

Maria Cristina Henrique Tavares

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
L. B.

APOPTOSE APÓS CHOQUE HIPERTÉRMICO EM
TRIATOMA INFESTANS (KLUG) (Hemiptera, Reduviidae)

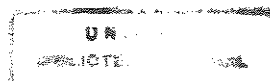
Este exemplar corresponde à redação final
da tese de candidato a)
Maria Cristina
Henrique Tavares
e aprovada pela Comissão Julgadora
22/04/98

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Campinas
1998

2818161



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T197a
V.º	1
TOTAL B.	34936
PROD.	395/98
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	04/09/98
N.º GPD	

CM-00115966-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Tavares, Maria Cristina Henrique

T197a Apoptose após choque hipertérmico em *Triatoma infestans* (Klug)
(Hemiptera, Reduviidae) / Maria Cristina Henrique Tavares. --
Campinas, SP: [s.n.], 1998.
78f.: ilus.

Orientadora: Maria Luiza Silveira Mello

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Triatoma. 2. Choque. I. Mello, Maria Luiza Silveira.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Local e Data: Campinas, 22 de Abril de 1998.

Banca Examinadora:

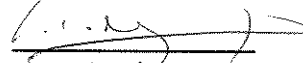
Titulares:

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Christine Hackel



Assinatura

Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro



Assinatura

Suplente:

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Assinatura

Ao Meu querido André,
que sempre me incentivou e me ajudou
nos momentos mais difíceis desta
jornada.

À minha querida filha Fabiana
pelos momentos mais felizes da minha
vida.

Agradecimentos:

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pela orientação, dedicação e confiança depositada em meu trabalho.

Aos professores Dra. Marlene Tiduko Ueta, Dra. Christine Hackel e Dr. Odair Benedito Ribeiro, pela atenção, correções e sugestões apresentadas durante a análise prévia desta dissertação.

À Profa. Dra. Nancy Lopes Garcia pela análise e auxílio na interpretação estatística dos dados, e pela amizade.

Ao Departamento de Biologia Celular pela disponibilidade de recursos e local para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Parasitologia pela disponibilidade de material e assistência durante este período.

À SUCEN de Mogi-Guaçu (SP), em especial Vera Lúcia C.C. Rodrigues pela participação neste trabalho e fornecimento dos insetos utilizados para os experimentos.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal pela utilização do laboratório e assistência durante este período.

À Silvy S. Maria e Luis Fernando Barbisan, pela amizade e ajuda na realização de experimentos.

Ao Mário, Dna. Maria e Pedro (SUCEN) pela amizade, apoio e auxílio técnico.

À Cidinha, Lílían e Sidney, pela eficiência e amizade.

Às funcionárias da biblioteca do IB-Unicamp, pela atenção e auxílio na obtenção de material bibliográfico.

À Silvia (secretaria de Pós-graduação) pela atenção e auxílios prestados.

Às queridas colegas Simone, Lenira e Maria pela amizade, estímulo e valiosa ajuda em momentos difíceis.

Aos colegas dos Departamentos de Biologia Celular e Parasitologia pelos bons momentos durante este período.

À Profa. Dra. Urara Kawazoe pela amizade e ajuda em momentos difíceis.

À Profa. Dra. Ana Maria Ap. Guaraldo pela amizade e compreensão.

Aos meus pais José Edgard e Maria Regina pela paciência e amor dedicados a mim e a minha filha Fabiana.

Aos meus irmãos e sobrinhas (Fernanda e Natália), pela presença constante, carinho e paciência.

Aos meus sogros José Carlos e Maria Therezinha pela paciência e ajuda em vários momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos concedida, e pelo financiamento de recursos para materiais e apresentação em Congressos.

1.INTRODUÇÃO

Morte celular programada é um termo empregado para situações de morte celular onde existe um programa genético (relógio genético), que especifica o período em que a mesma deve ser desencadeada, ocorrendo na embriogênese, em processos de metamorfose e regulação do desenvolvimento e renovação celular, durante a diferenciação celular e regressão do útero pós-parto e na mama após lactação, entre vários processos (Kerr et al., 1974; O'Shea et al., 1978; Walker et al., 1989).

O mesmo programa genético pode ser induzido e antecipado por ação de estímulos fisiológicos, passando a constituir o fenômeno mais conhecido como apoptose e que muitos autores até não distinguem da própria morte celular programada. Embora os estímulos indutores possam variar, as alterações estruturais celulares que passam a acontecer são muito semelhantes.

Duas classes principais de genes estariam envolvidos no controle genético da morte celular programada e apoptose: *myc* e *p53* (Evan et al., 1992; Shi et al., 1992; Lowe et al., 1993), sendo o processo todo modulado por íons e suscetível a vários inibidores e indutores (Moreira et al., 1996).

A morte celular por apoptose foi primeiramente caracterizada microscopicamente com base na mudança morfológica típica (Kerr et al., 1972). O significado de apoptose foi omitido no passado, mas nos últimos anos tem havido grande empenho em seu estudo. Ao desempenhar importante papel na regulação do desenvolvimento tecidual, sob a ação de estímulos fisiológicos adequados (Cotter et al., 1990), a apoptose realiza um papel oposto ao da mitose no controle de populações celulares (Camby et al., 1995; Umansky, 1996). Age como uma

Às queridas colegas Simone, Lenira e Maria pela amizade, estímulo e valiosa ajuda em momentos difíceis.

Aos colegas dos Departamentos de Biologia Celular e Parasitologia pelos bons momentos durante este período.

À Profa. Dra. Urara Kawazoe pela amizade e ajuda em momentos difíceis.

À Profa. Dra. Ana Maria Ap. Guaraldo pela amizade e compreensão.

Aos meus pais José Edgard e Maria Regina pela paciência e amor dedicados a mim e a minha filha Fabiana.

Aos meus irmãos e sobrinhas (Fernanda e Natália), pela presença constante, carinho e paciência.

Aos meus sogros José Carlos e Maria Therezinha pela paciência e ajuda em vários momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos concedida, e pelo financiamento de recursos para materiais e apresentação em Congressos.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	7
3. Material e Métodos	8
3.1. Reação de Feulgen	9
3.2. Método de Concentração crítica de eletrólitos (CEC)	10
3.3. Teste imunocitoquímico para detecção de apoptose	11
3.4. Análise estatística dos dados	13
3.5. Sobrevivência dos insetos	14
4. Resultados	15
4.1. Apoptose e fenótipos nucleares: aspectos descritivos qualitativos	15
4.2. Frequência de apoptose e outros fenótipos nucleares	26
4.3. Análise estatística dos fenótipos nucleares	33
4.3.1. Análise estatística para os fenótipos de ninfas sob condição de jejum moderado e bem alimentadas	33
4.3.2. Análise estatística para os fenótipos de adultos sob condição de jejum moderado e bem alimentados	39
4.4. Sobrevivência dos insetos	43
5. Discussão	46
5.1. Apoptose e fenótipos nucleares: aspectos descritivos qualitativos	46
5.2. Frequência de apoptose e outros fenótipos nucleares	49
6. Conclusões	57
7. Resumo	60
8. Abstract	62
9. Referências Bibliográficas	63

1.INTRODUÇÃO

Morte celular programada é um termo empregado para situações de morte celular onde existe um programa genético (relógio genético), que especifica o período em que a mesma deve ser desencadeada, ocorrendo na embriogênese, em processos de metamorfose e regulação do desenvolvimento e renovação celular, durante a diferenciação celular e regressão do útero pós-parto e na mama após lactação, entre vários processos (Kerr et al., 1974; O'Shea et al., 1978; Walker et al., 1989).

O mesmo programa genético pode ser induzido e antecipado por ação de estímulos fisiológicos, passando a constituir o fenômeno mais conhecido como apoptose e que muitos autores até não distinguem da própria morte celular programada. Embora os estímulos indutores possam variar, as alterações estruturais celulares que passam a acontecer são muito semelhantes.

Duas classes principais de genes estariam envolvidos no controle genético da morte celular programada e apoptose: *myc* e *p53* (Evan et al., 1992; Shi et al., 1992; Lowe et al., 1993), sendo o processo todo modulado por íons e suscetível a vários inibidores e indutores (Moreira et al., 1996).

A morte celular por apoptose foi primeiramente caracterizada microscopicamente com base na mudança morfológica típica (Kerr et al., 1972). O significado de apoptose foi omitido no passado, mas nos últimos anos tem havido grande empenho em seu estudo. Ao desempenhar importante papel na regulação do desenvolvimento tecidual, sob a ação de estímulos fisiológicos adequados (Cotter et al., 1990), a apoptose realiza um papel oposto ao da mitose no controle de populações celulares (Camby et al., 1995; Umansky, 1996). Age como uma

resposta fisiológica para remover células danificadas ou tecidos, podendo exercer importante papel na manutenção da estrutura do órgão e/ou tecidos, impedindo funções alteradas por fatores externos (Sakaguchi et al., 1995).

Muitas células mamíferas podem estar sofrendo morte celular por apoptose na proximidade de outras que se encontrem em processos de proliferação e diferenciação (Martelli et al., 1997).

É interessante notar que o mecanismo bioquímico fundamental de apoptose tem sido conservado durante a evolução desde os Nematodas até o homem, porque genes homólogos que regulam a morte celular em Nematodas estão presentes em organismos mamíferos, embora nestes a apoptose seja um processo mais complexo.

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pela perda da integridade celular, havendo condensação e segregação cromatínica, formação de massas cromatínicas granulares uniformes e delimitadas contra o envelope nuclear (marginação da cromatina) e condensação do citoplasma. A progressão da condensação cromatínica é acompanhada pela invaginação das membranas celular e nucleares, seguindo-se quebra do núcleo (cariorréxis) em fragmentos discretos que são, posteriormente, circundados por porções do envelope nuclear, seguindo-se, fenômeno de estrangulamento celular. Surgem assim os corpos ou vesículas apoptóticas, que representam vesículas contendo parte de citoplasma e do núcleo ou apenas de citoplasma e que são rapidamente fagocitadas por macrófagos ou outras células do sistema imune (Wyllie et al., 1984; Gerschenson & Rotello, 1992; Cohen et al., 1992; Kerr & Winterford, 1994; Majno & Joris, 1995).

Bioquimicamente, a apoptose é caracterizada pela fragmentação do DNA a nível inter-nucleossomal, o que pode ser facilmente reconhecido pelo aspecto em

escada do DNA quando desenvolvida eletroforese em gel de agarose (Wyllie et al., 1984; Gerschenson & Rotello, 1992; Kerr & Winterford, 1994; Majno & Joris, 1995), embora esta característica possa não se comportar sempre como marcador universal de apoptose (Cohen et al., 1992; Collins et al., 1992; Gerschenson & Rotello, 1992; Kerr & Winterford, 1994; Majno & Joris, 1995).

Tanto a morte celular programada como a apoptose diferem da necrose que é a morte celular induzida por injúria (Williams, 1990; Gerschenson & Rotello, 1992; Smith & Fornace, 1996). A necrose representa uma falha catastrófica no metabolismo. Segundo Kerr et al. (1972), na necrose ocorre um aumento no volume total da célula e das organelas subcelulares, seguindo-se uma autólise com danos à membrana, e ocorrendo alterações nucleares devidas à ativação de enzimas hidrolíticas que clivam o DNA (Durvall & Wyllie, 1986). Este tipo de morte celular envolve um grupo de células contíguas, com queda de ATP, dissolução das membranas, ruptura da célula com liberação de um exudato inflamatório (Samali & Cotter, 1996). A necrose pode resultar de uma exposição à hipertermia severa, hipóxia ou altas concentrações de substâncias tóxicas (Mosser & Martin, 1992). Já se observou que os núcleos degenerados por necrose apresentam desorganização do material cromatínico, bem como a presença de estruturas vacuolizadas. Este fenótipo difere da morte celular por apoptose.

A apoptose pode ser induzida por diferentes agentes estressores, como por exemplo, radiação, agentes quimioterápicos, hiper- ou hipotermia (choque térmico), metais tóxicos, álcoois, inibidores metabólicos, privação de O₂, jejum, hormônios esteróides, prostaglandinas, análogos de aminoácidos, metais pesados, agentes oxidantes, infecções viróticas, inflamação e hipertrofia, entre outros (Kelley & Schlesinger, 1978; Ashburner & Bonner, 1979; Johnston et al., 1980;

Hightower & White, 1981; Nevins, 1981; Burdon et al., 1982; Li & Shrieve, 1982; Sciandra & Subjeck, 1983; Thomas & Mathews, 1984; Ananthan et al., 1986; Lindquist, 1986; Amaral et al., 1988; Welch, 1993).

As células ou tecidos, apresentam uma resposta protetora a estes agentes estressores, denominada resposta ao choque térmico ou resposta ao estresse, havendo o aumento na produção de certas proteínas denominadas proteínas de choque térmico, **hsp** (heat shock proteins) (Atkinson & Walden, 1985; Ananthan et al., 1986; Welch, 1993). Estas proteínas desempenham um papel essencial na defesa da célula contra o estresse (Berger & Woodward, 1983), sendo também normalmente sintetizadas em simultaneidade com a produção de ecdisona que antecede a muda em insetos (Cheney & Shearn, 1983; Atkinson & Walden, 1985). Casos de aumento de sobrevivência pós-choque são sugeridos como tendo sido favorecidos por ação de hsp (Rodrigues et al., 1991).

