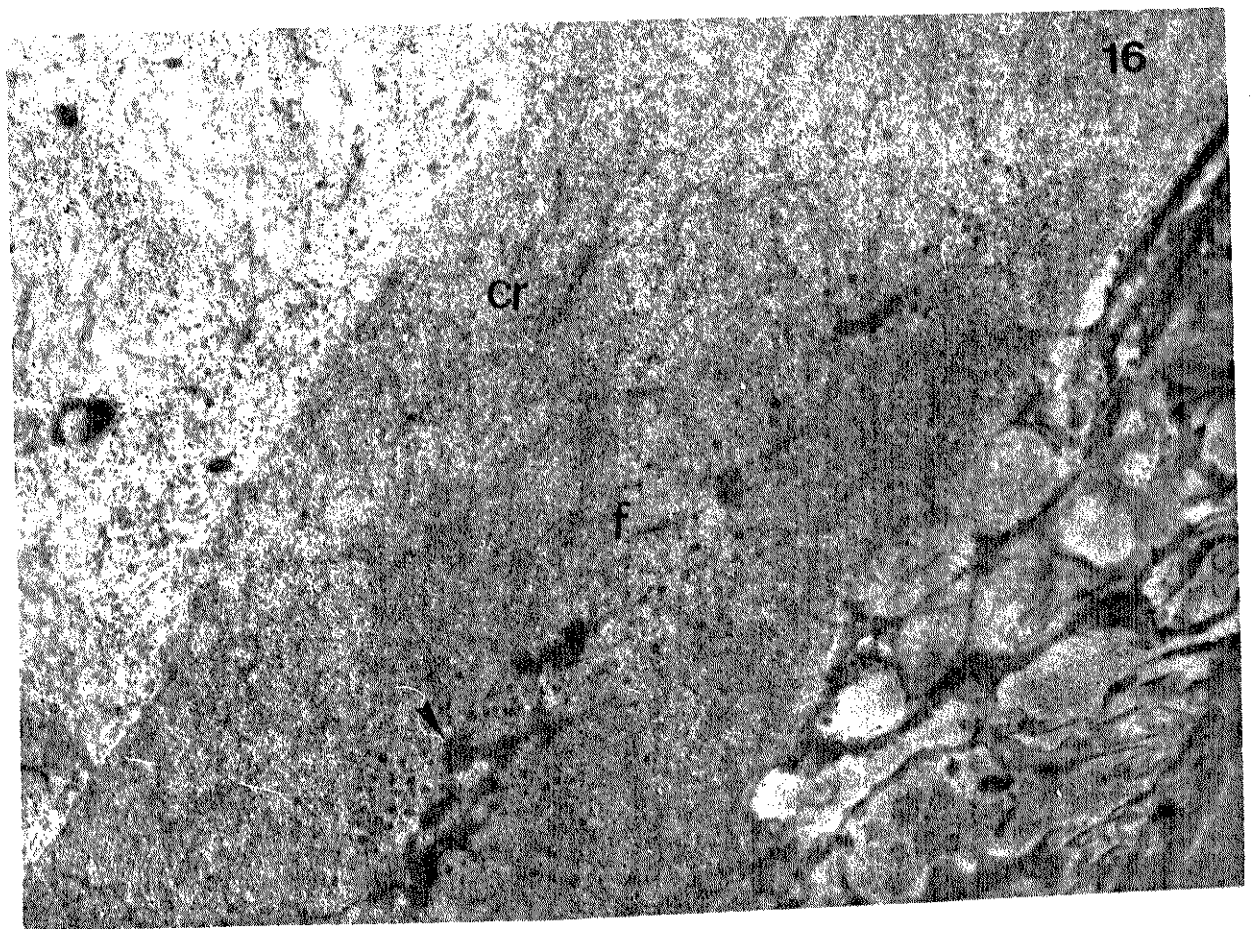
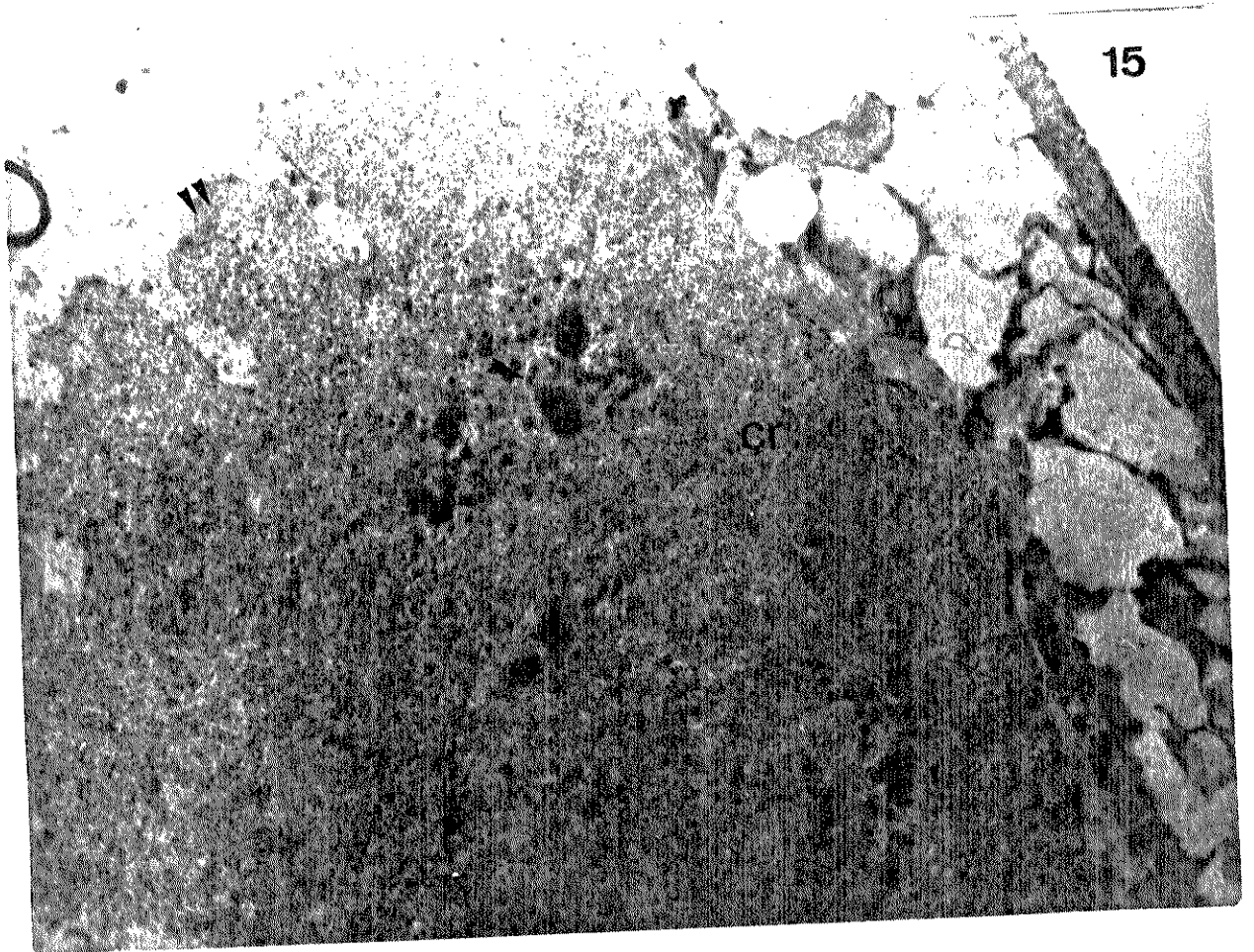
Já o tipo 6, mantém o tamanho dos fenótipos 1, 2, 3 e 5, porém, como o tipo 3, é geralmente ovalado. Foi denominado de "homogêneo", por não possibilitar distinção muito evidente entre hetero- e eucromatina, pela distribuição do material corado de forma homogênea e difusa após as duas técnicas citoquímicas utilizadas (Figs. 5 a 7).

A razoável descompactação da heterocromatina dos núcleos deste tipo pôde ser confirmada ao nível da microscopia eletrônica (Figs. 13 a 16). Em alguns casos o aspecto geral da cromatina apareceu bastante frouxo, com alguns poucos grupos de material eletrondenso, restos de heterocromatina compactada (Fig. 13). Este aspecto foi frequentemente encontrado no material tratado com a solução 10^{-5} M (2,5 ppm) de









cobre. Em outros casos, embora eletrólucida, a cromatina apareceu no geral mais homogeneamente distribuída, exibindo nítidas estruturas filamentosas e com poucos restos de heterocromatina compactada ao lado de granulação eletensa que lembra pericromatina (MELLO et alii, 1981) (Figs. 14 a 16). O contorno destes núcleos apareceu nesse nível bastante irregular (Figs. 14 e 15). Estes núcleos foram notados em todos os preparados experimentais examinados.

O fenótipo nuclear, tipo 7, foi denominado de "vacuolizado". Neste tipo, a desorganização do material cromatínico, gera alterações evidentes de forma e tamanho nucleares. A eucromatina pode apresentar-se fibrosa, com vacúolos e irregularmente distribuída; já a heterocromatina, quando evidente, pode estar dilatada, fragmentada ou com aspectos diversos (por exemplo, estrelada). É um tipo nuclear com "perfil" variado, de difícil caracterização, ao mesmo tempo em que é facilmente identificável. As Figuras 8 a 11 mostram perfis diferentes deste fenótipo nuclear onde se observam níveis gradativos de desorganização nuclear.

Finalmente, o fenótipo nuclear tipo 8, foi denominado "picnótico"; nele o material cromatínico contraiu-se, ocasionando diminuição do tamanho nuclear associado ao aparecimento de seu formato irregular. Apresenta-se intensamente corado (Fig. 12).

Apenas os fenótipos 1 a 3 são encontrados em material normal, não tratado por cobre e mercúrio. Eventualmente, os fenótipos 4 e 5 podem aparecer, com frequência muito baixa, em insetos controle. Estes fenótipos, no entanto, já foram constatados em T. infestans não tratados por esses íons, porém

submetidos a "stress" fisiológico, como o jejum (MELLO, 1983; ANDRADE, 1984).

4.1.2. Frequência de fenótipos nucleares após exposição aos íons de cobre e mercúrio

A *Tabela I* apresenta a frequência de fenótipos nucleares após 1, 2 e 24 horas dos diferentes tratamentos com os íons de cobre e mercúrio.

A análise mais imediata da mesma, evidencia claramente variações das frequências por indivíduos nos diferentes experimentos considerados, além das próprias alterações nas frequências devidas à ação desses íons.

Demonstrou-se que o tratamento com cobre e mercúrio altera a compactação e distribuição cromatínica não só pelo aparecimento, nos insetos tratados, de fenótipos nucleares não descritos para insetos sadios controles, mas também pelo sensível decréscimo na frequência total dos tipos 1, 2 e 3, que atingiu 27,3 a 84,0% contra 99,35% nos três insetos controle, injetados com água destilada. De modo geral, seja para tratamento com cobre (nas duas concentrações) ou mercúrio, e respeitadas as variações individuais, há diminuição na frequência dos fenótipos normais, com aumento do tempo de tratamento. Dos fenótipos introduzidos pelos tratamentos o mais representativo em termos de frequência percentual foi o tipo núcleos "vacuolizados". Também a frequência deste tipo, embora alta já após 1 hora de tratamento, aumentou com o passar do tempo. O fenótipo "descompactado" também apareceu com frequência alta. Há um ligeiro aumento da frequência deste fenótipo apenas no material tratado com mercúrio após duas horas de tratamento.