A hipertermia também ativa o processo de morte celular em tumores (Dyson, 1986; Barry et al., 1990; Harmon et al., 1990; Takano et al., 1991), agindo em resposta a estímulos terapêuticos semelhantes a drogas citotóxicas e radiação (Dyson, 1986; Stephens et al., 1991). O modo de morte celular resultante de hipertermia, se apoptose ou necrose, é dependente da severidade do estresse térmico (Harmon et al., 1990; Lennon et al., 1990; Alison & Saffaf, 1992; Sakaguchi et al., 1995).

Em vetores da doença de Chagas, como *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* tem sido demonstrado que os choques de temperatura bem como outros agentes estressantes não somente afetam a sobrevivência dos espécimes, mas também os fenótipos nucleares, especialmente em células epiteliais de seus túbulos de Malpighi (Mello, 1983a, 1989; Andrade & Mello, 1987; Álvares-Garcia, 1988;

Rodrigues et al., 1991; Dantas & Mello, 1992; Mello et al., 1995; Garcia, 1997; Garcia et al., 1998).

Os fenótipos nucleares normais usuais em túbulos de Malpighi de *T. infestans* revelam um ou mais corpos de heterocromatina constitutiva em meio a uma estrutura mais finamente granulosa de eucromatina (Mello, 1971, 1975, 1978a; Mello & Raymundo, 1980; Mello & Recco-Pimentel, 1987). Já em *P. megistus* os núcleos normalmente exibem um pequeno corpo heterocromático apenas em machos, visto representar o cromossomo Y (Mello et al., 1986; Garcia, 1997).

No entanto, sob condições de estresse incluindo-se jejum, radiação gama, choques de temperatura e tratamento com metais pesados, surgem em *T. infestans* fenótipos nucleares que indicam necrose, bem como outros que salientam descompactação de heterocromatina e gigantes (fusão nuclear e celular) (Mello, 1983a, 1989; Andrade & Mello, 1987; Álvares-Garcia, 1988; Dantas & Mello, 1992; Mello et al., 1995). Sob a ação de choques de temperatura estes mesmos fenótipos ocorrem igualmente em *P. megistus* (Garcia, 1997).

Agentes estressores como temperatura têm sido apontados como influenciando o desenvolvimento de *T. infestans*. Segundo Silva & Silva (1988), o efeito da temperatura acelera as fases embrionárias, também observado por Juarez (1970); causa uma redução no período de desenvolvimento ninfal, bem como diferenças significativas na fecundidade, fertilidade e sobrevivência do *T. infestans* quando submetido ao jejum absoluto (Neiva, 1913; Pessoa & Barros, 1939; Pessoa 1959; Bursell, 1964; Perlowagora-Szumlewicz, 1969; Juarez, 1970; Zeledon et al., 1970; Wigglesworth, 1972; Juarez & Silva, 1982).

Segundo Rodrigues et al. (1991) choques hipertérmicos e hipotérmicos afetam a sobrevivência e a incidência de mudas em *T. infestans*, podendo afetar o equilíbrio hormonal que controla as mudas. Casos de aumento em sobrevivência pós-choque puderam ser constatados e admitidos como tendo sido fornecidos por ação das proteínas hsp.

Quando da análise de fenótipos nucleares após choques de temperatura em *T. infestans* foi constatado, apenas em ninfas submetidas a choque hipertérmico por 1 hora, um fenótipo nuclear representado por intensa e generalizada condensação cromatínica, de cujo corpo central brotavam múltiplas estruturas Feulgen positivas, fenômeno este não esclarecido na época (Dantas, 1990).

À luz de inúmeras observações atuais publicadas para outros materiais, suspeita-se que os núcleos de *T. infestans* com tais características se tratariam de núcleos apoptóticos, fenômeno esse possivelmente induzido pelo choque hipertérmico de curta duração (Sakaguchi et al., 1995).

2.OBJETIVOS

Tendo em vista os fatos abordados no tópico anterior, no presente estudo visou-se a investigação da indução de apoptose, bem como, de outros fenótipos nucleares, ocorridos simultaneamente com o choque hipertérmico moderado em células epiteliais de túbulos de Malpighi de *T. infestans*, em diferentes fases do desenvolvimento e diferentes estados de nutrição, buscando-se conhecimento sobre o próprio fenômeno de apoptose nesse inseto e sua participação na integridade do órgão e na sobrevivência do inseto.

Sendo o *T. infestans* um dos mais efetivos vetores na transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e em outros países da América do Sul, dados sobre sua biologia justificam o presente empreendimento, não apenas voltado para aspectos acadêmicos de Biologia Celular e Parasitologia, mas também para a instrumentação de planejamentos de controle e criação desses insetos em laboratório (Silva & Silva, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas ninfas de 4^o estadio e adultos machos de *Triatoma infestans*, criados no insetário da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) em Mogi Guaçu-SP, em condições padrão de temperatura (30°) e umidade (80%) (Rodrigues et al., 1991). Foram considerados insetos bem alimentados (sangue de frango, 1 vez por semana) e insetos sob jejum moderado.

Foi seguido o planejamento experimental abaixo relatado:

- Ninfas de 4^o estadio foram submetidas ao choque térmico de 40°C por 1 hora e retornadas às condições controle. Estes insetos foram alimentados 7 dias antes de se iniciar o experimento e permaneceram sem se alimentar até 30 dias pós-choque (jejum moderado). Espécimes não submetidos ao choque foram considerados controles.

- Ninfas de 4^o estadio foram submetidas ao choque de 40°C por 1 hora e retornadas às condições controle, mantendo-se a alimentação semanal. Os respectivos controles não foram submetidos ao choque térmico.

- Adultos foram submetidos ao choque de 40°C por 1 hora e retornados às condições controle. Estes insetos foram alimentados 7 dias antes de se iniciar o experimento e permaneceram sem se alimentar até 30 dias pós-choque (jejum moderado). Espécimes não submetidos ao choque foram também considerados.

- Adultos foram submetidos ao choque de 40°C por 1 hora e retornados às condições controle, mantida a alimentação semanal. Da mesma forma que nos casos anteriores, foram considerados insetos não submetidos ao choque como controles.

Os insetos foram dissecados 7, 14 e 30 dias pós-choque, acompanhados pelos respectivos controles.

Com o auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss realizou-se a dissecação dos espécimes para a retirada dos túbulos de Malpighi, os quais foram estendidos sobre lâminas histológicas. Para cada situação experimental foram dissecados 3 insetos.

Os túbulos de Malpighi foram fixados em etanol absoluto-ácido acético glacial 3:1 (v/v) por 1 minuto, seguindo-se um banho de etanol a 70% por 5 minutos, e secando-se os preparados ao ar.

Túbulos destinados à reação imunocitoquímica para apoptose foram fixados em paraformaldeído (1,75%) por 15 minutos, sendo lavados a seguir por 24 horas em água corrente e secados ao ar.

Os preparados foram submetidos aos seguintes testes:

3.1. Reação de Feulgen

A reação de Feulgen é o procedimento citoquímico mais conhecido e utilizado para determinações qualitativas e quantitativas convencionais do DNA (Mello & Vidal, 1978; Mello, 1997). Foi utilizada para a observação dos fenótipos nucleares e determinação de sua respectiva frequência para ser comparável a dados de identificação de fenótipos nucleares da literatura (Mello, 1971, 1983a, 1989; Dantas & Mello, 1992; Mello et al., 1995). Tem se mostrado também vantajosa para o estudo de apoptose (Camby et al., 1995; Maria et al., 1998).

Os túbulos de Malpighi obtidos de acordo com as condições experimentais mencionadas foram submetidos à hidrólise com HCl 4N por 1 hora e 5 minutos à temperatura de 25°C (Mello, 1976) e em seguida imersos rapidamente em HCl 0,1N gelado para paralisar o processo hidrolítico mais drástico. Esse tempo de

hidrólise foi escolhido por ser considerado como o ótimo para este material, ou seja, que permite a depuração máxima do DNA (Mello & Vidal, 1978; Mello, 1997).

A seguir os preparados foram tratados com reativo de Schiff à temperatura ambiente por 40 minutos, seguindo-se 3 banhos de água sulfurosa (metabissulfito de sódio 10%, HCl 1N e água destilada 1:1:18) por 5 minutos cada.

Os preparados foram então lavados em água destilada durante 2 minutos; desidratados em série etanólica a partir do etanol 70% por 1,5 minutos cada e diafanizados em xilol durante 10 minutos e posteriormente montados em Bálsamo do Canadá ($n_D = 1,54$) (Mello & Vidal, 1980).

3.2. Método de concentração crítica de eletrólitos (CEC)

O método de CEC para ácidos nucleicos, baseia-se no princípio de que tais componentes, conhecidos por exibirem basofilia metacromática após tratamento com solução de azul de toluidina a pH 3,6 - 4,0, não mais a exibirem em situação de competição azul de toluidina- íons inorgânicos tipo Mg^{2+} (Vidal & Mello, 1989). CEC é o valor da molaridade de Mg^{2+} na qual um determinado complexo nucleoprotéico tem abolida a metacromasia devida a seu ácido nucleico (Vidal & Mello, 1989). Constatou-se que no ponto de CEC para o DNA, enquanto a metacromasia deste é abolida (cor verde), a metacromasia do RNA permanece (cor violeta) porque a CEC de RNA é maior do que a do DNA (Mello et al., 1993; Mello, 1997).

Dado o nível de condensação cromatínica em núcleos apoptóticos, quando estes núcleos são submetidos ao método de CEC, segundo Mello et al. (1993) apresentam colorabilidade em verde muito intensa, ao mesmo tempo em que a

que a disposição, a localização e o destino do RNA podem ser revelados conforme o tipo celular analisado (Vidal et al., 1996).

Neste trabalho, visando-se a identificação dos núcleos apoptóticos, os túbulos de Malpighi montados em lâminas histológicas foram submetidos à coloração com azul de toluidina durante 15 minutos e em seguida tratados por igual tempo em cloreto de magnésio 0,05M, seguindo-se banhos de água destilada, secagem do material ao ar, diafanização em xilol por 10 minutos e montagem em Eukitte (Mello et al., 1993; Vidal et al., 1996).

3.3. Teste imunocitoquímico para detecção de apoptoses

Os túbulos de Malpighi fixados em paraformaldeído foram submetidos à reação imunocitoquímica com ApopTagTM (Oncor, Gaithersburg, MD) para detecção de apoptose. As lâminas contendo os túbulos de Malpighi foram banhadas com tampão PBS pH 7,4 durante 5 minutos (3 banhos). Posteriormente foram incubadas com proteinase K (20µg/ml), por um período de 15 minutos à temperatura ambiente. Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à 3% em PBS pH 7,4 por 5 minutos. Foram feitos banhos com PBS pH 7,4 por 5 minutos cada (3 banhos). Pingaram-se duas gotas de tampão de equilíbrio (Equilibration Buffer) sobre o material. Imediatamente após este passo, colocou-se uma lamínula plástica sobre o material o qual foi deixado incubando por 20 minutos. Removeu-se então a lamínula plástica e o excesso de tampão de equilíbrio do material. Após este passo, pingaram-se duas gotas (54µl) de uma mistura da enzima TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) e de nucleotídeos marcados com digoxigenina (1:2, v/v) sobre o material. Colocou-se uma lamínula plástica sobre o material o qual foi

deixado incubando por um período de 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Removeu-se a lamínula plástica e o excesso de enzima e incubaram-se as lâminas com o tampão de bloqueio da TdT (Stop/Wash Buffer), por um período de 10 minutos. Novamente seguiram-se 3 banhos de 5 minutos cada com PBS pH 7,4.

Pingaram-se então duas gotas de anticorpo anti-digoxigenina conjugado com peroxidase sobre o material. Imediatamente após este passo, colocou-se uma lamínula plástica sobre o material e incubou-se por um período de duas horas à temperatura ambiente. Removeu-se a lamínula e o excesso de anticorpo e deram-se 3 banhos de PBS pH 7,4 por 5 minutos cada. Incubaram-se as lâminas com solução de DAB (3-3)-tetrahidrocloreto de diaminabenzidina na concentração de 1µg/ml em solução tampão TRIS a 0,05 em pH 7,4 e solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), à 0,01% por 5 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada, 3 banhos de 5 minutos cada, e posteriormente contra coradas com verde metila a 0,25% (methyl green 0,1M e tampão acetato de sódio pH 4,0, v/v), por um período de 10 minutos com posterior desidratação em banhos de álcool etílico a 95% (1 banho), a 100% (2 banhos) e xilol (3 banhos) e, posteriormente, montagem em Permout ou Bálsamo do Canadá.

Como controle positivo desta reação foram utilizados simultaneamente aos preparados de *T. infestans* cortes de timo de rato e células V79 em cultura, que invariavelmente marcam bem (Vidal et al., 1996).