TABELA I. - Frequência dos diferentes Fenótipos Nucleares dos Túbulos de Malpighi de *Rattus norvegicus* após Tratamento com Cobre e Mercúrio

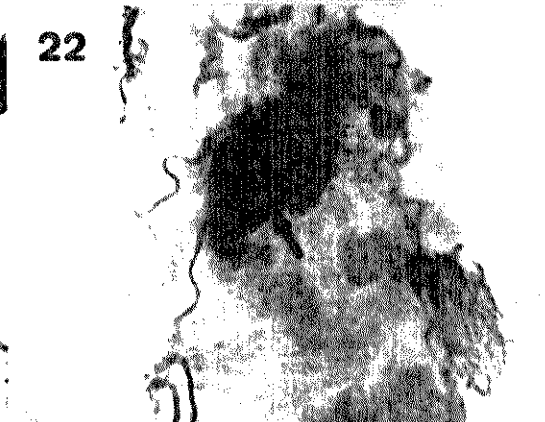
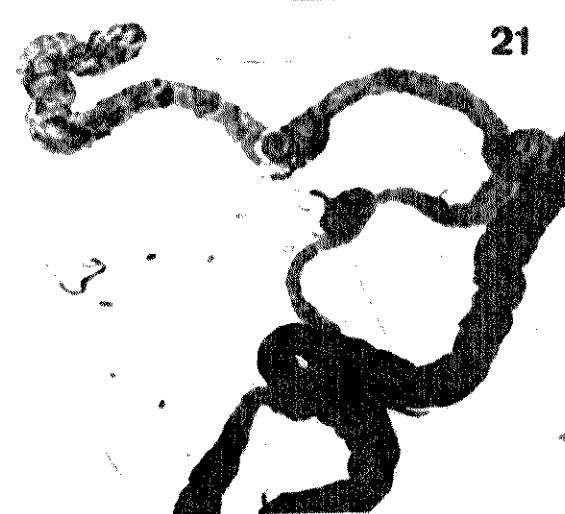
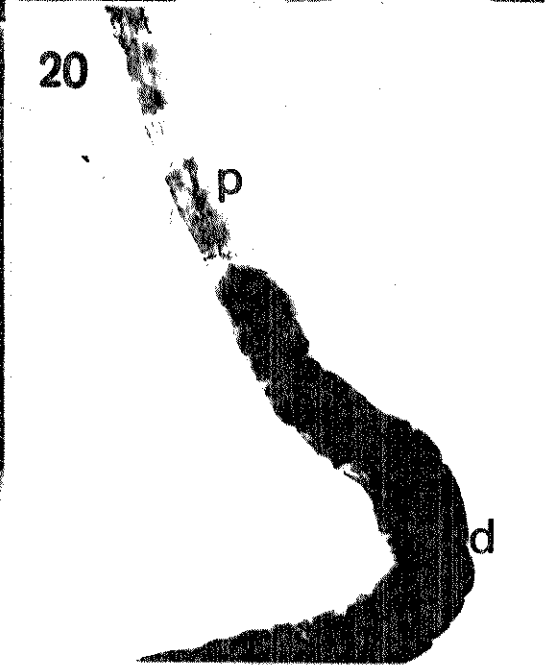
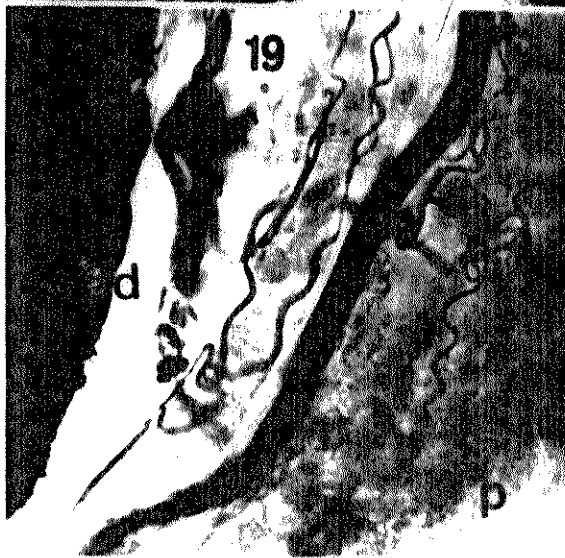
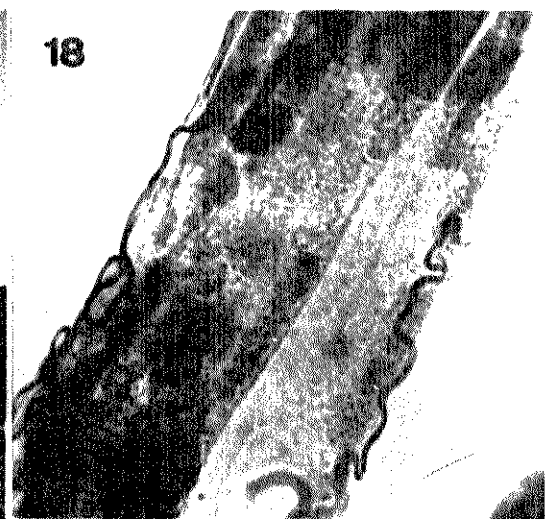
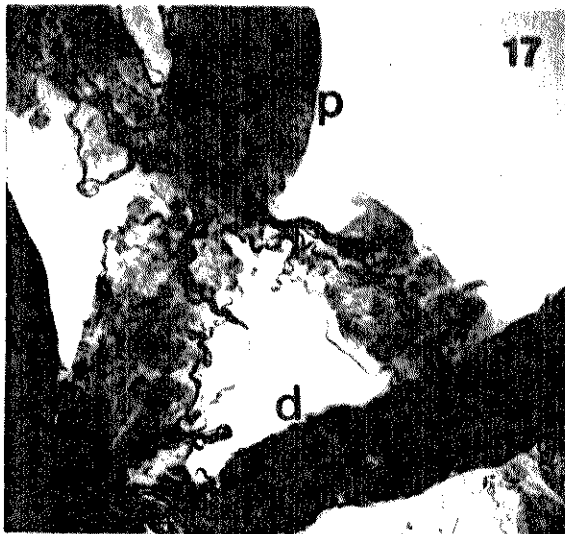
Metais pesados injetados	Tempo de tratamento	Espécimes	Fenótipos nucleares										Frequência total							
			(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)										
$\text{CuSO}_4 - 2 \times 10^{-5} \text{M}$	lh.	I	2.535	131	1.104	5.283	44.524	7.949	66.984	161	1.354	1.403	11.824	36	0.304	2.236	18.844	80	0.624	11.865
		II	3.505	105	1.084	4.525	46.724	8.135	83.994	0	0.004	1.104	11.404	0	0.004	385	3.974	61	0.634	9.685
		III	4.181	56	0.614	1.394	15.354	5.631	61.994	0	0.004	1.152	12.684	15	0.164	2.007	22.094	277	3.054	9.082
		IV	5.532	73	0.664	702	6.344	3.829	34.584	25	0.224	1.079	9.744	52	0.474	6.016	54.324	73	0.664	11.074
	2h.	I	3.054	149	1.104	765	5.664	6.129	45.364	64	0.474	859	9.744	115	0.854	5.479	40.554	865	6.404	13.511
		II	5.215	161	0.554	3.735	32.484	8.662	75.324	69	0.604	384	3.234	293	2.554	1.819	15.824	272	2.364	11.499
		III	4.866	85	0.684	2.431	18.954	8.048	62.734	0	0.004	1.396	10.864	309	2.404	2.792	21.764	283	2.204	12.828
		IV	5.532	85	0.684	2.431	18.954	8.048	62.734	0	0.004	1.396	10.864	309	2.404	2.792	21.764	283	2.204	12.828
	24h.	I	3.581	95	0.844	1.121	9.924	4.797	42.444	46	0.404	897	7.944	9	0.084	5.420	48.224	102	0.904	11.301
		II	1.049	86	0.914	3.374	35.904	4.509	47.974	29	0.304	2.205	23.464	24	0.254	2.200	23.414	430	4.574	11.301
		III	3.066	41	0.304	2.306	17.104	5.413	40.134	36	0.264	316	6.794	413	3.064	6.438	47.744	269	1.994	13.485
		IV	2.889	64	0.594	8.064	3.823	35.454	87	0.804	1.020	9.464	396	3.674	5.292	49.074	166	1.584	10.784	
lh.	I	5.829	110	0.764	701	4.894	6.640	46.364	98	0.684	2.048	14.304	364	2.544	4.955	34.604	213	1.484	14.318	
	II	9.391	112	0.874	176	1.364	9.679	75.184	126	0.984	549	4.224	135	1.054	1.999	15.534	384	2.984	14.318	
	III	2.701	41	0.474	5.780	67.314	6.091	70.924	30	0.204	468	5.454	461	5.364	1.460	17.004	107	1.244	12.872	
	IV	6.241	122	0.904	2.802	20.684	9.155	67.654	38	0.284	1.376	10.154	410	3.024	2.266	16.734	289	2.134	13.544	
2h.	I	2.431	181	1.794	1.166	11.574	3.778	37.504	76	0.754	1.225	12.164	495	4.914	4.301	42.704	196	1.944	10.071	
	II	4.340	124	0.218	673	6.604	5.157	50.544	95	0.934	602	5.904	432	4.234	3.368	33.004	549	5.384	10.071	
	III	3.702	32	0.294	839	7.704	4.573	41.964	15	0.134	1.626	11.924	106	0.974	4.310	39.544	268	2.454	10.203	
	IV	2.859	76	0.644	315	2.654	2.450	27.334	68	0.574	943	7.934	50	0.424	7.525	63.284	55	0.464	11.891	
24h.	I	3.202	132	1.164	562	4.944	3.896	34.244	122	1.074	726	6.384	284	2.494	5.761	50.684	537	5.164	11.891	
	II	4.814	95	0.754	1.313	10.354	6.222	49.094	37	0.294	1.068	8.424	24	0.194	5.248	41.394	79	0.624	11.376	
	III	2.579	58	0.464	3.987	31.244	6.544	52.324	36	0.284	1.704	13.62	258	2.064	3.691	29.524	271	2.164	12.678	
	IV	3.725	181	1.454	5.420	43.394	9.336	74.744	128	1.024	885	7.094	31	0.254	1.913	15.314	197	1.574	12.504	
$\text{CH}_3\text{HgCl} - 1,56 \times 10^{-4} \text{M}$	lh.	I	4.775	67	0.594	4.769	42.084	9.112	80.484	0	0.004	583	5.144	0	0.004	1.413	12.474	224	1.974	12.491
		II	4.862	299	2.204	5.168	38.064	10.349	76.224	91	0.674	807	5.944	69	0.504	1.997	14.704	265	1.954	12.491
		III	6.757	230	1.794	6.574	7.829	61.114	18	0.144	910	7.104	7	0.054	3.876	30.264	168	1.314	13.578	
		IV	7.509	177	1.734	23.914	8.563	44.444	24	0.184	1.388	10.444	38	0.284	2.958	20.984	484	3.644	13.578	
	2h.	I	3.503	322	2.584	1.762	14.144	9.987	80.154	75	0.604	1.097	8.804	49	0.394	828	6.844	423	3.394	12.808
		II	3.467	138	1.204	5.004	3.979	34.164	34	0.294	1.996	17.414	1	0.004	5.248	46.594	112	0.974	12.459	
		III	3.248	114	0.834	1.471	10.764	4.833	35.354	239	1.744	1.871	13.684	357	2.614	5.863	43.034	492	3.594	12.459
		IV	3.865	135	1.184	1.164	10.204	5.164	45.274	91	0.794	1.258	11.034	62	0.544	4.427	38.824	401	3.514	11.464
	24h.	I	2.084	131	0.944	1.785	12.904	4.000	28.904	11	0.074	2.082	15.044	205	1.484	7.133	51.554	404	2.924	13.669
		II	3.572	205	1.674	3.185	26.054	6.864	56.934	403	3.234	1.026	8.394	113	0.924	3.677	30.074	45	0.364	11.403
		III	6.373	182	1.554	2.634	3.09	58.534	20	0.174	1.437	12.254	40	0.344	3.011	25.674	354	3.014	13.835	
		IV	6.373	182	1.554	2.634	3.09	58.534	20	0.174	1.437	12.254	40	0.344	3.011	25.674	354	3.014	12.226	

4.2. Resultados aos testes citoquímicos para algumas enzimas

4.2.1. ATPases dependentes de Mg^{2+}

As *Figuras* 17 a 32 mostram resultados dos testes citoquímicos para ATPases dependentes de Mg^{2+} em túbulos de Malpighi de T. infestans. A atividade ATPásica positiva revelou-se segundo precipitado pardo escuro.