Como acima mencionado, as observações dos fenótipos nucleares das células epiteliais dos túbulos de Malpighi e determinações de suas respectivas frequências, foram realizadas nos preparados submetidos à reação de Feulgen, sendo que as contagens foram efetuadas em microscópio binocular Zeiss, usando-se objetiva de aumento 40X e ocular de 10X.

As outras duas metodologias foram utilizadas para se testar sua adequação no estudo de apoptose desse material.

Os núcleos observados foram classificados segundo os seus fenótipos em núcleos normais, suspeitos de apoptose, apoptóticos, degenerados, com aparente descompactação da heterocromatina, núcleos gigantes, gigantes suspeitos de apoptose e gigantes com aparente descompactação da heterocromatina. Os núcleos cuja frequência foi estabelecida, correspondem aos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi, poliplóides e bem caracterizados (Mello, 1971, 1978a) e não confundidos com núcleos de outros tecidos (corpo gorduroso, células sanguíneas, músculos, etc.) que costumeiramente são visualizados como contaminação nos mesmos preparados.

Foram obtidas fotomicrografias dos diferentes fenótipos em fotomicroscópio Zeiss, utilizando-se filme Kodacolor Gold 100.

3.4. Análise estatística dos dados

Foram buscadas evidências que indicassem haver diferenças reais no número de fenótipos nucleares entre as situações de choque térmico e controles, bem como, os dias pós-choque para dissecação e a condição alimentar. A hipótese nula é a de que não existiria influência dos fatores envolvidos no experimento. Para cada fonte de variação calculou-se uma estatística do teste com o valor de significância para cada fonte de variação e determinaram-se quais fatores influenciariam o número de fenótipos encontrados.

A análise estatística foi feita para cada fenotipo, tendo como fonte de variação os fatores temperatura (2 níveis), dias para dissecação (3 níveis) e condição alimentar (2 níveis), bem como interação entre condição alimentar para

temperatura e dias. Utilizou-se o teste de análise de variância, através do programa MINITAB. Com isto, foi possível obter-se o valor de significância ($p < 0,05$) para cada fonte de variação e determinar-se quais fatores influenciariam o número de fenótipos nucleares

3.5. Sobrevivência dos insetos

Foi acompanhada a sobrevivência de um grupo de insetos (ninfas de 4^o estadio e adultos machos) por 30 dias após o choque hipertérmico, nas mesmas condições de nutrição em que se procedeu a análise celular.

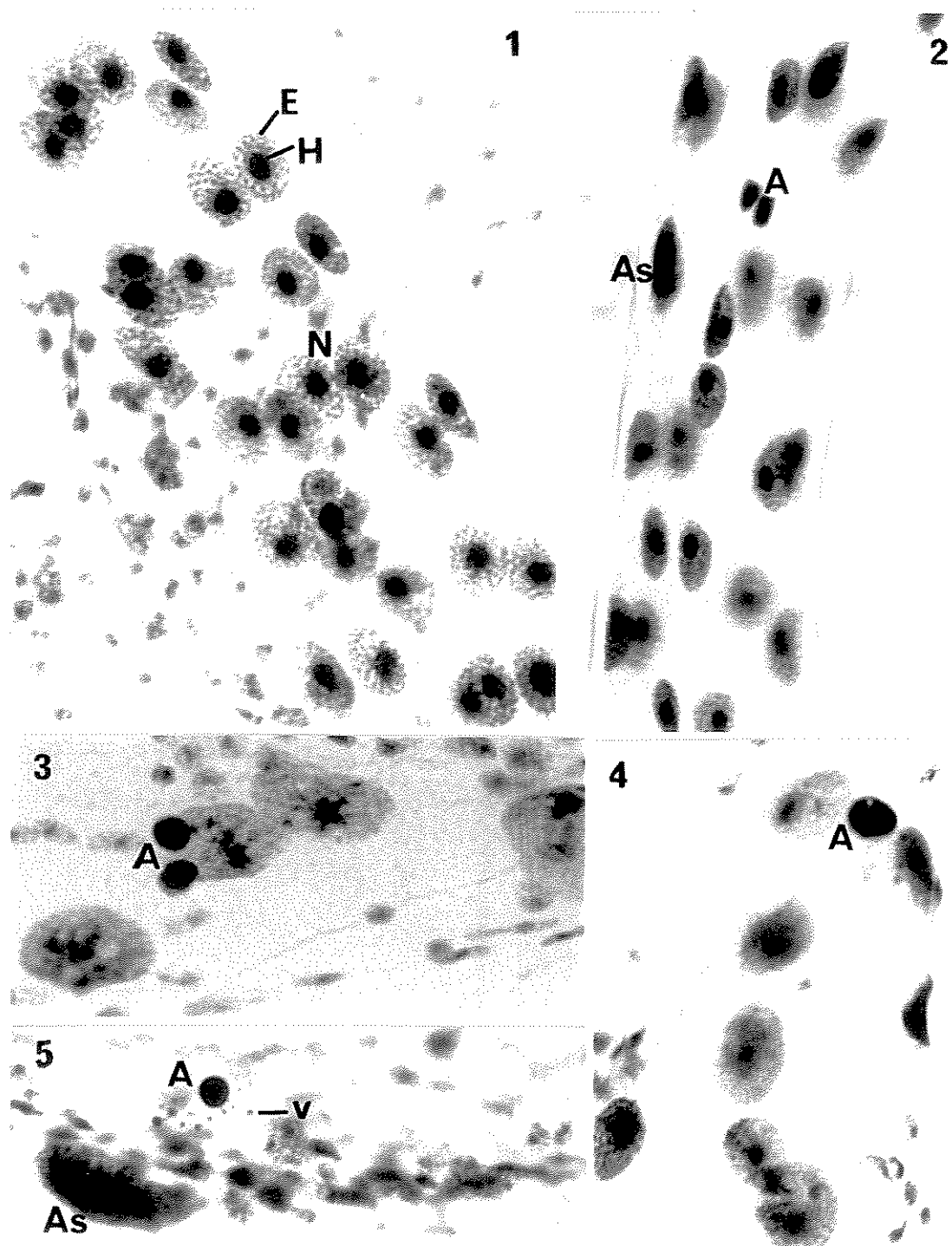
4. RESULTADOS

4.1. Apoptose e fenótipos nucleares: aspectos descritivos qualitativos

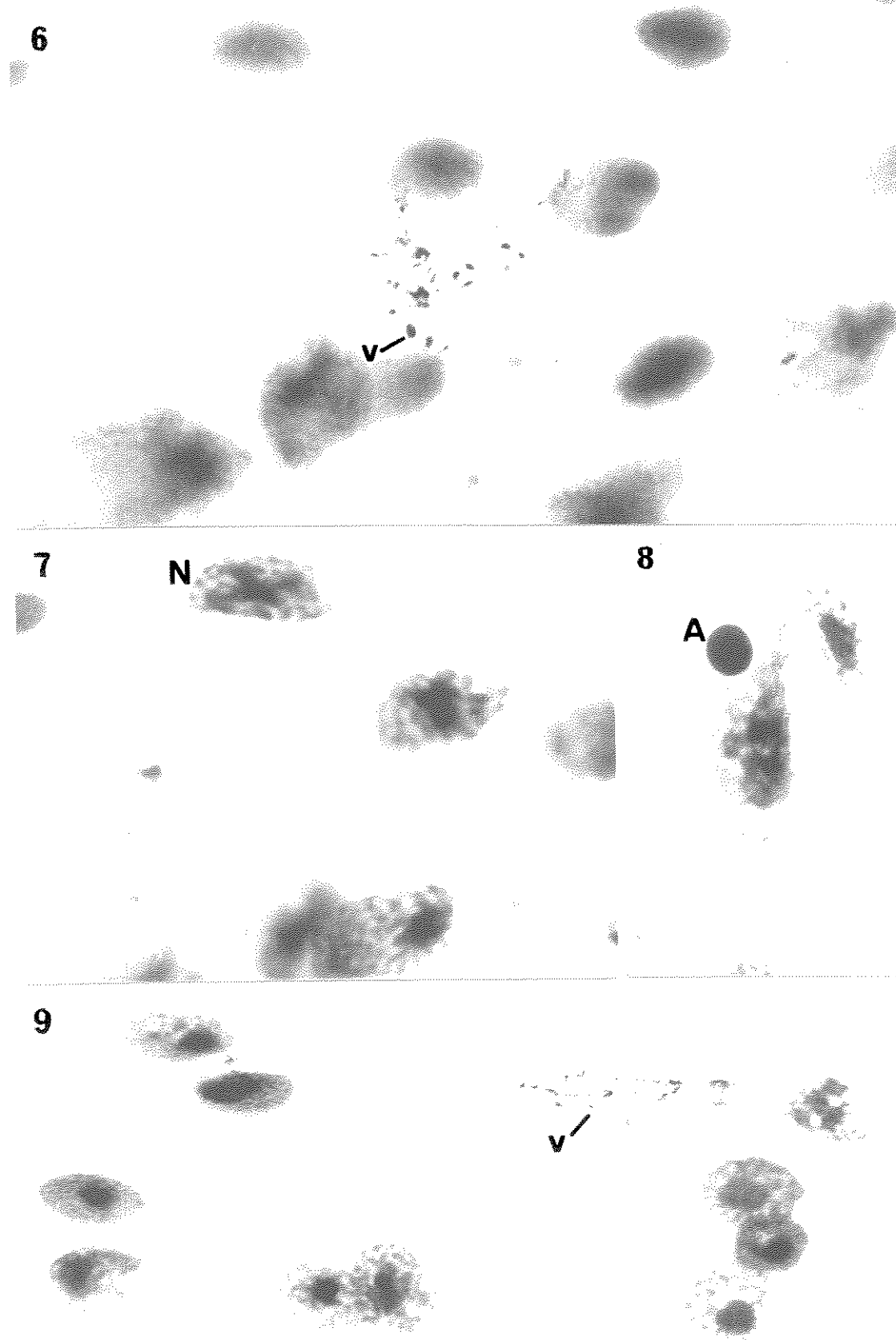
A análise dos preparados submetidos à reação de Feulgen indicou a presença de núcleos apoptóticos em túbulos de Malpighi de espécimes controle e naqueles submetidos ao choque, tanto em ninfas de 4^o estadio como nos adultos, embora com variações individuais.

Os núcleos apoptóticos apresentam morfologia típica, identificável com a reação de Feulgen, salientando intensa compactação cromatínica que gera um único corpo nuclear fortemente corado (Figs. 2-4) e, a partir deste, brotamento de vesículas de tamanho variável (corpos apoptóticos) (Fig. 5) e/ou fragmentação nuclear. Observou-se que os corpos apoptóticos mais pulverizados não somente são Feulgen positivos, mas também respondem positivamente ao ApopTagTM (Figs. 6,7,9,20,21). Já os núcleos densamente compactados e corpos apoptóticos maiores não foram vistos marcados pelo teste imunocitoquímico (Figs. 8,20,21). Células apoptóticas de timo de rato e células V79, utilizadas como controle positivo da reação com o ApopTagTM exibiram a resposta esperada (Vidal et al., 1996).

Os núcleos apoptóticos dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* apresentam, portanto, fenótipos bem distintos dos usuais normais, que se caracterizam pela presença de um ou mais corpos heterocromáticos conspícuos (cromocentros) em meio à cromatina finamente granular e de distribuição homogênea (Mello, 1971,1978a) (Figs.1-3). Nestes não se detectou marcação com o teste pelo ApopTagTM (Figs. 6-9).



Figs 1-5. Fenótipos nucleares e apoptose em células epiteliais de túbulos de Malpighi de *T. infestans*. Reação de Feulgen. A: apoptose, As: suspeito de apoptose, E: eucromatina, H: heterocromatina, N: fenótipo usual, v: vesículas apoptóticas. X 560.



Figs 6-9. Apoptose em células epiteliais de túbulos de Malpighi de *T. infestans*. ApopTagTM. 6 e 7 (X 896), mesmo campo, com diferentes profundidades de foco. A: apoptose, N; fenótipo usual, v: vesículas apoptóticas. 8 e 9 (X 560).