As respostas ao teste citoquímico nas regiões distal e proximal dos túbulos de material controle foram distintas entre si. A reação para ATPases, mesmo em condições de ausência de ATP no meio, para túbulos de Malpighi incubados por 5 minutos ou 20 minutos, na solução controle, evidenciou no citoplasma da região distal, uma reação entre forte e intensa em glóbulos e grumos (Figs. 17 e 19). No citoplasma da região proximal, observou-se granulação fina com intensidade de resposta de médio (na presença de ATP) (Fig. 17) a fraco (ausência de ATP) (Figs. 18 e 19). Estes dados estão de acordo com os de AZEREDO-OLIVEIRA (1982) para os túbulos de Malpighi imediatamente removidos de espécimes de T. infestans. A localização de resposta no citoplasma de material tratado com CH_3HgCl ou com $CuSO_4$ foi semelhante à dos controles. No entanto, para o caso do tratamento com solução de $CuSO_4$ mais concentrada (Fig. 24) a intensidade de resposta à reação foi maior do que a do controle (Fig. 17) ou do material tratado com a solução de $CuSO_4$ menos concentrada (Fig. 20). Na ausência de ATP no meio de incubação para a atividade enzimática, a reatividade ao método foi ligeiramente mais fraca (Figs. 25 e 27), porém mesmo assim mais forte do que a correspondente à do material tratado com a

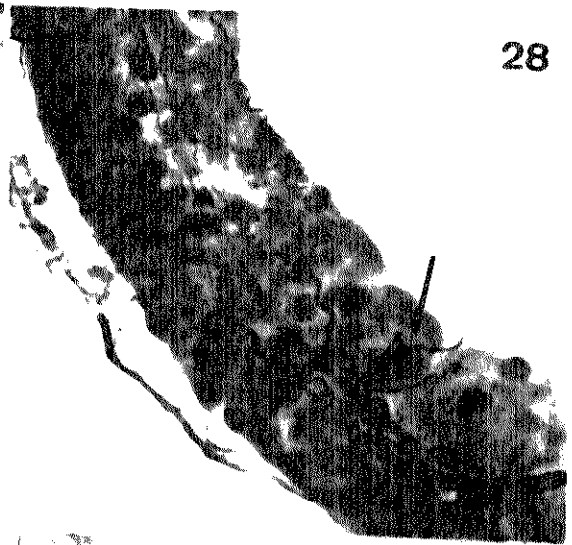




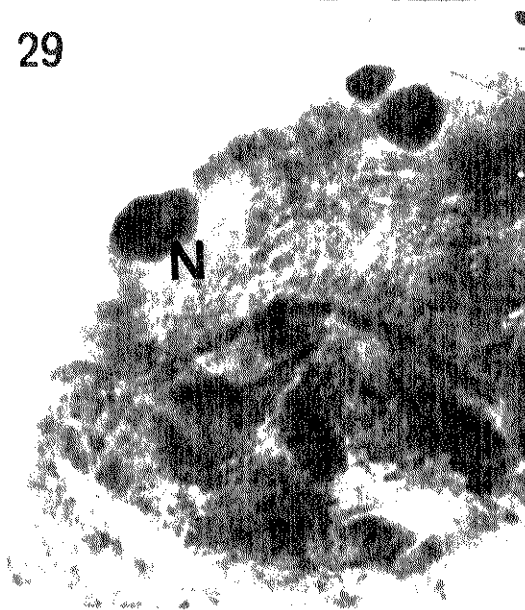
27



28



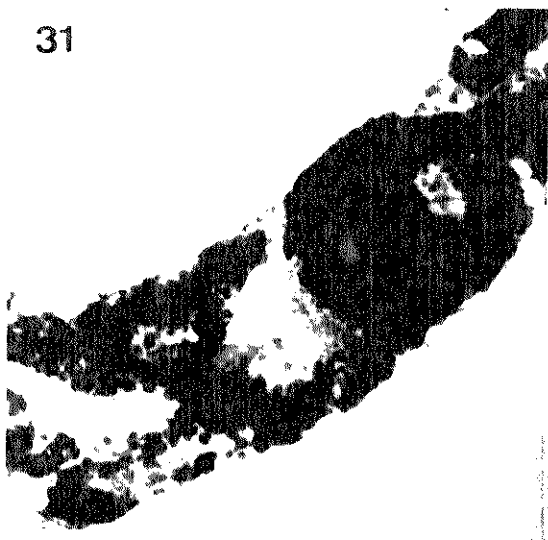
29



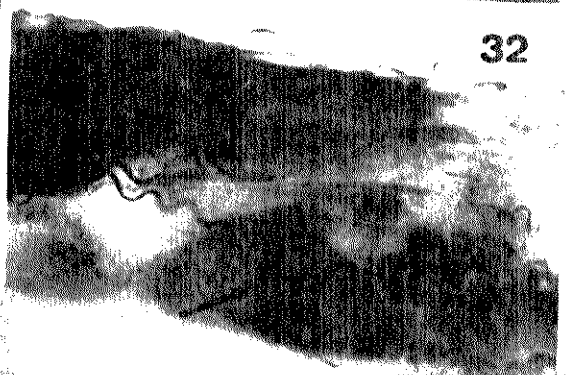
30



31



32



solução menos concentrada (10^{-5} M) de cobre e incubado na presença ^{ou não} de ATP (Figs. 20 e 21). No material tratado com mercúrio, as intensidades de resposta ao método citoenzimológico foram muito semelhantes às do material não tratado, como já anteriormente mencionado (Figs. 30 a 32).

Quanto aos núcleos da porção proximal, em material controle, observou-se nítida resposta positiva na região eucromática e/ou nucléolos, enquanto que, os núcleos das células distais apresentaram imagem negativa ou reatividade apenas no nucléolo. A região heterocromática dessas duas porções dos túbulos foi sempre negativa ao método. Estes dados estão também de acordo com os de AZEREDO-OLIVEIRA (1982) para túbulos recém-removidos dos insetos. Também no material tratado com cobre 10^{-5} M a região nucleolar de células proximais e com menos intensidade, a eucromatina, apareceram reativas ao método (Figs. 22, 28 e 29). O mesmo foi detectado no material tratado com mercúrio (Figs. 30 e 32).

Muitas vezes no lúmen da porção proximal dos túbulos foram observados cristais de urato com reação positiva ao método, como já descrito por AZEREDO-OLIVEIRA (1982). Estes foram melhor evidenciados no material incubado com a solução de CuSO_4 2×10^{-5} M.

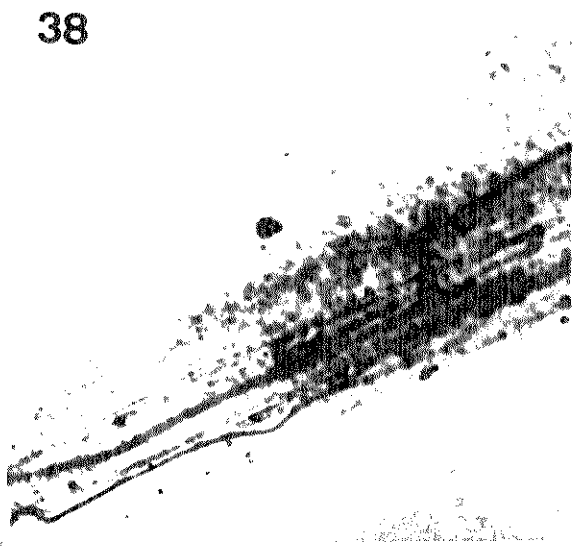
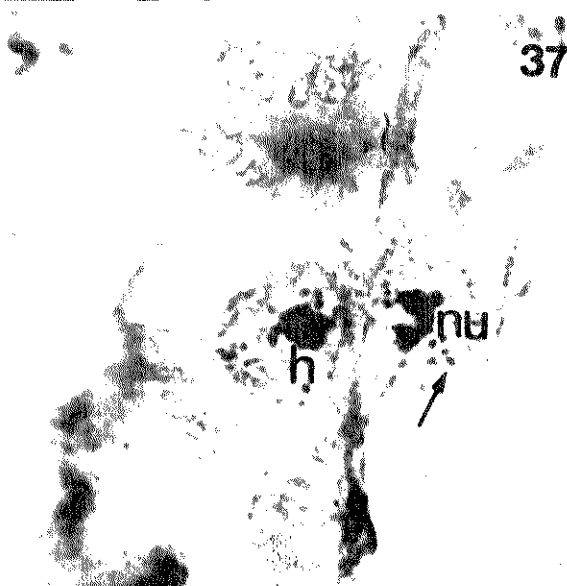
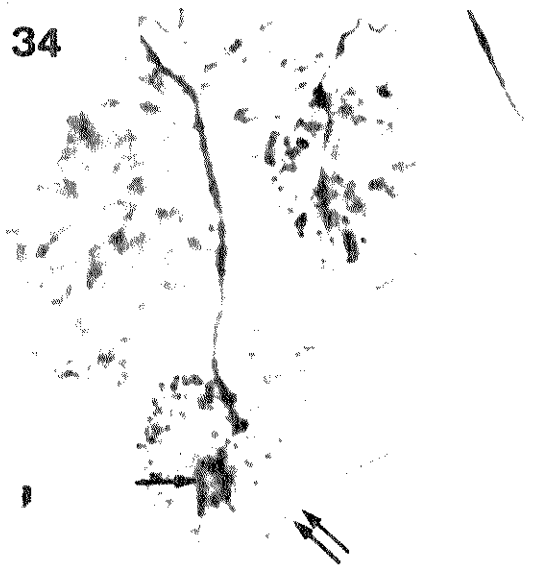
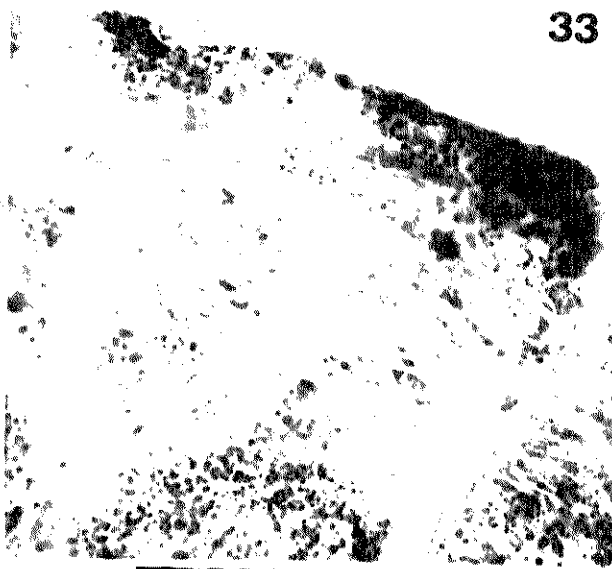
A Tabela II mostra um resumo da intensidade e localização de respostas ao teste citoquímico para ATPases.

4.2.2. Fosfatases ácidas

As Figuras 33 a 42 mostram os resultados referentes à atividade fosfatásica ácida em túbulos de Malpighi de T. infestans, submetidos ou não à ação de íons cobre e mercúrio.

Tabela II - Respostas aos testes citoquímicos para ATPase em túbulos de Malpighi de *T. infestans* tratados, ou não, com 10^{-5} M e 2×10^{-5} M de cobre e com $7,8 \times 10^{-5}$ M de mercúrio (Microscopia de luz)

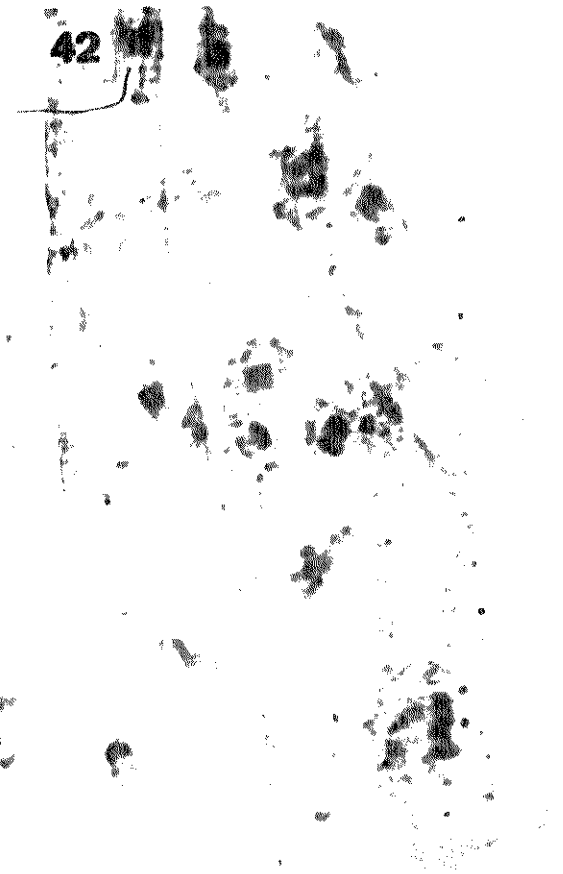
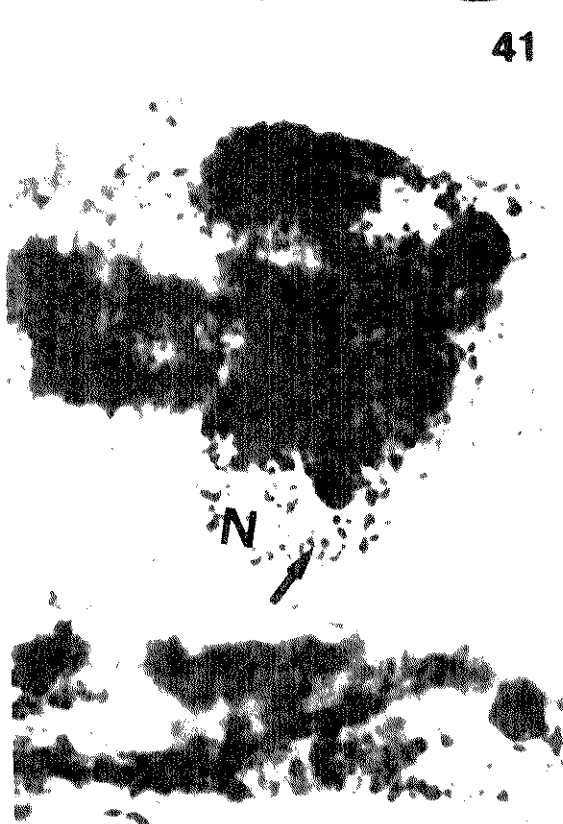
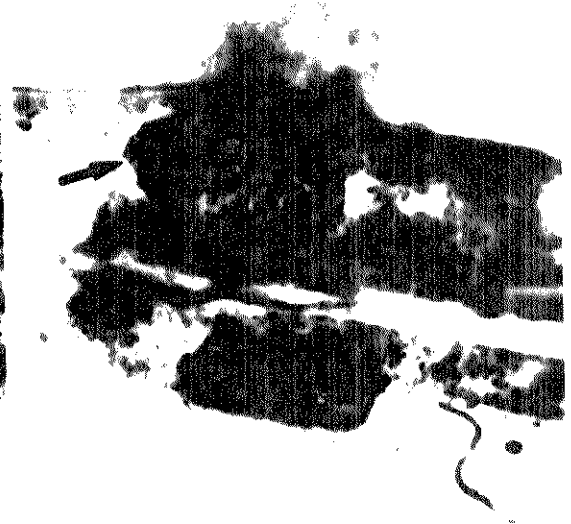
Condição dos testes citoquímicos	Regiões dos túbulos de Malpighi	RESPOSTA AOS MÉTODOS				
		Glóbulos/grumos	Citoplasma granulação fina	Heterocromatina	Núcleo Eucromatina e/ou nucléolo	Material no lúmen (cristais de urato)
1. Controle (5 min) Com ATP	distal	+++ ^a ++++	-	-	-	-
	proximal	-	++	-	+++	N.O.
2. Controle (5 min) Sem ATP	distal	+++	-	-	-	-
	proximal	-	+	-	+++	N.O.
3. CuSO_4 10^{-5} M Com ATP	distal	++++	-	-	-	-
	proximal	-	++	-	++++	N.O.
4. CuSO_4 10^{-5} M Sem ATP	distal	+++	-	-	-	-
	proximal	-	+	-	+++	++
5. CuSO_4 2×10^{-5} M Com ATP	distal	+++++	-	-	-	-
	proximal	-	++++	-	++++	++++
6. CuSO_4 2×10^{-5} M Sem ATP	distal	++++	-	-	-	-
	proximal	-	+++	-	++++	+++
7. Controle (20 min) Com ATP	distal	+++	-	-	-	-
	proximal	-	++	-	+++	++
8. Controle (20 min) Sem ATP	distal	+++	-	-	-	-
	proximal	-	+	-	+++	N.O.
9. CH_3HgCl $7,8 \times 10^{-5}$ M Com ATP	distal	+++ ^a ++++	-	-	-	-
	proximal	-	++	-	+++	++
10. CH_3HgCl $7,8 \times 10^{-5}$ M Sem ATP	distal	+++	-	-	-	-
	proximal	-	+	-	+++	N.O.
++++	muito intensa	++	média			
++++	intensa	+	fraca			
+++	forte	-	negativa			
		N.O.	Não Observado			



A atividade fosfatásica ácida se revelou segundo um precipitado pardo escuro.

Nos indivíduos controle (não injetados com cobre e mercúrio) que tiveram seus túbulos de Malpighi incubados no meio Gomöri completo, a atividade fosfatásica ácida manifestou-se em grânulos ou glóbulos citoplasmáticos. A concentração destes foi bem intensa na região distal. Algumas vezes a atividade nesta região, visualizada através da precipitação de sulfeto de chumbo, foi de tal modo intensa que impossibilitou a distinção de glóbulos individualizados. Na região proximal, os grânulos foram melhor individualizados e a reação foi também detectada nos núcleos de suas células (Fig. 34). Os núcleos desta região apresentaram atividade fosfatásica ácida tanto na eucromatina como na região nucleolar. Algumas vezes detectou-se atividade fosfatásica ácida na heterocromatina, sendo que nesta, a atividade está localizada mais em sua periferia, possivelmente associada também ao nucléolo.

Nos túbulos controle incubados no meio de Gomöri sem o substrato β -glicerofosfato foram encontradas respostas semelhantes em termos de localização àqueles do material incubado no meio completo com o substrato, porém, houve uma diminuição de precipitação, em regiões sabidas de intensa precipitação. Nestas condições, nos núcleos das células proximais, tanto eucromatina, região nucleolar quanto heterocromatina mostraram pouca ou nenhuma precipitação. As respostas nos túbulos de Malpighi controles, incubados nesse meio completo, a a crescido do inibidor NaF foram intermediárias às obtidas com os meios com ou sem β -glicerofosfato (Fig. 33). A *Figura* 34



mostra parte da região proximal, em que sob ação do inibidor, a atividade fosfatásica ácida ficou reduzida na eucromatina e aparentemente negativa na heterocromatina; além de nenhuma precipitação ter sido detectada no citoplasma.

Os túbulos de Malpighi submetidos ao tratamento com 2×10^{-5} M de CuSO_4 e incubados no meio de Gömbri completo, apresentaram dois tipos de respostas citoplasmáticas, com relação às porções proximal e distal dos túbulos, como as detectadas em órgãos controles (Fig. 35). Isto é, as células distais aparecem com precipitado na forma de muitos grânulos (Figs. 35 e 36), ao lado das células proximais com menor quantidade de granulação (Fig. 35) ou às vezes até com ausência desta (Fig. 37); na região proximal, parte da eucromatina mostrou reação positiva, da mesma forma que a região nucleolar (Fig. 37). A incubação do material em meio sem β -glicerofosfato não modificou sensivelmente os padrões, à semelhança dos anteriormente observados para os controles nestas condições. Por outro lado, em meio completo e acrescido do inibidor NaF houve um sensível decréscimo na reatividade (Fig. 38).

Com relação aos túbulos de Malpighi submetidos ao tratamento com o CH_3HgCl na concentração de 40 ppm, incubados no meio Gömbri completo, foram observadas células com forte precipitação (distais) e outras com menos (proximais). Neste caso os precipitados são mais fortes e homogêneos do que o observado com CuSO_4 (Fig. 39). Na região proximal foi observado inclusive núcleo do tipo "descompactado", no qual o precipitado sobre a eucromatina era bastante evidente (Fig. 40). Também em núcleos normais, a atividade fosfatásica ácida

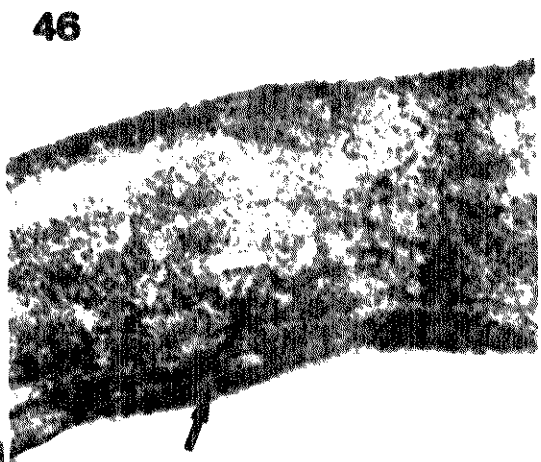
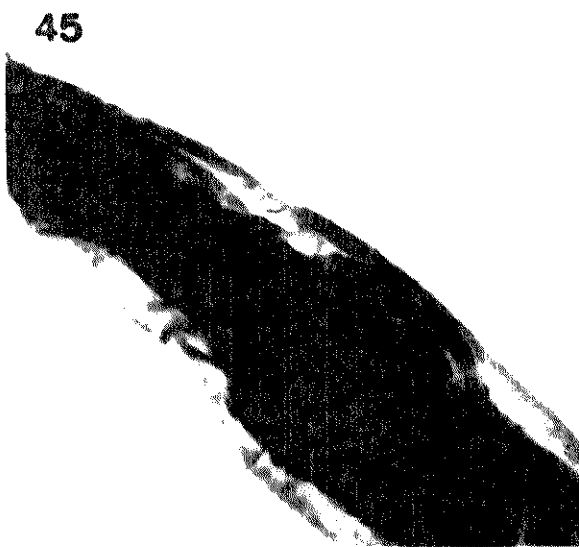
foi detectada nessa região nuclear (Fig. 41). As regiões heterocromáticas não apresentaram precipitação, entretanto, a região nucleolar em alguns casos mostrou reação positiva.

Na ausência do substrato, observou-se gradação na precipitação de sulfeto de chumbo, com sensível diminuição em algumas regiões dos túbulos, inclusive no citoplasma da região distal (Fig. 42). Na presença de NaF, observou-se que os precipitados nos núcleos continuaram presentes e a diminuição do precipitado no citoplasma de ambas as porções não foi significativa.

4.2.3. Desidrogenases succínicas (SDH)

A atividade SDH foi detectada no citoplasma das células dos túbulos de Malpighi do T. infestans, pela observação de depósitos microcristalinos de formazana azul-violeta.

Neste teste citoquímico, os controles, aqueles que não foram injetados com cobre e mercúrio, apresentaram uma maior atividade dessa enzima, nas porções apicais das células distais e nas porções basais das células proximais, seguindo a disposição preferencial das mitocôndrias nessas regiões (MELLO & DOLDER, 1977). Os grânulos de formazana concentram-se na parte central da região distal dos túbulos, formando as vezes massa compacta. Nas células proximais dos túbulos, a reação positiva aparece concentrada nos bordos dos túbulos. Além disso, foi observado, eventualmente, tanto na região proximal quanto na distal pequenos glóbulos citoplasmáticos corados, bem como, grumos espalhados no citoplasma talvez até representando locais com gotículas de gordura (HUMASON, 1979).