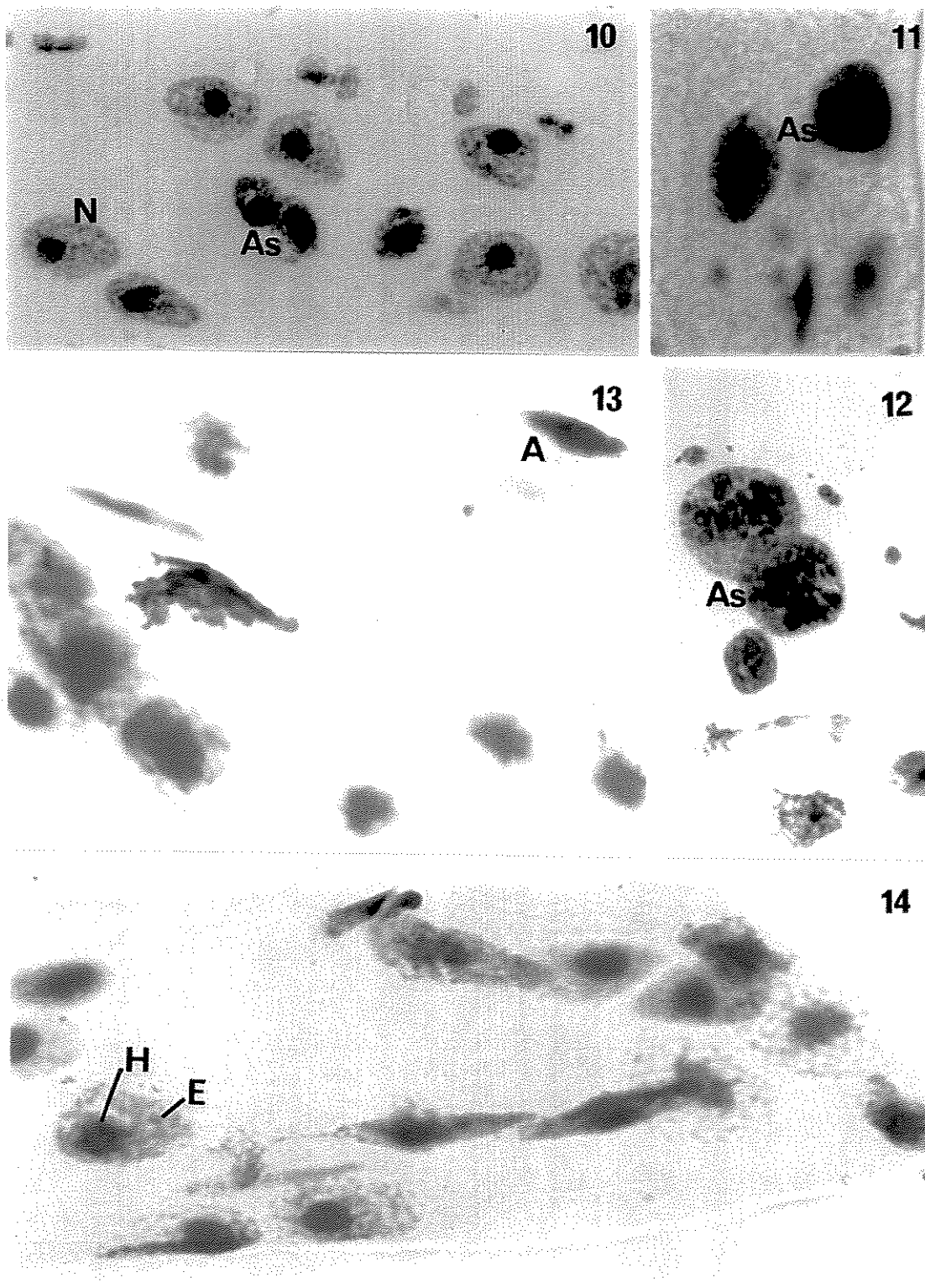
Foram também observados núcleos nos quais se distinguíam um ou mais cromocentros, aparentemente mais expandidos, enquanto a eucromatina, fortemente corada, cobria área ligeiramente menor do que nos núcleos usuais (Figs.10-12). Esses núcleos foram considerados suspeitos de início de apoptose. De fato, em preparados submetidos ao ApopTagTM, núcleos desse tipo, embora nem todos, foram vistos exibindo marcação positiva apenas na sua área eucromática (Figs.13,14), que representa uma cromatina naturalmente mais frouxa (Mello, 1983a). Núcleos apoptóticos ou suspeitos foram muitas vezes vistos posicionados juntos à porção celular mais basal (Figs. 13,15,16).

Foi comum a observação de núcleos apoptóticos ou suspeitos de apoptose aos pares, o que significa que os dois núcleos de uma mesma célula sofrem o processo de apoptose simultaneamente (Figs. 2,3,6,10-12,15). A binucleação em células de triatomíneos é usual (Mello, 1978b; Mello & Vidal, 1980).

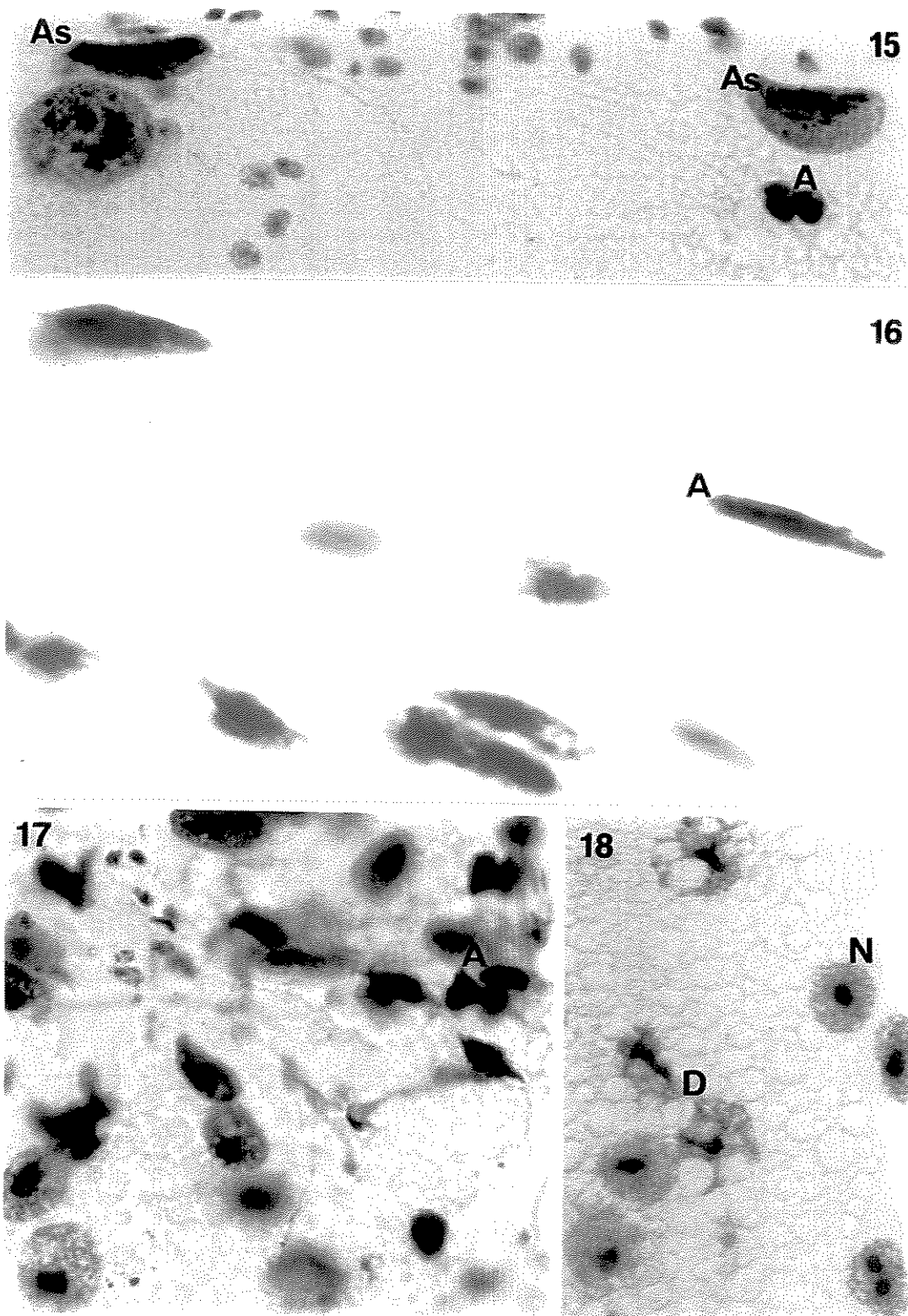
Porém também ocorrem núcleos apoptóticos isolados num campo (Figs. 5,8,15) e que podem bem representar núcleos previamente fundidos (Mello, 1978b, 1989; Andrade & Mello, 1987).

Núcleos apoptóticos acumulados em um mesmo campo dos túbulos de Malpighi foram frequentes nos insetos dissecados 7 dias após o choque (Fig. 17).

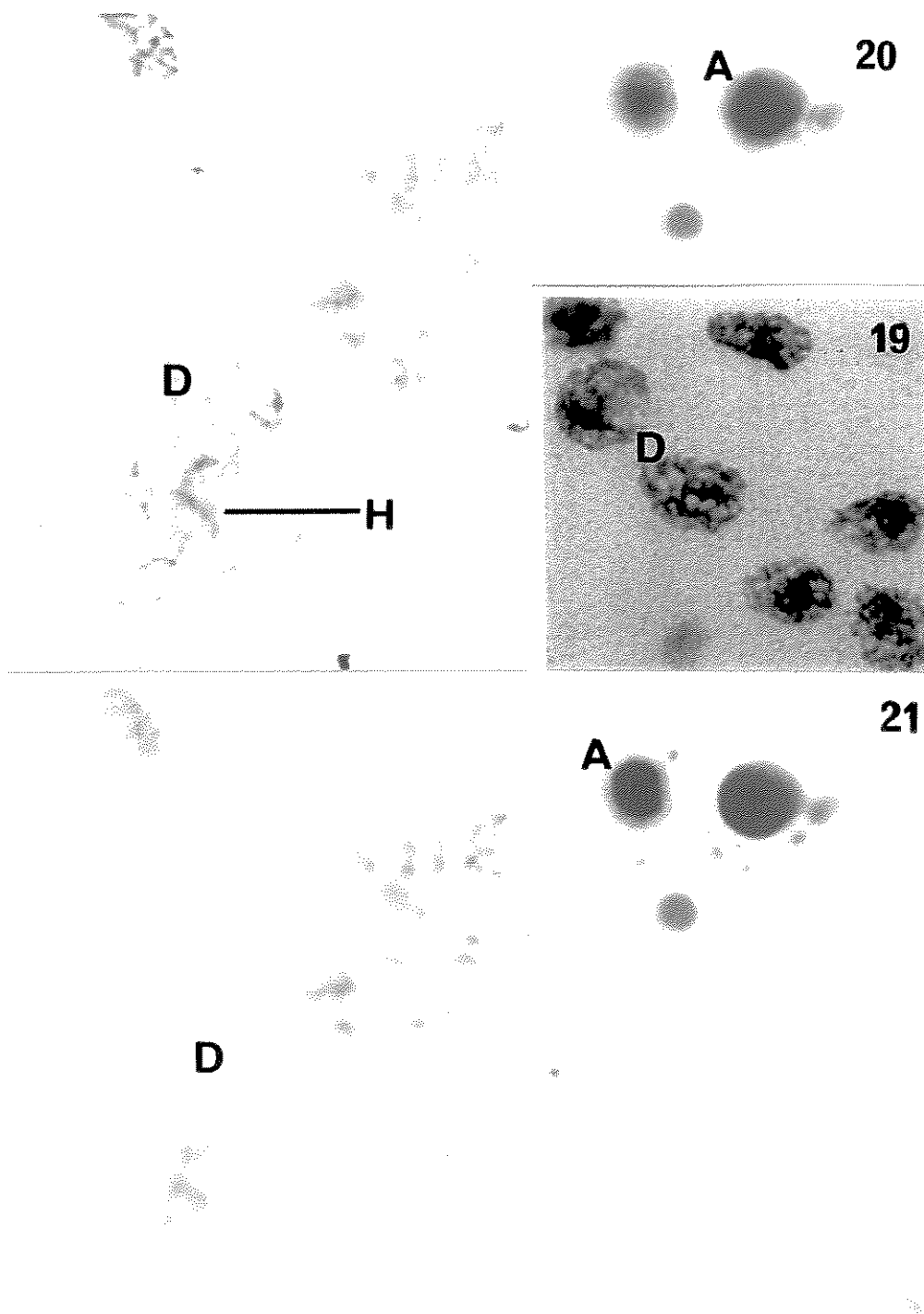
Foram também observados nos insetos submetidos ao choque núcleos com aspectos degenerativos típicos de necrose (Figs. 18-21). Nestes núcleos, quando a necrose era um processo avançado, foi constatada resposta positiva ao ApopTagTM (Figs. 20-21). Além de terem sido vistos núcleos com eucromatina e heterocromatina totalmente descompactadas, aspectos típicos de necrose (Fig. 22), foram também encontrados núcleos com parcial descompactação da heterocromatina (Figs. 23 e 24).