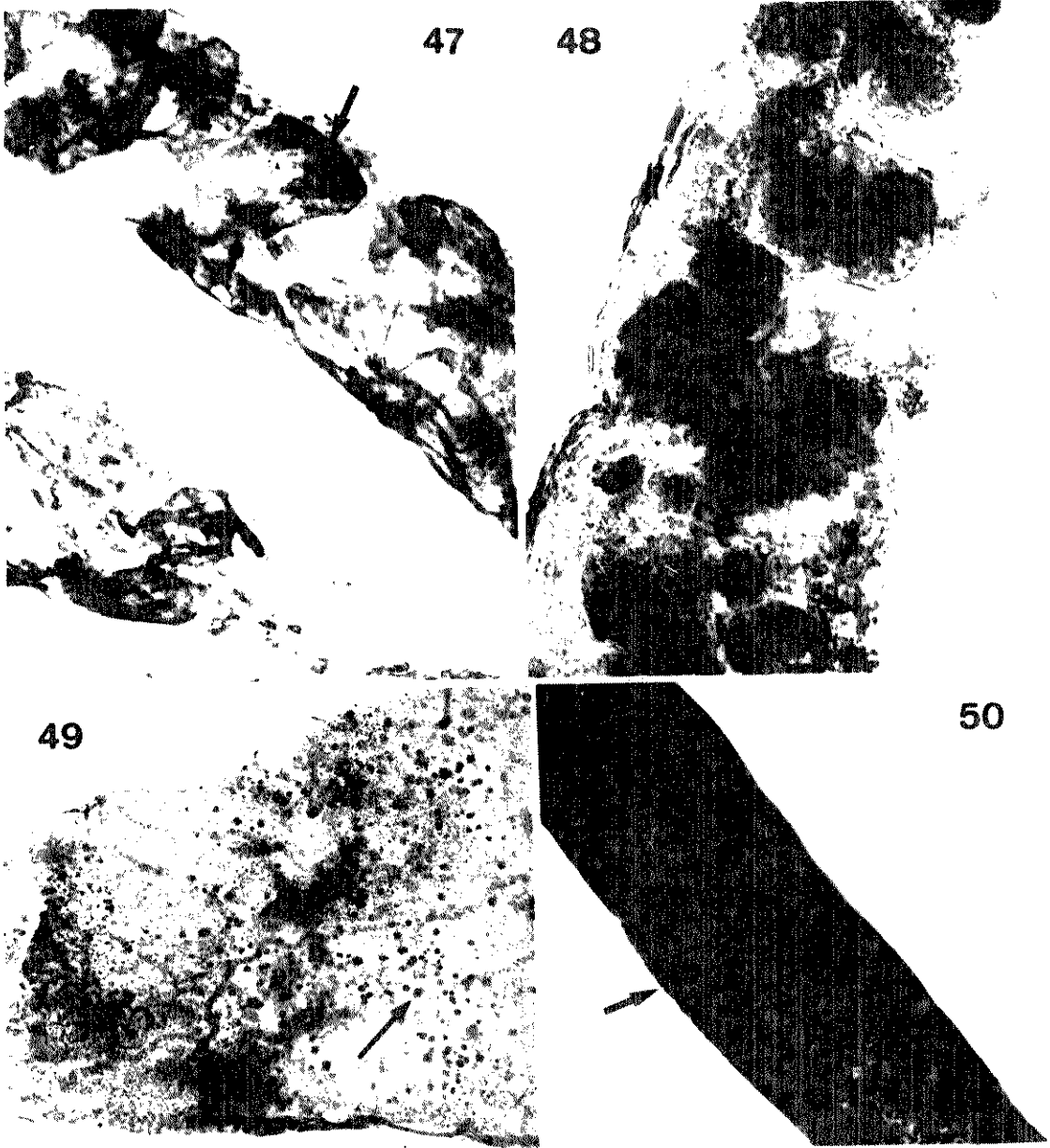


Nos indivíduos injetados com 2×10^{-5} M de CuSO_4 e incubados em meio com o substrato succinato de potássio, em muitas regiões dos túbulos de Malpighi, foi observado comportamento semelhante ao do controle (Figs. 45 e 46). Porém, em algumas regiões encontra-se reação esparsa e sob forma de densos e irregulares aglomerados (Figs. 43 e 44). Este último tipo de reação persistiu mesmo na ausência do substrato, embora menos corada (Figs. 47 e 48) e possivelmente, se relacione a irregularidades da forma celular associada à localização de mitocôndrias nesse material tratado. A região nuclear respondeu negativamente ao teste. A *Figura 49* mostra região de túbulo tratada com 10^{-5} M de cobre e incubada na ausência de substrato. Mesmo nessas condições, são encontrados pequenos e esparsos glóbulos citoplasmáticos corados.

É necessário relatar que onde se descreveu reação esparsa e fraca, a simples observação fotográfica pode conduzir a uma interpretação errônea dos resultados com relação à positividade da reação. Nos preparados encontram-se entre outros constituintes, os uratos (lúmen) e produtos de decomposição da hemoglobina que por apresentarem-se pardos e escuros, seriam responsáveis, muitas vezes, por regiões cinza-escuro, que nas fotografias podem ser interpretadas como reação de grande intensidade.

Os túbulos submetidos ao tratamento com $1,56 \times 10^{-4}$ M de CH_3HgCl apresentaram forte atividade SDH principalmente na região proximal (Fig. 50). Na região distal, observou-se forte precipitação em algumas células, obedecendo a distribuição já descrita para esta região. Todavia, observou-se distribuição irregular do produto corado sugerindo alteração na distribuição mitocondrial.

FIGURAS 47 a 50 - Atividade desidrogenásica succínica em células dos túbulos de Malpighi de T. infestans, expostos a 10^{-5} M de cobre e $1,56 \times 10^{-4}$ M de mercúrio. Fig. 47 Reação esparsa e fraca no material tratado com 10^{-5} M de cobre e ausência do substrato. Presença de formas celulares irregulares (→) x350. Fig. 48 Região proximal tratada com 10^{-5} M de cobre e ausência do substrato: reação muito fraca. Presença de formas celulares irregulares. Locais aparentemente de intensa reação (imagens escuras) são na realidade devidos à presença de uratos (cor marrom) x470. Fig. 49 No material tratado com 10^{-5} M de cobre e ausência de substrato, reação positiva em glóbulos citoplasmáticos individualizados e em pequenos grumos (→) x445. Fig. 50 Reação de muita intensidade na porção basal celular (→) das células proximais expostas a $1,56 \times 10^{-4}$ M de mercúrio x350.



5. DISCUSSÃO

Os dados do presente trabalho indicam a ocorrência de alterações na estrutura nuclear, bem como de prováveis alterações no funcionamento de alguns sistemas enzimáticos nas células dos túbulos de Malpighi, de ninfas de 5º estadio do T. infestans KLUG, após exposição das mesmas aos metais pesados, cobre e mercúrio.

Neste trabalho ficou demonstrado que nas concentrações de 10^{-5} M de CuSO_4 e $7,8 \times 10^{-5}$ M de CH_3HgCl há toxicidade para as células dos túbulos de Malpighi. Tal toxicidade foi observada nos preparados citológicos e revelada já aos 5 minutos de incubação no meio contendo cobre e aos 20 minutos de incubação no meio contendo mercúrio, como também a partir de uma hora, após injeção de soluções aquosas destes metais nos indivíduos. Foi constatado também que numa população de ninfas bem alimentadas de 5º estadio, em que os indivíduos apresentavam um peso médio de 100 mg, a injeção de 2×10^{-5} M de cobre ou de $1,56 \times 10^{-4}$ M de mercúrio foram letais à 50% da população decorridas 36 horas para CuSO_4 e 56 horas para CH_3HgCl ; enquanto que 60% dos insetos controle, injetados com água destilada pura permaneceram vivos após 240 horas de injeção (*Tabela III*). Foi também observado, que os insetos em jejum parecem mais resistentes aos tratamentos (*Tabela III*). Em triatomíneos, bem alimentados e infectados por Metarhizium anisopliae têm sido observada uma maior sensibilidade destes ao fungo do que a encontrada nos espécimes em jejum (MESSIAS, 1984 - comunicação pessoal).

"MESSIAS, C. Informação pessoal, 1984".

TABELA III - Percentual de indivíduos mortos após injeção com H₂O destilada pura e solução de CuSO₄ - 2x10⁻⁵M e CH₃HgCl 1,56x10⁻⁴M observado durante 264 h. Foram utilizadas amostras de indivíduos em jejum e bem alimentados

Experimentos	Nº de indivíduos	Condições fisiológicas dos indivíduos	% de indivíduos mortos												
			Horas após injeção												
			1	2	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264
H ₂ O destilada	20	jejum	0	0	5	15	15	30	30	30	30	30	30	30	30
H ₂ O destilada	20	bem alimentados	0	0	0	20	25	30	40	40	40	40	40	40	45
CuSO ₄ 2x10 ⁻⁵ M	20	jejum	0	0	10	45	60	80	80	85	85	85	85	85	90
			36												
CuSO ₄ 2x10 ⁻⁵ M	17	bem alimentados	0	0	52,95	88,23	100	-	-	-	-	-	-	-	-
			36												
CH ₃ HgCl 1,56x10 ⁻⁴ M	20	jejum	0	0	10	35	35	50	60	70	75	80	80	80	80
			80												
CH ₃ HgCl 1,56x10 ⁻⁴ M	10	bem alimentados	0	0	40	50	56	70	70	90	90	90	90	90	100
			36												

As concentrações utilizadas foram escolhidas com base no trabalho de CHENG & SULLIVAN 1974, apud SULLIVAN & CHENG (1975), os quais relataram o acúmulo do Cu^{2+} em 4 áreas do corpo do molusco Biomphalaria glabrata, inclusive no epitélio de intestino posterior, após períodos de 1/2, 2, 4, 6, 8 e 10 horas de exposição ao Cu^{2+} não radioativo, na concentração de 1 ppm. Esta concentração é equivalente à concentração de 4×10^{-6} M, portanto inferior à concentração de 10^{-5} M utilizada no presente trabalho e também citada por DUSTIN (1978), como capaz de desestabilizar microtúbulos de certos organismos. SULLIVAN & CHENG (1975) relatam também que o cobre, na forma de CuSO_4 , numa concentração de 0,06 ppm, causa a mortalidade de 50% de uma população de Biomphalaria glabrata, após 60 horas de exposição. Sabendo-se da maior resistência dos insetos à poluição mineral (JEANTET et alii, 1977) optou-se, portanto, por concentrações mais tóxicas de CuSO_4 , da ordem de 10^{-5} M ou de 2×10^{-5} M tendo sido estas comprovadamente nocivas aos indivíduos estudados.

Com relação ao CH_3HgCl , JEANTET et alii (1980) utilizaram a concentração de 20 ppm deste metal em seus experimentos com insetos do gênero Blatella. Expuseram os indivíduos ao contaminante durante 42 horas, não observando durante tal período nenhuma mortalidade anormal; contudo a intoxicação foi suficiente para ocasionar um aumento nítido do número de lisossomos e de vacúolos endocitoplasmáticos. Daí ter sido usada, com base nos dados destes autores, a concentração de 20 ppm de CH_3HgCl na incubação e duas vezes mais concentrada (40 ppm) quando da injeção nos indivíduos.

Seria interessante também mencionar a menor artificialidade do processo de injetar soluções aquosas contendo íons metálicos nos indivíduos, tanto do ponto de vista existencial quanto do artefactual de técnica, quando comparado com a incubação dos túbulos em soluções contendo os metais. Mesmo assim, conforme mencionado nos Resultados, os fenótipos nucleares observados foram os mesmos para os dois procedimentos experimentais, embora uma análise percentual válida só foi realizada no material proveniente de insetos injetados. Além disso, foi constatado, num teste à parte, que a injeção de água destilada pura nos indivíduos, misturando-se à hemolinfa, não causou a eles danos significantes quando da análise dos preparados citológicos; houve mesmo constatação de uma baixa letalidade numa população submetida a esse tratamento (ao redor de 30 a 40% após 240 horas da injeção com água destilada pura) comparada a uma letalidade de 100% após 96 horas de injeção de 2×10^{-5} M de CuSO_4 e de 90% após 144 horas de injeção de $1,56 \times 10^{-4}$ M de CH_3HgCl (*Tabela III*) em insetos em iguais condições de alimentação, ou seja bem alimentados. Estas observações estão de acordo com a importante função da hemolinfa nos insetos que é a de servir de reserva de água para evitar dessecação dos tecidos por ela banhados e que existindo hemolinfa suficiente, o metabolismo não é afetado por grandes alterações no conteúdo de água (WIGGLESWORTH, 1965). O mesmo, não foi observado para túbulos incubados na solução controle de PIMPINELLI et alii (1975), livre de íons metálicos e tida como preservativa do material cromatínico, pois, a incubação dos túbulos em tal solução, por 20 minutos, foi suficiente para a introdução de

fenótipos nucleares alterados (especialmente picnose nuclear). Constatou-se, portanto, que neste tipo de procedimento experimental, a existência de fatores intrínsecos ao meio de incubação podem exercer influência no funcionamento celular, inclusive a nível nuclear, confundindo-se com uma provável ação dos íons cobre e mercúrio.

Todavia, independente do procedimento experimental empregado ser o mais adequado ou não, para o estudo da ação dos metais pesados a nível nuclear, foram observados, nas condições experimentais, fenótipos nucleares distintos dos já descritos para animais sadios (MELLO, 1971, 1975, 1978, 1983), e que por serem alterados foram atribuídos como tendo sido induzidos pelos metais. Além disso, o acentuado decréscimo da frequência percentual dos fenótipos nucleares tidos como normais em favor do aumento dos novos fenótipos, particularmente a partir da segunda hora de tratamento vem corroborar esta hipótese.

Fenótipos nucleares alterados são também encontrados nas células dos túbulos de Malpighi de triatomíneos, quando estes insetos são submetidos a situações de "stress" fisiológico, como o jejum prolongado (MELLO, 1983; ANDRADE, 1984) como também em células de suas glândulas salivares infectadas por partículas virais (MELLO & DIAS, 1981). Em condições de jejum foi descrito o fenótipo nuclear "gigante", cujo nível alto de ploidia estaria relacionado com o fenômeno de fusão nuclear (MELLO & RAYMUNDO, 1980; MELLO, 1983).