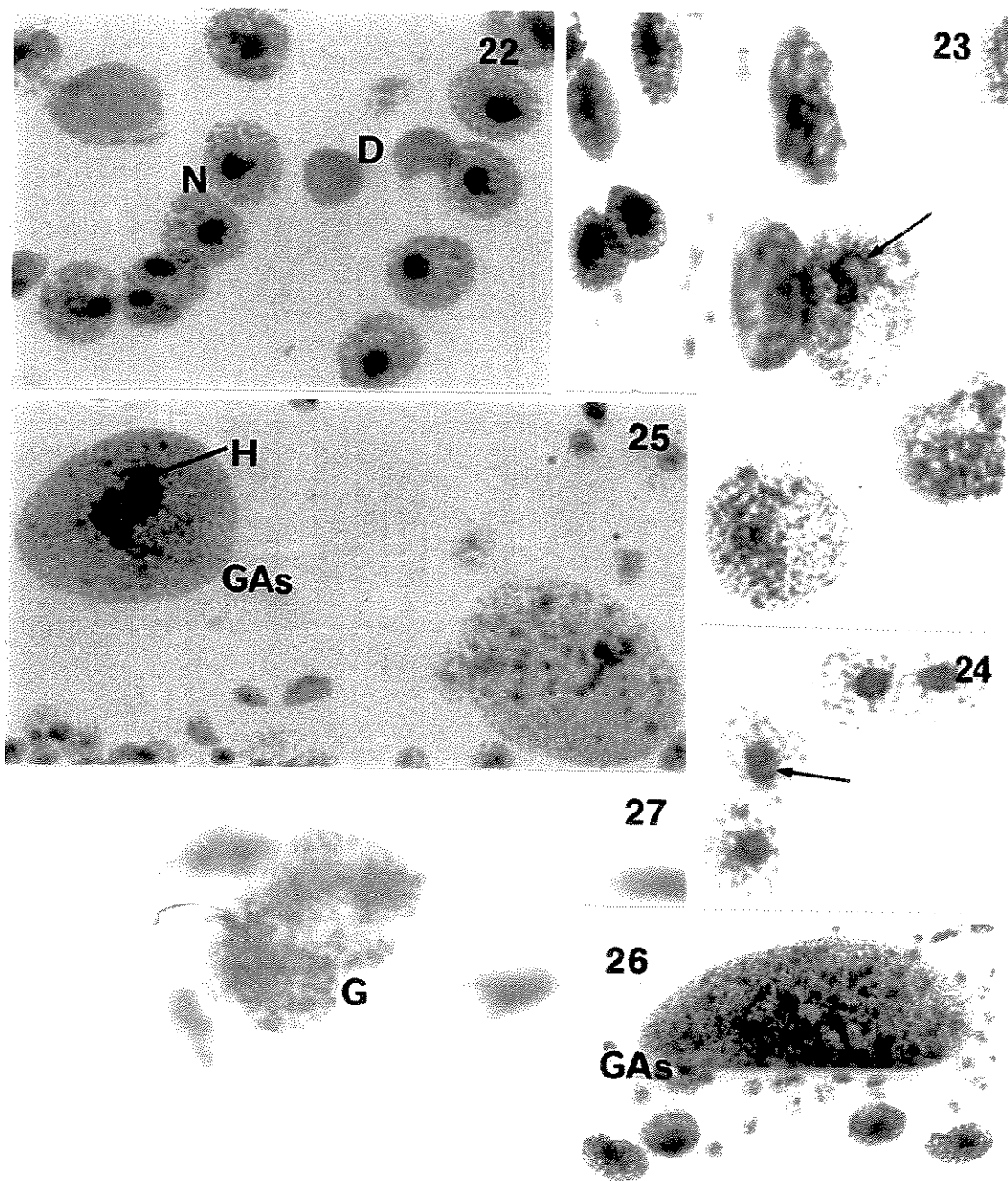
Figs 10-14. Fenótipos nucleares e apoptose em células epiteliais de túbulos de Malpighi de *T. infestans*. 10-12, Reação de Feulgen (X 560); 13,14 ApopTagTM (X 896) A: apoptose, As: suspeito de apoptose, E: eucromatina, H: heterocromatina, N: fenótipo usual.



Figs 15-18. Fenótipos nucleares e apoptose em células epiteliais de túbulos de Malpighi de *T. infestans*. 15,17,18, Reação de Feulgen (X 560). 16 ApopTagTM (X 896) A: apoptose, As: suspeito de apoptose, D: degenerações necróticas, N: fenótipo usual.



Figs 19-21. Apoptose e necrose em células epiteliais de túbulos de Malpighi de *T. infestans*. 19, Reação de Feulgen (X 560). 20,21, ApopTagTM (X 896)- mesmo campo com diferentes profundidades de foco. É salientado um núcleo em estado avançado de degenerações respondendo positivamente ao ApopTagTM, enquanto núcleos apoptóticos muito condensados aparecem apenas corados com o verde de metila. A:apoptose, D:degenerações necróticas, H: heterocromatina.



Figs 22-27. Fenótipos nucleares em células de túbulos de Malpighi de *T. infestans*. 22-26, Reação de Feulgen; 27 (X 896), ApopTagTM, salientando resposta positiva em núcleos em processo de fusão. As: suspeito de apoptose, D: degeneração, G: gigante, H: heterocromatina, N: fenótipo usual. setas: áreas heterocromáticas em descompactação. 22-25(X 560), 26 (X 357).

Núcleos gigantes, originados por fusão nuclear, foram também frequentes nos insetos submetidos ao choque (Figs. 25-27). Parte destes exibiu sinais suspeitos de apoptose (Fig. 26), o que aparece confirmado em dois núcleos completando a fusão (Fig.27). Núcleos gigantes podem também sofrer degenerações necróticas.

Quanto à identificação de núcleos apoptóticos em túbulos de Malpighi de *T. infestans* com o método de CEC mostrou-se tarefa possível porém extremamente dificultosa, dado o tipo de material e os preparados em estudo.

Foram encontrados poucos núcleos com a cromatina altamente compactada, bem corada em verde, lembrando a resposta de núcleos apoptóticos de outros materiais, como células V79 (Vidal et al., 1996) (Fig. 28a). No entanto em *T. infestans* os núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi apresentam grandes corpos heterocromáticos (Mello, 1971, 1983a, 1997) cuja cor de basofilia, após método de CEC é também verde (Fig.28b). Embora os corpos heterocromáticos sejam menores que os núcleos apoptóticos apontados na Fig.28a. e sua intensidade de coloração mais fraca do que a destes, a procura pelos núcleos apoptóticos simplesmente com base em tipo e intensidade de cor é dificultada neste material.

Por outro lado, a metacromasia devida a RNA nos túbulos de Malpighi de *T. infestans* não pôde ser correlacionada a relocações desse componente com a apoptose. O RNA identificado com o método de CEC mostrou distribuição variada, desde aquela fina e homoganeamente localizada (Fig. 28b) até aquela sob a forma de glóbulos de tamanho variado, facilmente discriminados como citoplasmáticos em algumas células, (Fig. 29a-c) porém de mais difícil diagnóstico em outras (Fig. 29d).

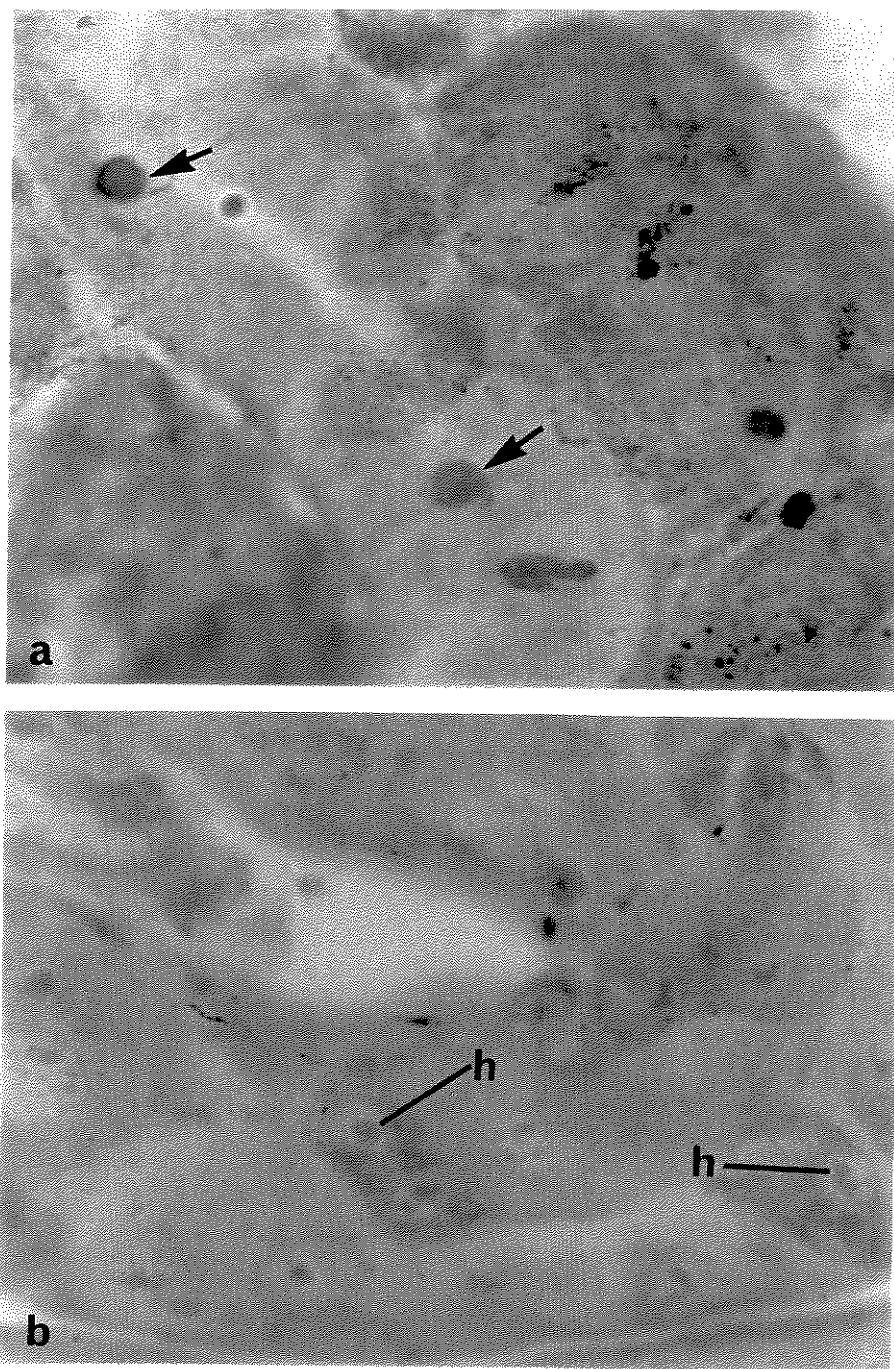


Fig 28. Células de túbulos de Malpighi de *T. infestans* submetidas ao método de CEC. a. Núcleos apoptóticos indicados por setas. b. Metacromasia devida a RNA citoplasmático; heterocromatina (h) bem identificada em verde. X 560.

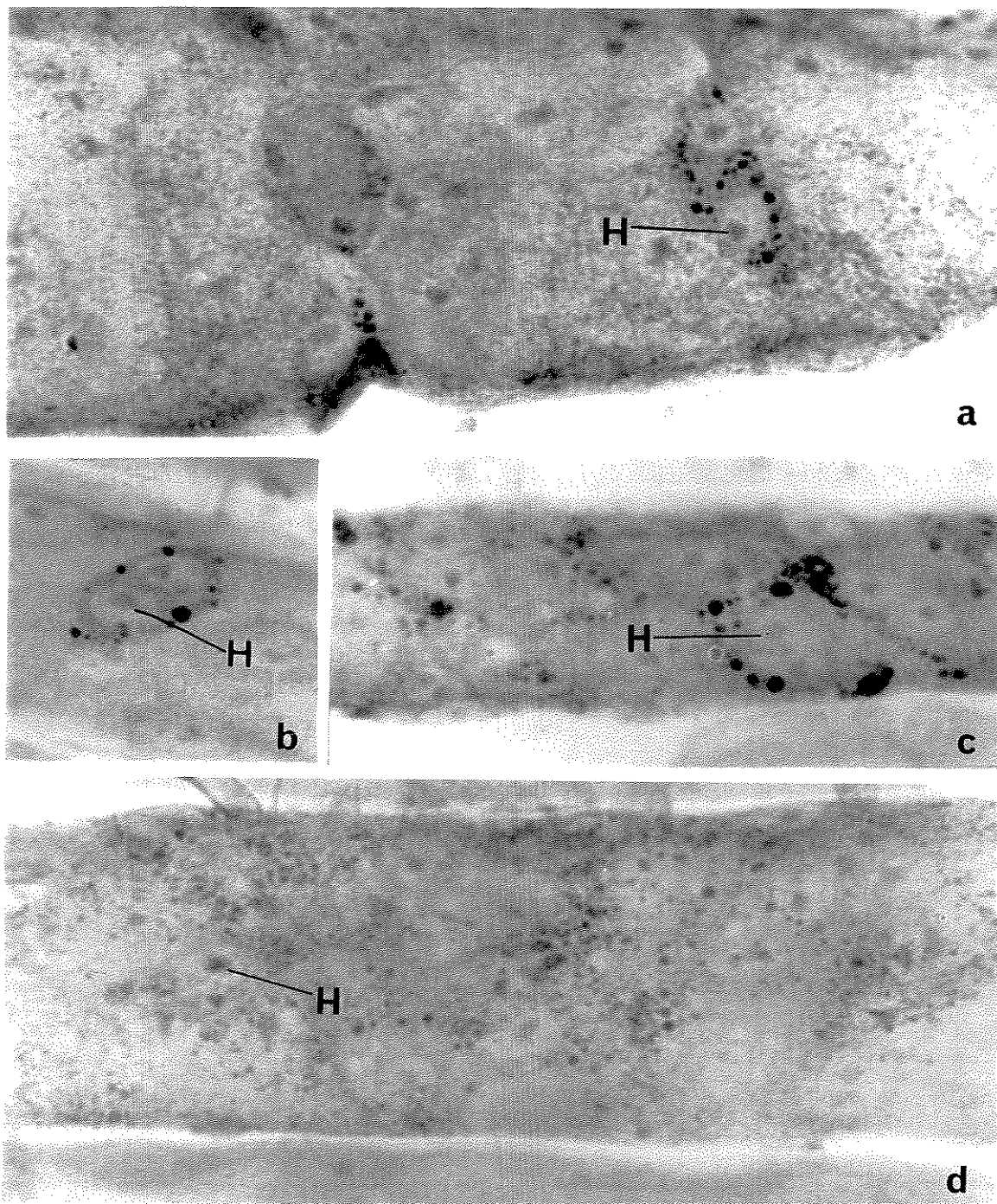


Fig 29 (a-d). Metacromasia devida a RNA em células de túbulos de Malpighi submetidas ao método de CEC. **H**, heterocromatina. X 560.

4.2. Frequência de apoptose e de outros fenótipos nucleares

As frequências absolutas e relativas de apoptose e dos outros fenótipos nucleares observados em células epiteliais dos túbulos de Malpighi de ninfas de 4^o estadio e adultos de *T. infestans* submetidos a condições controle de temperatura e ao choque térmico, bem como à variação na condição alimentar, são mostradas nas Tabelas 1 a 4.

Optou-se pelo relato de dados por espécime visto serem comuns nesses insetos variações individuais frente a agentes estressantes (Andrade & Mello, 1987; Mello, 1989; Dantas & Mello, 1992; Mello et al, 1995).

Em ninfas de 4^o estadio **bem alimentadas** os núcleos usuais normais apareceram com uma frequência absoluta sensivelmente maior nos espécimes controle, quando comparados aos submetidos ao choque (Tabela 1)

Células apoptóticas foram detectadas tanto nos espécimes controle como nos submetidos ao choque. No entanto, houve um achado de altos níveis de apoptose em um dos exemplares controle que apresentou também alta frequência de núcleos com heterocromatina descompactada, o que fala em favor de que essas características possam ter sido induzidas por agentes outros que temperatura, mesmo em condições de insetário, onde presume-se uma homogeneidade de condições ambientais.

Outros fenótipos alterados, como núcleos gigantes (G), originados por fusão nuclear, apareceram apenas em alguns poucos insetos, enquanto núcleos gigantes com degenerações necróticas (GD) não foram detectados em nenhum dos exemplares analisados e núcleos gigantes suspeitos de apoptose (GAs) em apenas um exemplar. Núcleos com heterocromatina descompactada (HD) apareceram em

todos os exemplares, mas com baixa frequência, à exceção do caso particular descrito acima (Tabela 1).

Com relação às ninfas de 4^o estadio submetidas a um **jejum moderado**, embora tenham sido detectadas apoptoses nas células dos espécimes controle, a frequência absoluta destas nos espécimes submetidos ao choque térmico foi sensivelmente maior. Dentre os insetos submetidos ao choque, a incidência de apoptose foi muito maior nas ninfas dissecadas 7 dias após o choque térmico. Em termos de frequência relativa, a incidência de apoptose 7 dias após o choque chegou a aumentar quase 10X, um valor tão alto provavelmente porque houve redução na frequência nuclear geral (Tabela 2).

Quanto à suspeita de apoptose em núcleos de tamanho próximo ao usual (As), apenas em termos de frequência relativa houve um ligeiro aumento nos espécimes 7 dias pós-choque, em relação ao controle, possivelmente pelo mesmo motivo citado acima.

O fenótipo usual normal (N), apareceu com uma frequência absoluta sensivelmente maior nos espécimes controle quando comparado aos submetidos ao choque hipertérmico, como nos espécimes submetidos ao padrão normal de alimentação (Tabelas 1 e 2).

Com relação aos outros fenótipos alterados, como núcleos gigantes (G), núcleos gigantes em degeneração (GD), núcleos gigantes suspeitos de apoptose (GAs) e núcleos com heterocromatina descompactada (HD), já descritos sob o efeito do choque térmico em *T. infestans* (Dantas & Mello, 1992), foram eles também detectados nos controles, embora nestes aparentemente ocorram com frequência mais baixa (Tabela 2).

Tab 1-Frequência de apoptose e de outros fenótipos nucleares em túbulos de Malpighi de **ninfas de 4º estado** de *T. infestans* submetidas a choque térmico de 40°C por 1 hora. **Espécimes bem alimentados. Reação de Feulgen.**

Condições experimentais	Nº total de núcleos/espéc.	N	A	As	D	G	GAs	GD	HD
controle	9148	8015 87,61%	22 0,24%	735 8,03%	364 3,98%	-	-	-	12 0,13%
	10496	8581 81,75%	33 0,31%	1420 13,53%	445 4,24%	3 0,03%	2 0,02%	---	12 0,11%
	10001	7758 77,57%	17 0,17%	1103 11,02%	1104 11,03%	-	-	-	19 0,19%
7 dias pós-choque	5978	5080 84,97%	8 0,13%	386 6,45%	483 8,08%	-	-	-	21 0,35%
	9139	8088 88,49%	29 0,32%	535 5,85%	469 5,13%	1 0,01%	-	-	17 0,21%
	6784	5803 85,53%	21 0,31%	573 8,45%	377 5,55%	-	-	-	10 0,14%
controle	9399	7832 83,33%	998 10,62%	42 0,44%	413 4,39%	-	-	-	114 1,12%
	11795	10215 86,6%	12 0,10%	931 7,89%	614 5,20%	5 0,04%	-	-	22 0,18%
	10946	9201 84,05%	13 0,12%	640 5,85%	1067 9,74%	5 0,04%	-	-	20 0,18%
14 dias pós-choque	8771	7250 82,65%	6 0,06%	485 5,52%	996 11,35%	1 0,01%	-	-	33 0,37%
	10958	8711 79,49%	8 0,07%	969 8,84%	1230 11,22%	5 0,04%	-	-	35 0,31%
	9624	8333 86,58%	12 0,12%	683 7,09%	555 5,76%	4 0,04%	-	-	37 0,38%
controle	8945	8230 92,00%	4 0,04%	370 4,13%	333 3,72%	-	-	-	8 0,08%
	8099	7060 87,17%	5 0,06%	382 4,71%	640 7,91%	-	-	-	12 0,14%
	9584	8173 85,27%	6 0,06%	668 6,96%	704 7,34%	-	-	-	33 0,34%
30 dias pós-choque	7022	6417 91,38%	8 0,11%	346 4,93%	171 2,43%	-	-	-	20 0,28%
	7361	6556 89,06%	1 0,01%	520 7,06%	252 3,42%	1 0,01%	-	-	31 0,42%
	7434	6855 92,21%	1 0,01%	354 4,76%	206 2,77%	-	-	-	18 0,24%

A: apoptose; As: fenótipo normal suspeito de apoptose; D: degeneração necrótica; G: gigante; GAs: gigante suspeito; GD: gigante com degeneração necrótica; HD: heterocromatina descompactada; N: normal usual, caracterizado pela presença de um ou mais corpos heterocromáticos.

Tab 2- Frequência de apoptose e de outros fenótipos nucleares em túbulos de Malpighi de ninfas de 4º estadio de *T. infestans* submetidas a choque térmico de 40°C por 1 hora. Espécimes sob jejum moderado. Reação de Feulgen.

Condições experimentais	Nº total de núcleos/espéc..	N	A	As	D	G	Gas	GD	HD
controle	11951	10340 86,52%	22 0,18%	1301 10,88%	192 1,61%	22 0,18%	9 0,07%	-	65 0,54%
	11233	9863 87,80%	43 0,38%	1156 10,30%	102 0,91%	4 0,03%	1 0,01%	-	54 0,48%
	12533	11266 89,89%	38 0,30%	873 6,96%	221 1,76%	62 0,49%	19 0,15%	-	54 0,43%
7 dias pós-choque	7671	5804 75,66%	161 2,10%	1040 13,56%	315 4,11%	203 2,65%	45 0,59%	49 0,64%	54 0,70%
	6404	4821 75,28%	106 1,65%	1100 17,18%	281 4,39%	24 0,38%	30 0,47%	2 0,03%	40 0,62%
	6936	5511 79,45%	71 1,02%	619 8,92%	403 5,81%	193 2,78%	59 0,85%	43 0,62%	37 0,53%
controle	11463	10826 94,44%	26 0,23%	416 3,63%	94 0,82%	23 0,20%	25 0,22%	-	53 0,46%
	9782	8914 91,12%	32 0,38%	595 6,08%	97 0,99%	31 0,32%	11 0,11%	1 0,01%	101 1,03%
	9030	8314 92,07%	28 0,31%	365 4,04%	119 1,31%	37 0,41%	5 0,05%	1 0,01%	161 1,78%
14 dias pós-choque	5475	4877 89,07%	26 0,47%	280 5,11%	194 3,54%	29 0,52%	27 0,49%	-	42 0,77%
	11987	11101 92,60%	40 0,33%	546 4,55%	172 1,43%	40 0,33%	11 0,09%	-	77 0,64%
	11288	10302 91,26%	54 0,48%	698 6,18%	61 0,54%	104 0,92%	20 0,18%	-	49 0,43%
controle	8674	7930 91,42%	7 0,08%	321 3,70%	360 4,15%	31 0,36%	2 0,02%	6 0,07%	17 0,19%
	11185	10205 91,24%	12 0,10%	426 3,80%	512 4,58%	5 0,04%	6 0,05%	-	19 0,17%
	8151	7193 88,25%	8 0,09%	609 7,48%	324 3,97%	7 0,08%	-	-	10 0,12%
30 dias pós-choque	11976	10926 91,23%	14 0,11%	688 5,74%	315 2,63%	9 0,07%	1 0,01%	-	23 0,19%
	8935	7784 87,11%	23 0,26%	785 8,78%	216 2,41%	93 1,04%	12 0,13%	9 0,1%	13 0,14%
	10583	9341 88,26%	7 0,06%	692 6,54%	522 4,93%	11 0,1%	-	1 0,01%	9 0,08%

A: apoptose; As: fenôtipo normal suspeito de apoptose; D: degeneração necrótica; G: gigante; Gas: gigante com degeneração necrótica; GD: heterocromatina descompactada; N: normal usual, caracterizado pela presença de um ou mais corpos heterocromáticos.

Em espécimes adultos **bem alimentados** detectaram-se apoptoses tanto nos espécimes controle, como nos submetidos ao choque, mas em ambos a frequência foi muito baixa (Tabela 3).

Quanto à suspeita de apoptose em núcleos de tamanho próximo ao usual (As), aparentemente não houve diferenças em relação à frequência absoluta, induzidas pelo choque.

Os fenótipos alterados, como núcleos gigantes (G), bem como núcleos suspeitos de apoptose (GAs) apareceram com frequência muito baixa. Quanto ao fenótipo gigante com degenerações necróticas (GD), foram detectados alguns poucos núcleos em apenas um exemplar, enquanto núcleos com heterocromatina descompactada (HD) apareceram também com baixa frequência, porém em todos os exemplares (Tabela 3).

Com relação a adultos sob condição de **jejum moderado**, detectou-se apoptose tanto nos espécimes controle como nos submetidos ao choque térmico, em frequência tão baixa como nos insetos bem alimentados e sem diferir com o choque (Tabela 4).

O mesmo pareceu ocorrer com os núcleos de tamanho semelhante ao usual e suspeitos de apoptose (As).

Como nas condições precedentes, o fenótipo usual normal (N), apresentou-se com maior frequência tanto nos insetos controle, como nos submetidos ao choque térmico (Tabela 4).

Os fenótipos alterados, como núcleos gigantes (G), núcleos gigantes com degenerações necróticas (GD) bem como núcleos gigantes suspeitos de apoptose (GAs) foram raramente detectados e núcleos com heterocromatina descompactada (HD) foram observados em baixa frequência, porém em todos os exemplares, da mesma maneira do que para os espécimes adultos bem alimentados (Tabela 3 e 4).

Tab 3- Frequência de apoptose e de outros fenótipos nucleares em túbulos de Malpighi de adultos de *T. infestans* submetidos a choque térmico de 40°C por 1 hora. Especímenes bem alimentados. Reação de Feulgen.