Com relação aos demais fenótipos nucleares, estes seriam decorrentes de modificações na própria fisiologia cromatínica e/ou corresponderiam a etapas de um processo necrótico

celular associados aos efeitos tóxicos dos metais. Assim a razoável descompactação da heterocromatina do fenótipo nuclear "descompactado" ou impossibilidade de distinção entre hetero- e eucromatina no fenótipo nuclear "homogêneo", observada também ao nível da microscopia eletrônica, poderiam sugerir a ação dos metais pesados no grau de empacotamento da cromatina, que é fator de diferenciação dos dois tipos cromatínicos (MELLO, 1983). Por outro lado, a descompactação da heterocromatina observada nesses tipos nucleares poderia sugerir uma tentativa de colocar em ação um genoma silente, como já aventado para o próprio T. infestans, sob condições de jejum (MELLO, 1983), e em outros sistemas, como em cromossomos politênicos de larvas de Rhynchosciara americana submetidos a choque de temperatura ou infectados com microscoporiídeos ou ainda sob certas condições de cultura das glândulas salivares (DIAS et alii, 1969; SIMÕES et alii, 1975; SIMÕES & CESTARI, 1982) e em células tumorais de mama (SANDRITTER et alii, 1974).

A possibilidade de alteração na expressão gênica por ação de cloreto de metil mercúrio foi já detectada por RAMANUJAM & PRASAD (1979), embora estes autores não tenham observado nenhuma alteração morfológica nuclear nas células de glioma de rato estudadas. Também em células epiteliais de barata, nenhuma alteração morfológica nuclear, foi narrada após intoxicação dos insetos com mercúrio e observação ao nível da microscopia eletrônica (JEANTET et alii, 1980).

Com relação aos fenótipos nucleares "vacuolizado" e "picnótico" seriam eles uma consequência da ação tóxica dos metais poluentes, possivelmente mais deletéria e a curto

prazo, levando à necrose nuclear simultânea ou causadora de morte celular. Este seria um padrão de toxicidade semelhante ao descrito para a planta aquática Elodea densa (CZUBA & MORTIMER, 1981). Neste último caso é descrita uma diversidade de padrões de toxicidade num mesmo organismo, sendo a toxicidade um efeito interativo e não aditivo da concentração dos metais nos tecidos e do tempo de exposição à toxina. O tipo "vacuolizado" detectado nos túbulos de Malpighi de T. infestans, refletiria etapas da desintegração nuclear, tendo sido este, dos padrões alterados, o mais frequentemente observado, independente da concentração e do metal testado, mas tendo sua frequência percentual aumentada com o aumento do tempo de exposição aos íons metálicos.

É extremamente importante ressaltar a variação individual nas respostas aos tratamentos, onde por vezes, um indivíduo aparentemente mais resistente à ação tóxica poderia vir a comprometer uma análise quantitativa dos fenótipos nucleares, se os resultados fossem apresentados sob a forma de um valor médio. Variações individuais em fenótipos nucleares e fusão nuclear também existem nestes insetos, quando submetidos a jejum (ANDRADE, 1984). Sabe-se ainda, que numa mesma célula binucleada dos túbulos de Malpighi desses insetos, a afinidade da cromatina (especialmente da heterocromatina) por drogas do tipo do "hycanthone" pode variar por núcleo (SIMONI, 1984). O mesmo é válido com relação à afinidade de íons Mg^{2+} (MELLO & VIDAL, 1983) ou do composto nº 33258 Hoechst (MELLO, 1984 - comunicação pessoal) por tais tipos cromatínicos.

"MELLO, M.L.S. Informação pessoal, 1984"

A ação do cobre e mercúrio, com base nos resultados deste trabalho e em dados da literatura parece se estender também ao funcionamento de alguns sistemas enzimáticos envolvendo ATPases dependentes de Mg^{2+} , fosfatases ácidas e desidrogenases succínicas. Estas enzimas são citoquimicamente detectáveis nas células dos túbulos de Malpighi de T. infestans em condições metabólicas normais (AZEREDO-OLIVEIRA, 1982). Decréscimos em algumas atividades enzimáticas por ação de metais pesados já foram descritos na literatura (IVERSON et alii, 1974; SULLIVAN & CHENG, 1975; TAYLOR & DISTEFANO, 1976; TSUZUKI, 1981; LOVSTAD, 1982), sendo apontados como inibidores enzimáticos do tipo não-competitivo (WHITE et alii, 1973). Neste tipo de inibição não existiria relação entre o grau de inibição e a concentração do substrato. A inibição dependeria somente da concentração do inibidor, ocorrendo combinação irreversível deste com uma enzima, e originando derivados químicos sem atividade catalítica. Onde a toxicidade destes metais poderia ser compreendida em termos da inibição específica de algumas enzimas vitais aos organismos.

A existência de um sistema ATPásico nos insetos foi previamente descrita em preparações microssômicas a partir de túbulos de Malpighi do inseto Locusta migratoria (ANSTEE & BELL, 1975). Este sistema ATPásico consta de dois componentes, um que é ativado só pelo Mg^{2+} (ATPases dependentes de Mg^{2+} , estudadas neste trabalho) e outro ativado pelo Na^+ e K^+ , além do Mg^{2+} (ATPases totais). As ATPases totais diferem das primeiras por serem inibidas pelo glicosídeo cardíaco, pela ouabaína e serem sinergisticamente estimuladas pelo

Na^+ e K^+ . A atividade das ATPases totais dos túbulos de Malpighi em Locusta está relacionada com o transporte de cátions e fluidos. Já as ATPases dependentes de Mg^{2+} , também demonstráveis nos túbulos de Malpighi de Locusta migratoria, apresentam função duvidosa e complicada, devido à incerteza de sua localização intracelular (ANSTEE & FATHPOUR, 1978). Entretanto, uma ATPase dependente de Mg^{2+} esteve presente nas membranas plasmáticas de células HeLa durante todo o ciclo celular, mantendo provavelmente o nível de íons Mg^{2+} (VORBRÖDT & BOUN, 1979), os quais são necessários para algumas funções metabólicas, entre elas, síntese de DNA e proliferação celular (RUBIN & CHU, 1978, apud AZEREDO-OLIVEIRA, 1982). Ao nível da membrana plasmática dos túbulos de Malpighi do T. infestans, a atividade ATPásica dependente de Mg^{2+} parece estar relacionada com o transporte ativo de moléculas provenientes da hemolinfa, enquanto que o significado fisiológico da atividade ATPásica nuclear e especialmente nucleolar nestes túbulos, estaria provavelmente relacionada com os fenômenos de transcrição (AZEREDO-OLIVEIRA, 1982).

Neste trabalho, as respostas aos testes citoquímicos para ATPases dependentes de Mg^{2+} em indivíduos não expostos aos íons cobre e mercúrio foram semelhantes às obtidas por AZEREDO-OLIVEIRA (1982). Tal semelhança se relaciona com a localização da atividade enzimática nas porções morfo-fisiológicas distintas dos túbulos de Malpighi, tanto no âmbito citoplasmático quanto no nuclear. Entretanto, uma maior intensidade de reação, quer nas células da porção distal do túbulo ou nas da porção proximal, foi detectada no material tratado com o cobre, especialmente na concentração de 2×10^{-5} M em

presença ou não do ATP. O mesmo não foi observado para as células tratadas com $7,8 \times 10^{-5}$ M de mercúrio, que nesta concentração não exerceu efeito detectável sobre a reação. O mercúrio como um inibidor enzimático não-competitivo, dependeria da sua concentração para inibição do sítio ativo ou alostérico, provavelmente grupos sulfidrílicos (-SH), destas enzimas para manifestação de sua toxicidade. Na concentração usada de $7,8 \times 10^{-5}$ M isto não foi observado, embora tal manifestação tóxica possa acontecer para outras enzimas em concentrações inferiores às usadas neste trabalho. Isto evidenciaria, segundo IVERSON et alii (1974), características graduais de seletividade entre enzimas.

57261BC
Acúmulos de cobre, segundo DONALDSON et alii (1974, apud MURTHY et alii, 1981), em células de rato, compromete seriamente a atividade de transporte das ATPases, por ser um inibidor não-competitivo destas enzimas, alterando seus sítios catalíticos. Entretanto, neste trabalho, o cobre na concentração de 2×10^{-5} M parece ter intensificado a reação ao invés de inibi-la, mesmo na ausência do substrato, discordando daqueles autores. Daí ser interessante considerar a suscetibilidade destas enzimas frente aos inibidores não-competitivos. Ou ainda, por ser o cobre um cofator enzimático de um dos constituintes da cadeia respiratória (LENHINGER, 1972), poderia ter sido incorporado por ela, auxiliando na liberação do substrato para a reação, estimulando-a embora, tal provável influência positiva possa ser questionada pela complexidade dos fatores envolvidos nos processos de fosforilação oxidativa.

Quanto à atividade fosfatásica ácida, esta aparece nos túbulos de Malpighi do T. infestans em grânulos ou glóbulos citoplasmáticos, especialmente na região distal do órgão (relacionada com a eliminação de K^+ e água) e menos intensa na proximal (reabsorção de K^+), evidenciando nesta, glóbulos bem individualizados. Na região proximal, os núcleos apresentam atividade fosfatásica ácida tanto na eucromatina como na região nucleolar, provavelmente, relacionada ao mecanismo da transcrição (AZEREDO-OLIVEIRA, 1982). No presente trabalho, resultados semelhantes aos de túbulos de Malpighi em condições metabólicas normais foram encontrados nos órgãos tratados com cobre. Já nos túbulos de Malpighi expostos ao mercúrio, a precipitação de sulfeto de chumbo, revelada através da técnica de Gömöri, foi mais intensa e homogênea do que a observada nos túbulos controles e submetidos ao tratamento com o cobre, mesmo nas células proximais. Foi verificada uma redução pouco significativa desta precipitação em presença de um inibidor da reação, o NaF. Por outro lado, a reação mostrou-se sensível à ausência do β -glicerofosfato, independente do tratamento experimental usado.

Logo, apenas o mercúrio teria exercido influência na atividade fosfatásica ácida das células dos túbulos de Malpighi de T. infestans após, aparentemente, ter induzido um aumento no número ou tamanho dos lisossomos mesmo na região proximal do túbulo, significando alterações em seu teor e disponibilidade. O aumento do número de lisossomos após intoxicação por mercúrio já havia sido relatado por JEANTET et alii (1980) em células epiteliais do intestino dos insetos do gênero Blatella. Estes autores através de microanálise

relatam a existência de inclusões contendo cobre, zinco e enxofre nos lisossomos dos indivíduos controles, os quais após exposição ao mercúrio, passam a exibí-lo ao lado dos outros elementos, sob a forma de depósitos densos nestas organelas.

Assim, poder-se-ia aventar a hipótese de que o cobre por ser um elemento já naturalmente "aprisionado" pelos lisossomos, quando em excesso, não teria sido capaz, nos túbulos de Malpighi de T. infestans de estimular a produção destes corpúsculos, como observado para o mercúrio. Este último, por ser apenas metal poluente, não participante de qualquer metabolismo celular, teria sido capaz de desencadear, ou melhor de "provocar" os mecanismos autofágicos de defesa celular.

YIP & CHANG (1981) também relatam um aumento na quantidade e ocorrência de lisossomos no citoplasma de muitos neurônios de ratos tratados com metil-mercúrio, entretanto nenhuma alteração mitocondrial significativa foi constatada. Não foi observada também nenhuma alteração mitocondrial em células epiteliais do intestino da barata exposta ao mercúrio (JEAN TET et alii, 1980). ZALME et alii, 1976, apud CÉSAR et alii (1982) concluíram em suas experiências, que as primeiras mudanças encontradas na intoxicação pelo mercúrio em células de mamíferos, ocorrem a nível de membrana plasmática e as alterações mitocondriais seriam secundárias.

No entanto é sabido que os mercuriais combinam-se com grupamentos -SH e inibem vários sistemas enzimáticos, particularmente os mitocondriais, onde os efeitos sugerem inibição das etapas oxidativas. O aumento do volume mitocondrial, vacuolização e necrose de células do túbulo renal proximal em ratos foram observados após tratamento com altas doses de

metais, incluindo-se o mercúrio (HOOK et alii, 1979, apud CÉSAR et alii, 1982). O sulfato de cobre inibe a oxidação do succinato exógeno e do glutamato em moluscos, evidenciando entre outras características patológicas, mitocôndrias degeneradas (SULLIVAN & CHENG, 1975). Neste particular, foram buscadas nas células dos túbulos de Malpighi do T. infestans submetidos aos metais pesados, possíveis alterações no comportamento enzimático das desidrogenases succínicas, um sistema que tem demonstrado situar-se quase que exclusivamente na fração mitocondrial dos homogenados celulares (PEARSE & SCARPELLI, 1958).

Os resultados obtidos para os controles, concordam com os obtidos por AZEREDO-OLIVEIRA (1982) para insetos em condições metabólicas normais e mostram maior intensidade de reação nas porções apicais das células distais e nas porções basais das células proximais, seguindo a disposição preferencial das mitocôndrias nessas regiões (MELLO & DOLDER, 1977; 1980; AZEREDO-OLIVEIRA, 1982). Em muitas porções dos túbulos de Malpighi de indivíduos tratados com os metais cobre e mercúrio, foi observado comportamento semelhante ao descrito para os controles. No entanto, em algumas regiões dos túbulos tratados com os metais, constatou-se que o produto da reação se distribuía sob a forma de aglomerados densos e irregulares. Estes possivelmente refletem irregularidades da forma celular gerando alterações no padrão de distribuição mitocondrial, por ação dos metais. No entanto, pelo menos nas concentrações utilizadas para os dois metais, não houve inibição das desidrogenases succínicas. Portanto, sugere-se que cobre e mercúrio atuem como inibidores enzimáticos do tipo

não-competitivo e que existam graus de suscetibilidade distintos para os diferentes sistemas enzimáticos, sendo também importante a própria resistência do organismo como um todo, ou de alguns de seus órgãos ou até tecidos, frente à intoxicação pelos metais poluentes.

6. CONCLUSÕES

1. Alterações fenotípicas nucleares foram encontradas nas células dos túbulos de Malpighi de T. infestans após tratamento com cobre e mercúrio, decrescendo, a frequência dos tipos nucleares, considerados normais.

2. A constatação dos fenótipos nucleares denominados "descompactado", "homogêneo", "vacuolizado" e "picnótico" parece estar associada à ação dos metais ao nível cromatínico. Os tipos "homogêneo" e "descompactado" mostram alterações na estrutura cromatínica, especialmente no grau de empacotamento desta (característica de diferenciação dos dois tipos cromatínicos). A razoável descompactação das áreas heterocromáticas nestes tipos nucleares estaria possivelmente envolvida com tentativa de expressão gênica de áreas cromatínicas usualmente inativas.

3. Os tipos nucleares "vacuolizado" e "picnótico" representariam etapas degenerativas graves no processo de necrose nuclear, por desorganização da estrutura cromatínica e nuclear. O tipo "vacuolizado" foi o fenótipo nuclear alterado mais frequente observado neste trabalho.

4. O fenótipo nuclear "gigante" não seria induzido exclusivamente por ação dos metais, uma vez que tem sido também observado em órgãos de T. infestans submetidos a "stress" fisiológico como o jejum, sendo nesta situação atribuídos ao mecanismo de fusão nuclear.

5. As variações das frequências percentuais dos tipos nucleares evidenciaram a existência de discrepâncias individuais nítidas entre os indivíduos na população, inclusive para um mesmo tratamento. Isto ressalta a presença de

indivíduos com maior ou menor sensibilidade aos metais testados.

6. Não se observou inibição das ATPases, por cobre e mercúrio, nas concentrações utilizadas, demonstrando o comportamento destes como inibidores enzimáticos do tipo não-competitivo. Aparentemente apenas o cobre exerceu influência na reação, estimulando-a, possivelmente por ser um cofator enzimático.

7. A atividade enzimática das fosfatases ácidas não foi inibida pelos metais cobre e mercúrio. Entretanto, observou-se aumento no número ou tamanho dos lisossomos nos indivíduos tratados pelo mercúrio, sugerindo a capacidade deste na estimulação dos mecanismos autofágicos de defesa celular, por ser apenas um contaminante ambiental não participante do metabolismo vital.

8. Não foi constatada nas desidrogenases succínicas inibição de sua ação enzimática, embora fosse esperada principalmente por parte do mercúrio, devido sua afinidade pelos grupos -SH. Novamente o fato do cobre e do mercúrio serem inibidores enzimáticos não competitivos parece ter sido o fator limitante. Entretanto, pela ação desses metais pesados, houve alteração no formato celular, o que por sua vez modificou o padrão preferencial de distribuição mitocondrial em algumas áreas dos túbulos de Malpighi do T. infestans.

7. SUMÁRIO

Alterações fenotípicas nucleares, encontradas nas células dos túbulos de Malpighi de T. infestans, após tratamento com metais poluentes, cobre e mercúrio, foram detectadas em preparados citológicos, obtidos a partir de dois procedimentos experimentais básicos: incubação dos órgãos em soluções contendo os íons metálicos ou injeção de soluções aquosas destes íons nos indivíduos, com posterior remoção dos túbulos. A análise destes preparados, revelou oito tipos nucleares distintos. Destes, principalmente 4 fenótipos ("descompactado", "homogêneo", "vacuolizado" e "picnótico") parecem estar relacionados com a ação tóxica dos metais pesados, enquanto que os demais são também encontrados em túbulos de Malpighi de insetos sadios ou submetidos ao jejum prolongado ("stress" fisiológico). Ao mesmo tempo, a frequência percentual dos tipos nucleares considerados normais, decresce sensivelmente nos insetos tratados com os metais. Os fenótipos nucleares ocasionados pela ação de cobre e mercúrio, representariam alterações na fisiologia cromatínica e/ou refletiriam etapas de um processo de necrose celular. Neste trabalho, o tipo "vacuolizado" foi o padrão alterado mais frequente.

Também buscou-se detectar alterações no funcionamento de alguns sistemas enzimáticos no mesmo material exposto aos metais, com procedimentos citoquímicos. Não foi observada a inibição enzimática esperada, nas ATPases por influência dos metais pesados, comprovando o comportamento destes como inibidores enzimáticos do tipo não-competitivo. Apenas o cobre aparentemente exerceu influência na reação, estimulando-a, possivelmente por ser cofator enzimático. A atividade enzimática

das fosfatases ácidas também não foi inibida pelos metais poluentes, observando-se até, um aumento no teor e/ou disponibilidade delas no material tratado com o mercúrio. Nas SDH, a esperada inibição de sua ação enzimática, especialmente pelo mercúrio também não foi constatada; novamente tendo sido demonstrado o comportamento destes metais como inibidores enzimáticos do tipo não-competitivo. No entanto, houve alteração na forma celular, evidenciada pela modificação do padrão preferencial da distribuição das mitocôndrias, por ação do cobre e do mercúrio.

SUMMARY

Changes in nuclear phenotypes were found in the Malpighian tubule cells of T. infestans after treatment with pollutant metals, (copper and mercury). They were detected in cytological preparations, obtained from incubation of the tubules in solutions containing the metallic ions or from injection of aqueous solutions of the metallic ions in the specimens, with further removal of the tubules. The morphological analysis of the cytological preparations, revealed eight distinct nuclear phenotypes. Specially four of them ("unpacked", "homogeneous", "vacuolated" and "pyknotic" types) appear to be related to the toxic action of the heavy metals. On the other hand, the other types were also found in Malpighian tubules of normally healthy insects and in Malpighian tubules of insects under starvation (a physiological stress). Furthermore, the relative frequency of the normal nuclear phenotypes decreases remarkably in the treated insects. The nuclear phenotypes promoted by the action of copper and mercury would represent physiological chromatinic changes and/or they would reflect steps in the process of cellular necrosis. The nuclear phenotype "vacuolated" was the most frequent changed pattern found in this work.

Also changes in functioning of some enzymic systems were studied with cytochemical procedures in the same material exposed to the heavy metals. The enzymic inhibition expected for the ATPases by action of heavy metals was not demonstrated. This supports the hypothesis of copper and mercury ions functioning as non-competitive enzymic inhibitors. Only copper

apparently stimulated the enzymic reaction, possibly because it is an enzymic cofactor. The enzymic activity of the acid phosphatases was not either inhibited by the pollutant metals. An increase in content and/or availability of these enzymes was even found in the mercury-treated material. The expected inhibition promoted by metals in the SDH system, specially mercury, was not either demonstrated. Again, the non-competitive enzymic inhibiting behavior was suggested for copper and mercury. However, some changes in the cell shapes as demonstrated by modified patterns of mitochondria distribution was promoted by the heavy metals in the Malpighian tubules of T. infestans.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELFATTAH, A.S.A. & SHAMOO, A.E. Evidence for essential SH groups in muscarinic receptor binding site: Regeneration of a functionally active rat brain muscarinic receptor after inhibition with methylmercury and mercuric chloride by D-penicillamine. Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol., 40(6): 967, 1981.
- ALEXANDER, J.; AASETH, J.; REFSVIK, T. Biliary excretion of glutathione in the rat significance for the biliary excretion of heavy metals. Naunyn-Schmiederbergs Arch. exp. Path.Farmak., 313(suppl): R 66, 1980.
- ANDRADE, C.G.T.J. Fenótipos nucleares, com ênfase na heterocromatina, e frequência nuclear em algumas espécies de triatomíneos. Campinas, 1984, p. 57 - Dissertação de Mestrado, UNICAMP.
- 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. & 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: 383-88. 1978.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Estudo citoenzimológico em túbulos de Malpighi de Triatoma infestans KLUG. Campinas, 1982, p. 175. Dissertação de Mestrado, UNICAMP.
- BALLAN-DUFRANÇAIS, C.; RUSTE, J.; JEANTET, A.Y. Quantitative electron probe microanalysis on insects exposed to mercury. I. Methods. An approach on molecular form of the stored mercury. Possible occurrence of metallothionein-like protein. Biol. Cellulaire, 39: 317-24, 1980.

- BALLATORI, N. & CLARKSON, T.W. A biliary transport system for glutathione determines the biliary secretion of methylmercury. Fedn Proc. Fedn Am. Socs. exp. Biol., 41: (5): 8377, 1982.
- BALLATORI, N. & CLARKSON, T.W. Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. Science, 216: 61-63, 1982.
- 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.
- BROUWER, M.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J. Heavy metal ion interactions with Callinectes sapidus hemocyanin: Structural and functional changes induced by a variety of heavy metal ions. Biochemistry, 21: 2529-38, 1982.
- BURBACHER, T.M.; SHAW, C.M.; MOTTET, N.K. The teratogenic effects of methylmercury on the postnatal growth and development of Rhesus monkeys (Macaca mulatta). Teratology, 21(2): 31A-32A, 1980.
- CARLSSON, C. & ERNSTER, L. Uncoupler-reversible of mitochondrial ATPase by metal chelates of bathophenanthroline. I. General features. Biochim. Biophys. Acta, 638: 345-57, 1981.
- CÉSAR, A.G.W.; MAZZEI, R.L.; MUÑOZ, E.H.; OLIVEIRA, N.F.; ROCHA, D.F.L.; JUNQUEIRA, V.B.C.; SIMIZU, K. - Intoxicação experimental pelo cloreto de mercúrio: Lipoperoxidação hepática e renal. An. Farm. Quím. São Paulo, 22(1-2): 35-41, 1982.
- CZUBA, M. & MORTIMER, D.C. Toxic effects of methylmercury on the cell division process in Elodea densa. Plant Physiol. (Bethesda), 67(4 suppl): 55, 1981.

- DIAS, M.; PAVAN, C.; BASILE, R. Effects of a virus and microsporidian infections in chromosomes of various tissues of Rhynchosciara angelae (NONATO & PAVAN, 1951). Rev. bras. Biol., 29: 191-206, 1969.
- DUSTIN, P. Microtubules. Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag, 1978.
- FOULKES, E.C. & BLANCK, S. Mechanism of inhibition of renal amino acid reabsorption in rabbits by heavy metals. Toxicol. Appl. Pharmacol., 64: 103-07, 1982.
- GELLER, B.L. & WINGE, D.R. Metal binding sites of rat liver Cu-thionein. Arch. Biochem. Biophys., 213: 109-17, 1982.
- GRAS, G. & MONDAIN, J. Mercury and methylmercury pollution of fishery products: Toxicological effects on human health. Toxicol. Eur. Res., 3(5): 243-59, 1981.
- GRUENWEDEL, D.W. Methylmercury(II)-induced histone perturbations in nuclei isolated from calf thymus. Fedn Proc. Fedn Am. Socs. exp. Biol., 41(4): 6973, 1982.
- HAYASHI, Y. & MIKAMI, E. Reversal of heavy metal-directed inhibition of RNA synthesis in isolated mouse liver nuclei. FEBS Lett., 123(2): 265-68, 1981.
- HIRATA, S.; MIYAYAMA, Y.; FUJIMOTO, T. Effects of methylmercury chloride on palate closure in mice. Teratology, 22(1): 16A, 1980.
- HOLLAND, M.K. & WHITL, I.G. Heavy metals and human spermatozoa: II. The effect of seminal plasma on the toxicity of copper metal for spermatozoa. Int. J. Fertil., 27(2): 95-99, 1982.
- HUMASON, G.L. Animal tissue techniques. W.H. Freeman & Co., São Francisco, 4th ed., cap. 21, p. 385-424, 1979.