Condições experimentais	Nº total de núcleos/espec	N	A	As	D	G	GAs	GD	HD
controle	8717	8098 92,89%	9 0,10%	327 3,75%	255 2,92%	9 0,10%	-	-	19 0,21%
	8016	7580 94,56%	1 0,01%	327 4,08%	104 1,29%	-	-	-	4 0,04%
	7370	7005 95,04%	7 0,09%	202 2,74%	144 1,95%	9 0,12%	-	-	3 0,04%
7 dias pós-choque	9072	8675 95,62%	-	325 3,58%	57 0,63%	-	-	-	15 0,16%
	8355	7754 92,75%	3 0,03%	379 4,53%	206 2,46%	-	-	-	13 0,15%
	6314	6076 96,23%	-	90 1,42%	143 2,26%	-	-	-	5 0,07%
controle	9625	8550 88,83%	-	771 8,01%	294 3,05%	-	-	-	10 0,10%
	10151	9063 89,28%	-	633 6,23%	372 3,66%	55 0,54%	1 0,01%	7 0,06%	20 0,19%
	8204	7490 91,29%	3 0,03%	547 6,66%	153 1,86%	2 0,02%	-	-	9 0,10%
14 dias pós-choque	6230	5533 88,81%	1 0,01%	334 5,36%	355 5,69%	-	-	-	7 0,11%
	8747	8070 92,26%	8 0,09%	564 6,44%	93 1,06%	-	-	-	12 0,13%
	7169	6526 91,03%	1 0,01%	353 4,92%	280 3,90%	-	-	-	9 0,12%
controle	9476	8578 90,52%	3 0,03%	593 6,26%	286 3,01%	-	-	-	16 0,17%
	9917	9012 90,87%	-	537 5,41%	250 2,52%	1 0,01%	-	-	14 0,14%
	10629	9830 92,48%	-	424 3,99%	354 3,33%	-	6 0,06%	-	15 0,14%
30 dias pós-choque	7967	7388 92,73%	2 0,02%	418 5,24%	251 3,15%	-	-	-	8 0,10%
	8756	8042 91,84%	5 0,05%	394 4,50%	301 3,44%	2 0,02%	-	-	12 0,14%
	8979	8262 92,01%	2 0,02%	405 4,51%	299 3,33%	-	-	-	11 0,12%

A: apoptose; As: fenótipo normal suspeito de apoptose; D: degeneração necrótica; G: gigante, GAs: gigante suspeito; GD: gigante com degeneração necrótica; HD: heterocromatina descompactada; N: normal usual, caracterizado pela presença de um ou mais corpos heterocromáticos.

Tab 4 - Frequência de apoptose e de outros fenótipos nucleares em túbulos de Malpighi de **adultos** de *T. infestans* submetidos a choque térmico de 40°C por 1 hora. **Espécimes sob jejum moderado**. Reação de Feulgen.

Condições experimentais	Nº total de núcleos/esp.éc.	N	A	As	D	G	GAs	GD	HD
controle	10017	9501 94,84%	3 0,02%	221 2,2%	272 2,71%	2 0,09%	-	-	18 0,18%
	10848	8980 82,78%	3 0,02%	569 5,24%	1269 11,69%	17 0,15%	1 0,01%	-	9 0,08%
	7912	7209 91,10%	2 0,02%	256 3,23%	438 5,50%	-	-	-	7 0,08%
	8516	7656 89,90%	3 0,03%	546 6,41%	264 3,10%	37 0,43%	3	-	7 0,08%
7 dias pós-choque	7085	6912 97,55%	1 0,01%	55 0,77%	110 1,55%	4 0,06%	-	-	3 0,04%
	9108	8686 95,36%	6 0,06%	218 2,39%	176 1,93%	12 0,13%	-	-	10 0,11%
	7952	7389 92,92%	1 0,01%	347 4,36%	205 2,57%	1 0,01%	-	-	9 0,11%
	8590	7560 88,00%	8 0,09%	659 7,67%	348 4,05%	1 0,01%	-	-	14 0,16%
14 dias pós-choque	7524	7019 93,28%	3 0,03%	322 4,27%	179 2,37%	-	-	-	1 0,01%
	9442	8733 92,49%	4 0,04%	518 5,48%	176 1,86%	-	-	-	11 0,11%
	6994	6586 94,16%	3 0,04%	230 3,28%	168 2,40%	-	-	-	7 0,10%
	7205	6802 94,40%	2 0,02%	281 3,90%	116 1,60%	-	-	-	4 0,05%
controle	11277	10303 91,36%	1 0,01%	450 3,99%	504 4,46%	1 0,01%	-	-	18 0,15%
	10092	9364 92,78%	-	367 3,63%	339 3,35%	11 0,10%	-	-	11 0,10%
	6689	6297 94,13%	-	202 3,01%	188 2,81%	-	-	-	2 0,02%
	8851	7927 89,56%	9 0,10%	589 6,65%	278 3,14%	32 0,36%	-	1 0,01%	15 0,16%
30 dias pós-choque	8274	7425 89,73%	6 0,07%	266 3,21%	561 6,78%	2 0,02%	-	-	14 0,16%
	8879	8081 91,01%	3 0,03%	410 4,61%	368 4,14%	3 0,03%	-	-	14 0,15%

A: apoptose; As: fenótipo normal suspeito de apoptose; D: degeneração necrótica; G: gigante; GAs: gigante suspeito; GD: gigante com degeneração necrótica;

HD: heterocromatina descompactada; N: normal usual, caracterizado pela presença de um ou mais corpos heterocromáticos.

4.3. Análise estatística dos fenótipos nucleares

4.3.1. Análise estatística para os fenótipos de ninfas sob condição de jejum moderado e bem alimentadas.

-Núcleos normais (Gráfico 1): Houve um aparente aumento em frequência de núcleos normais nos insetos em jejum quando comparados aos alimentados, mas esta diferença não foi significativa. Com relação à temperatura, os insetos submetidos ao choque apresentaram uma menor frequência de núcleos normais quando comparados aos controles. Observou-se também que a incidência de núcleos normais aumentou nos insetos sacrificados 14 dias pós-choque quando comparados aos sacrificados 7 e 30 dias pós-choque. Nos insetos controles sacrificados 14 dias pós-choque houve uma interação significativa (valor $p < 0,05$) com relação ao número de núcleos normais quando comparados com os insetos submetidos ao choque e sacrificados 7 e 30 dias pós-choque.

-Núcleos apoptóticos (Gráfico 2): Os núcleos apoptóticos foram visualizados com maior frequência nos insetos em jejum sob condição de choque e dissecados 7 dias pós-choque, sendo esta diferença estatisticamente significativa (valor $p < 0,05$). Observou-se que houve interação entre os vários fatores analisados, ou seja, as diferenças devidas a condições alimentares, ao choque térmico e ao dia de dissecação foram estatisticamente significantes (valor $p < 0,05$) e diferentes para as diversas combinações de fatores.

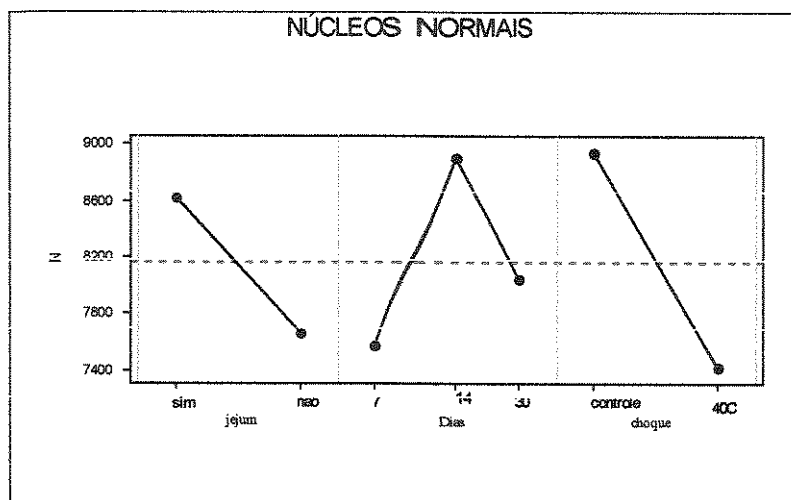


Gráfico-1

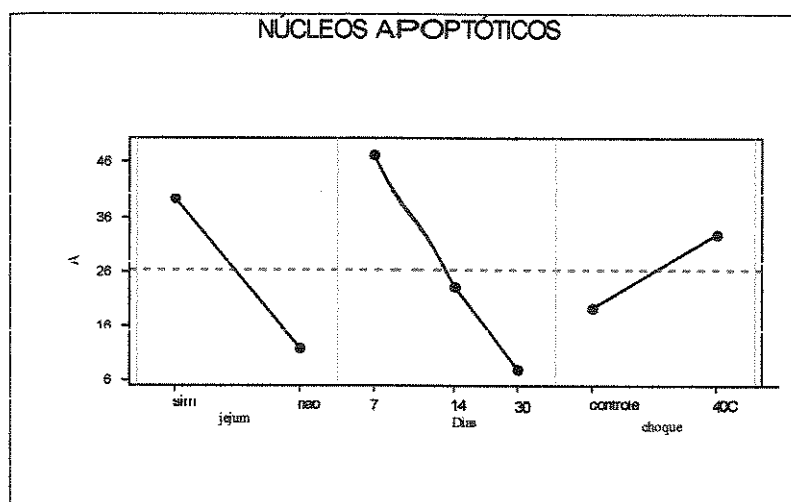


Gráfico-2

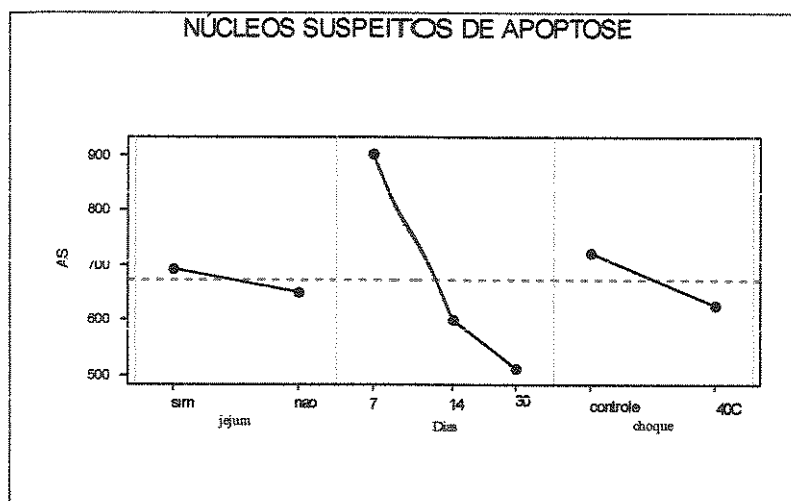


Gráfico-3

-Núcleos suspeitos de apoptose (Gráfico 3): Núcleos suspeitos de apoptose em insetos submetidos ao choque apresentaram uma frequência menor do que nos controles. Núcleos suspeitos de apoptose aparentemente aumentaram ligeiramente nos insetos em jejum quando comparados aos alimentados, mas essa diferença não foi significativa. Com relação aos dias de sacrifício, os insetos sacrificados 7 dias pós-choque apresentaram maior incidência de núcleos suspeitos de apoptose quando comparados aos de 14 e 30 dias pós-choque. Houve uma interação significativa (valor $p < 0,05$) entre a condição alimentar e os dias de sacrifício dos insetos, sendo que com 7 dias pós-choque foram encontrados mais núcleos suspeitos de apoptose.

-Núcleos com degenerações necróticas (Gráfico 4): Núcleos em degeneração apareceram com maior frequência nos insetos alimentados quando comparados aos insetos em jejum, sendo esta diferença significativa (valor $p < 0,05$). Com relação à temperatura houve uma ligeira diferença entre a incidência de núcleos em degeneração nos insetos controle e submetidos ao choque. Houve uma interação em relação à condição alimentar e os dias de dissecação sendo esta, estatisticamente significativa (valor $p < 0,05$).