- HUTTON, M. Accumulation of heavy metals and selenium in three seabird species from United Kingdom. Environn. Pollut. (series A), 26: 129-45, 1981.
- IVERSON, F.; DOWNIE, R.H.; IRENHOLM, H.L.; PAUL, C.
Accumulation and tissue distribution of mercury in the guinea pig during subacute administration of methylmercury. Toxicol. Appl. Pharmacol., 27: 60-69, 1974.
- JACQUET, P. & LÉONARD, A. Teratogenicity of the heavy metals in the mouse. Mutat. Res., 74(3): 140, 1980.
- JEANTET, A.Y.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C.; MARTOJA, R. Insects resistance to mineral pollution. Importance of spherocrystal in ionic regulation. Rev. Écol. Biol. Sol., 14(4): 563-82, 1977.
- 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. Biol. Cellulaire, 39: 325-34, 1980.
- KAWADA, J.; NISHIDA, M.; YOSHIMURA, Y.; YAMAMOTO, T.
Comparative studies on acute and subacute effects of organic and inorganic mercurials on thyroidal functions. J. Pharm. Dyn., 4(5): s-71, 1981.
- KHERA, K.S. Teratogenic and genetic effects of mercury toxicity. In: The Biogeochemistry of mercury in the Environment. MIAGU, J.O., Amsterdam, ed. Elsevier, 1979 p. 503-518.
- KIRSCHBAUM, B.B. Aggregation of renal brush border membranes by Concanavalin A and heavy metals. Toxicol. Appl. Pharmacol., 10-19, 1982.

- KRISHNAJA, A.P. & REGE, M.S. Induction of chromosomal aberrations in fish Boleophthalmus dussumieri after exposure in vivo to mitomycin C and heavy metals mercury, selenium and chromium. Mutat. Res., 102: 71-82, 1982.
- KUMAKAWA, J.; YOSHIDA, T.; KURAIWA, Y. Effect of heavy metals on some enzymes of rat liver and factors which modify the metal actions, especially cadmium. J. Pharm. Dyn., 4(5): s-76, 1981.
- KUREISHY, T.W.; TARIQ, W.; SANZGIRY, S.; BRAGANÇA, A. Some heavy metals in fishes from the Andamau Sea, India. Indian J. Mar. Sci., 10(3): 303-07, 1981.
- LACERDA, L.D. de Heavy metal pollution in soil and plants of the Irajá river estuarine area in the Guanabara bay. Rev. Brasil. Biol., 42(1): 89-93, 1982.
- LEHNINGER, A.L. Bioquímica Barcelona, Ediciones Omega, 1972. Cap. 8, p. 159-180.
- LEVY, R.; RINSVELT, H.A. VAN; CROMROY, H.L. Relative concentration of major and trace elements in adult and immature stages of the red imported fire ant determined by ion induced X-ray fluorescence. The Florida Entomol., 57(3): 269-73, 1974.
- LOVSTAD, R.A. The protective action of ceruloplasmin on copper ion stimulated lysis of rat erythrocytes. Int. J. Biochem., 14: 585-89, 1982.
- MACARTNEY, H.W. & TSCHESCHE, H. The metal ion requirement for activation of latent collagenase from human polymorphonuclear leucocytes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Bd 362: S-1523-31, 1981.

- MAGOS, L.; PERISTIANIS, G.C.; CLARKSON, T.W.; BROWN, A.;
PRESTON, S.; SNOWDEN, R.T. Comparative study of
sensitivity of male and female rats to methylmercury.
Arch. Toxicol., 48: 11-20, 1981.
- MATSUMOTO, N. & SPINDLE, A. Sensitivity of early mouse
embryos to methylmercury toxicity. Toxicol. Appl.
Pharmacol., 64:108-17, 1982.
- MEHRA, M. & CHOI, B.H. Distribution and biotransformation
of methylmercuric chloride in different tissues of mice.
Acta pharmacol. et toxicol., 49: 28-37, 1981.
- MELLO, M.L.S. Nuclear behavior in the Malpighian tubes of
Triatoma infestans (Reduv., Hemiptera). Cytologia, 36:
42-49, 1971.
- MELLO, M.L.S. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the
Malpighian tubes of some triatomids. Rev. Bras. de
Pesquisas Méd. e Biol., 8(2): 101-07, 1975.
- MELLO, M.L.S. Computer analysis of stained chromatin on
Malpighian tubes of Triatoma infestans KLUG (Hemiptera,
Reduviidae). Mikroskopie, 34: 285-99, 1978.
- MELLO, M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and
heterochromatin. Histochem. J., 15: 739-51, 1983.
- MELLO, M.L.S. & DIAS, C.A. Detection of viral particles in
the salivary glands of the hemipteran, Triatoma infestans
KLUG. Cell. Mol. Biol., 27(5): 459-66, 1981.
- 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. Aspectos ultra-estruturais de tu-
bos de Malpighi de ninfas jovens de Triatoma infestans
KLUG. Ciênc. Cult., 32: 903-07, 1980.

- MELLO, M.L.S. & RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a blood-sucking hemipteran. Cytologia, 45: 203-09, 1980.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Basofilia nuclear em heterocromatina e eucromatina de Triatoma infestans. In: Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1983. Resumo dos trabalhos s.n.t.p. 17.
- MELLO, M.L.S.; DOLDER, H.; VIDAL, B.C. Alterações ultraestruturais em túbulos de Malpighi de Triatoma infestans submetidos a jejum. VIII Colóquio Soc. Brasil. Microsc. Eletr. Rio de Janeiro, 1981. Resumos, p. 26
- MINAMI, M.; KOSHI, K.; HOMMA, K.; SUZUKI, Y. Changes of the activities of superoxide dismutase after exposure to the fume of heavy metals and the significance of zinc in the tissue. Arch. Toxicol., 49: 215-25, 1982.
- MITCHELL, W.; KIM, C.; OTUAMA, L. Blood-brain barriers maturation affects susceptibility to lead. Neurology, 30(4): 353, 1980.
- MURTHY, R.C.; LAL, S.; SAXENA, D.K.; SHUKLA, G.S.; MOHD, M.; CHANDRA, A.; CHANDRA, S.V. Effect of manganese and copper interaction on behavior and biogenic amines in rats fed a 10% casein diet. Chem. Biol. Interactions, 37: 299-308, 1981.
- 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.

- NAKAZAWA, N.; MAKINO, F.; OKADA, S. Acute effects of mercuric compounds on cultured mammalian cells. Biochem.Pharmacol., 24: 489-93, 1975.
- ODOM, A.O. & BRADY, F.O. Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein. Biochem. J., 187: 329-35, 1980.
- PAUTRAT, G. & BENKÖEL, L. Adenosine triphosphatase activity during fusion of culture sheep choroid plexus cells induced by either visna virus or polythelene glycol. Cell. Mol. Biol., 23: 349-54, 1977.
- PEARSE, A.G.E. & SCARPELLI, D.G. Cytochemical localization of succinic dehydrogenase in mitochondria from Periplaneta americana. Nature, 181: 702-03, 1958.
- PEARSE; A.G.E. Histochemistry Theoretical and Applied, 2nd ed. 1961. Little, Brown and Co., Cap. 19, p. 536.
- PIMPINELLI, S.; GATTI, M.; DE MARCO, A. Evidence for heterogeneity in heterochromatin of Drosophila melanogaster. Nature, 256: 335-37, 1975.
- PLONKA, A. & METODIEWA, D. ESR investigations at low temperature of oxygen radical interaction with rat chromochelatin and metallothioneins. Biochem. Biophys. Res. Commun., 108(2): 776-82, 1982.
- POPESCU, H.I.; NEGRU, L.; LANGRANJAN, I. Chromosome aberrations induced by occupational exposure to mercury. Arch. Environ. Health, 34: 361-63, 1979.
- RAMANUJAM, M. & PRASAD, K.N. Alterations in gene expression after chronic treatment of glioma cells in culture with methyl mercuric chloride. Biochem. Pharmacol., 28: 2979-84, 1979.

- RUBIN, A.H. & CHU, B. Reversible regulation by magnesium of chick embryo fibroblast proliferation. J. Cell Physiol., 94: 13-19, 1978.
- SANDRITTER, W.; KIEFER, G.; SALM, R.; MOORE, G.W.; GRIMM, H., KIEFER, R. DNA in heterochromatin: cytophotometric pattern recognition image analysis among cell nuclei in duct epithelium and in carcinoma of the human breast. Beitr. Path., 151: 87-96, 1974.
- SAUVÉ, G.J. & NICHOLLS, D. Mc EWEN Liver protein synthesis during the acute response to methylmercury administration. Int. J. Biochem., 13: 981-90, 1981.
- SIMÕES, L.C.G.; AMABIS, J.M.; CESTARI, A.N. Puffs in the heterochromatin in chromosomes of Rhynchosciara. Ciênc. Cult., 27: 159-61, 1975.
- SIMÕES, L.C.G. & CESTARI, A.N. Cromossomos politênicos: sistemas experimentais in vivo e in vitro. Ciênc. Cult., 34: 480-88, 1982.
- SIMONI, I.C. Pesquisa de ligação do Hycanthone, à sítios cromatínicos com diferente supra-organização, composição e função. Campinas, 1984, p. 53. Dissertação de Mestrado, UNICAMP.
- SLATER, E.C. Oxidative phosphorylation. Aust. J. Exp. Biol. & Med. Sci., 36: 3-11, 1958.
- SOCCI, R.; IANNACCONE, V.; EISENBERG, M.; FARMANFARMAIAN, A. Effects of heavy metals on L-leucine transport in the intestine of several marine fishes. Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol., 41(5) 8260, 1982.
- SULLIVAN, J.T. & CHENG, T.C. Heavy metal toxicity to Biomphalaria glabrata (Mollusca: Pulmonata). Ann. N.Y. Acad. Sci., 266: 437-44, 1975.

- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exptl. Cell Res., 75:304-06, 1972.
- TAKEUCHI, T. Pathological studies on encephalopathia from unknown cause in Minamata district of Kumamoto Prefecture (socalled Minamata Disease). Acta Pathol. Japon., 7(suppl): 607-11, 1957.
- TAKEUCHI, T.; KAMBARA, T.; MORIKAWA, N.; MATSUMOTO, H. Pathological studies on Minamata disease with special reference to the histopathological findings in the central nervous system. J. KUMAMOTO Med. Soc., 31(suppl), 262-67, 1957.
- TAYLOR, L.L. & DISTEFFANO, V. Effects of methylmercury on brain biogenics amines in the developing rat pup. Toxicol. Appl. Pharmacol., 38: 489-97, 1976.
- TOMMASI, L.R. Poluição marinha no Brasil, uma síntese. Ciênc. Cult., 34(3): 325-332, 1982.
- TSUZUKI, Y. Effect of chronic methylmercury exposure on
* activities of neurotransmitter enzymes in rat cerebellum. Toxicol. Appl. Pharmacol., 60(2): 379-81, 1981.
- WATANABE, T.; SHIMADA, T.; ENDO, A. Effects of mercury compounds on ovulation and meiotic and mitotic chromosomes in female golden hamsters. Teratology, 25: 381-84, 1982.
- WEGMANN, R. & BANKOWSKY, Z. Differentiation histochimique de quatre groupes d'adénosine triphosphatases selon 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: 348-49, 1960.
- *VORBROT, A. & BORUM, T.W. Ultrastructural cytochemical studies of plasma membrane phosphatase activities during the HeLa S3 cell cycle. J.Histochem.Cytochem., 27: 1596 - 1603, 1979.

- WEIS, P.; WEIS, J.S.; HEBER, M.A. Variation in teratogenic response to methylmercury by killifish (Fundulus heteroclitus) embryos-differences within and between populations. Anat. Rec., 199(3): 270A-71A, 1981.
- WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E.L. Principles of Biochemistry 5^a ed. New York, McGraw-Hill Book, 1973. Cap. II, p.223-47.
- WIGGLESWORTH, V.B. The principles of Insect Physiology. London, Methuen and Co., 6th ed., 1965, p. 741.
- WINGE, D.R.; GELLER, B.L.; GARVEY, J. Isolation of copper thionein from rat liver. Arch. Biochem. Biophys., 208: 160-66, 1981.
- YIP, R. & CHANG, L.W. Effects of vitamin E on methylmercury neurotoxicity. J. Neurapathol. Exp. Neurol., 39(3): 398, 1980.
- YIP, R. & CHANG, L.W. Vulnerability of dorsal root neurons and fibers toward methylmercury toxicity: A morphological evaluation. Environ. Res., 26: 152-67, 1981.