-Núcleos com heterocromatina descompactada (Gráfico 5): Estes foram visualizados aparentemente com maior frequência nos insetos controle quando comparados aos submetidos ao choque, mas esta diferença não foi significativa. Os insetos em jejum e sacrificados 14 dias pós-choque apresentaram maior incidência de núcleos com heterocromatina descompactada, sendo esta estatisticamente significativa (valor $p < 0,05$). Houve uma interação significativa (valor $p < 0,05$) com

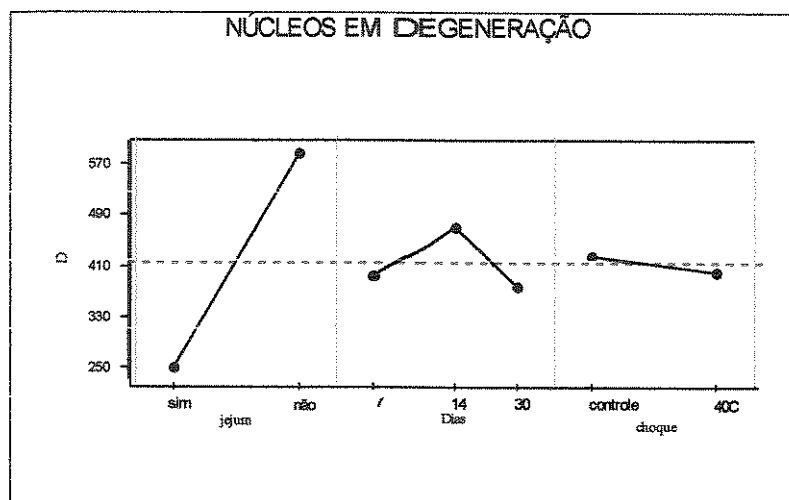


Gráfico-4

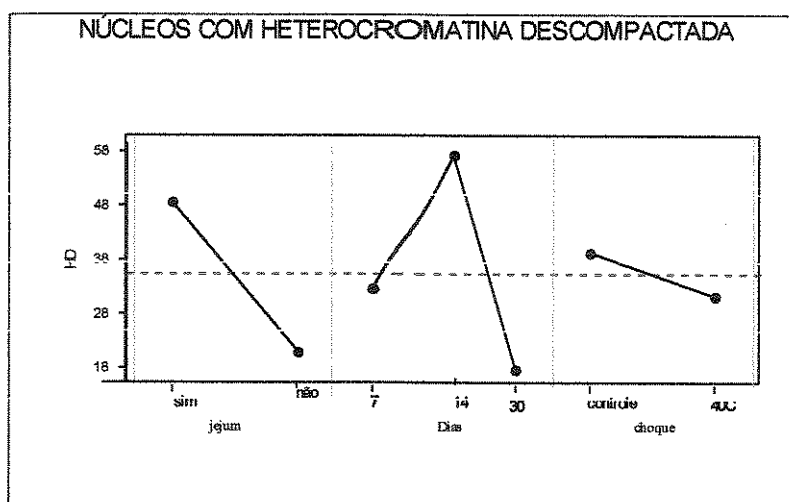


Gráfico-5

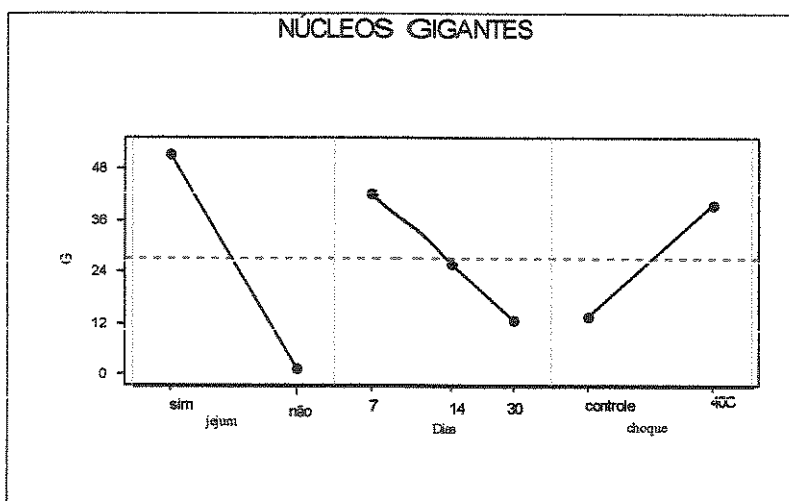


Gráfico-6

relação à condição alimentar e à situação de choque, e entre a condição alimentar e os dias de dissecação.

-Núcleos gigantes (Gráfico 6): Núcleos gigantes apareceram com frequência mais elevada nos insetos em jejum do que nos alimentados (valor $p < 0,05$), havendo uma interação desta condição alimentar com a situação de choque. Nos insetos sacrificados 7 dias pós-choque houve um maior número de núcleos gigantes quando comparados aos sacrificados 14 e 30 dias pós-choque.

-Núcleos gigantes suspeitos de apoptose (Gráfico 7): A frequência absoluta observada deste fenótipo torna inviável uma análise estatística. Através dos gráficos pode-se sugerir que tenha havido um decréscimo acentuado na frequência de núcleos suspeitos de apoptose nos insetos alimentados quando comparados aos insetos em jejum e sacrificados 30 dias pós-choque. Nos insetos submetidos ao choque observa-se uma maior incidência de núcleos gigantes suspeitos de apoptose quando comparados aos controles.

-Núcleos gigantes em degeneração (Gráfico 8): A frequência absoluta deste fenótipo torna inviável uma análise estatística. Através dos gráficos pode-se sugerir um decréscimo acentuado na frequência de núcleos gigantes em degeneração nos insetos alimentados quando comparados aos insetos em jejum. Observou-se também um maior número de núcleos gigantes em degeneração nos insetos submetidos ao choque e sacrificados 7 dias pós-choque.

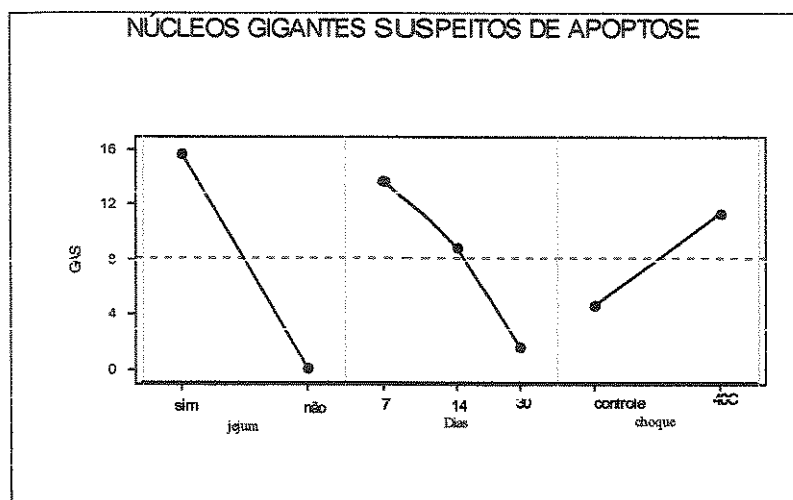


Gráfico-7

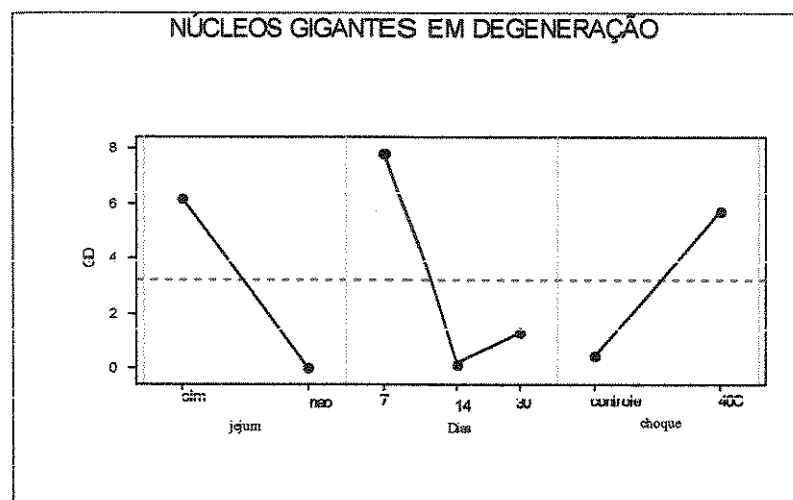


Gráfico-8

Gráficos 1-8. Efeitos principais dos fatores choque, alimentação e dias para dissecação, na frequência absoluta dos fenótipos nucleares de ninfas. A: Núcleos apoptóticos, As: Núcleos suspeitos de apoptose, D: Núcleos com degeneração necrótica, G: Núcleos gigantes, GAS: Núcleos gigantes suspeitos de apoptose, GD: Núcleos gigantes em degeneração, HD: Núcleos com heterocromatina descompactada.

4.3.2 Análise estatística para os fenótipos de adultos sob condição de jejum moderado e bem alimentados.

-Núcleos normais (Gráfico 9): Com relação ao número de núcleos normais nos insetos adultos, houve uma ligeira diferença entre os insetos em jejum quando comparados aos alimentados, sendo que esta diferença não foi significativa. Quando os insetos submetidos ao choque foram comparados aos controles, observa-se que os controles apresentaram maior frequência de núcleos normais, sendo esta diferença estatisticamente significativa (valor $p < 0,05$). Observou-se também que a incidência de núcleos normais era aparentemente menor nos insetos sacrificados 14 dias pós-choque quando comparados aos sacrificados 7 e 30 dias pós-choque, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa.

-Núcleos apoptóticos (Gráfico 10): Os núcleos apoptóticos foram visualizados aparentemente com maior frequência nos insetos em jejum sob condição de choque e dissecados 7 dias pós-choque, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Houve interação entre os fatores choque e dias, sendo esta estatisticamente significativa (valor $p < 0,05$).

-Núcleos suspeitos de apoptose (Gráfico 11): Núcleos suspeitos de apoptose aparentemente aumentaram ligeiramente nos insetos alimentados quando comparados aos submetidos ao jejum, mas essa diferença não foi significativa. Núcleos suspeitos de apoptose em insetos submetidos ao choque apresentaram uma frequência menor do que nos controles. Com relação aos dias de sacrifício, os insetos sacrificados 14 dias pós choque apresentaram maior incidência de núcleos

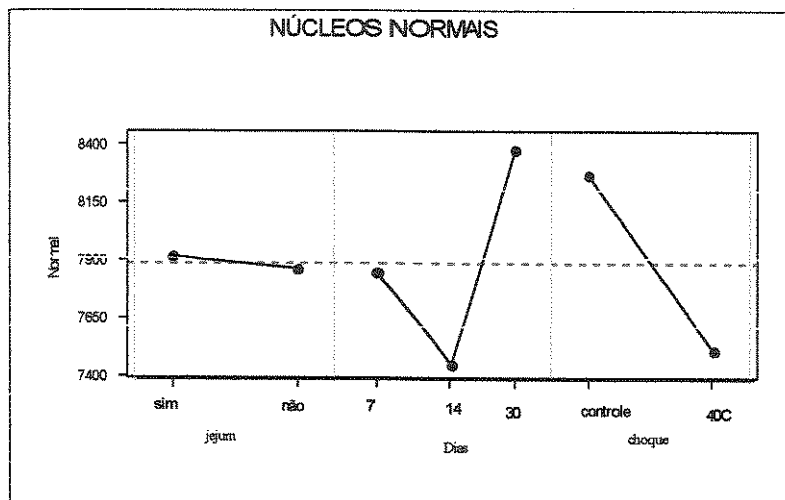


Gráfico-9

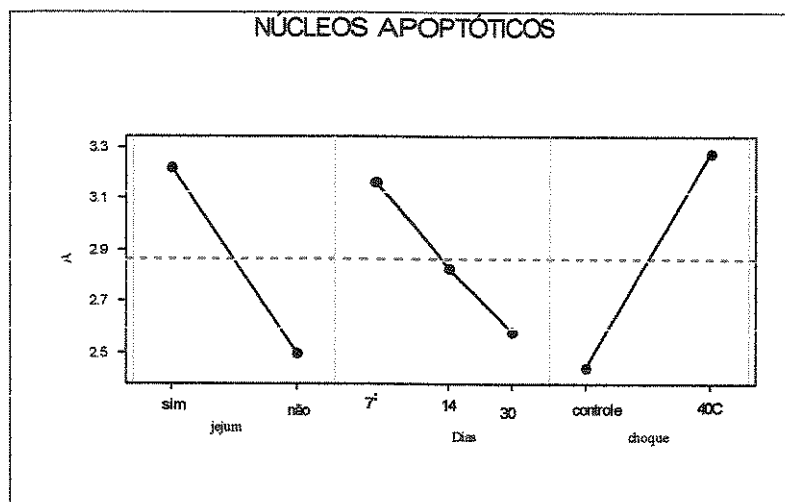


Gráfico-10

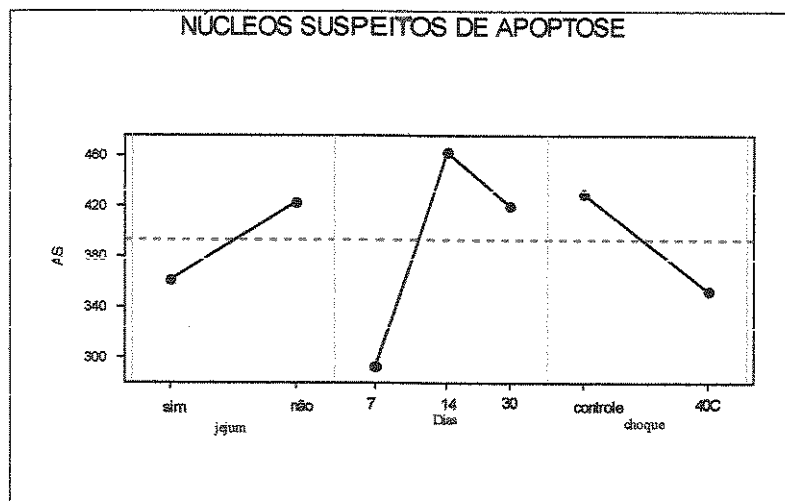


Gráfico-11

suspeitos de apoptose quando comparados aos de 7 e 30 dias pós-choque, sendo esta diferença estatisticamente significativa (valor $p < 0,05$).

-Núcleos com degenerações necróticas (Gráfico 12): Núcleos em degeneração aparentemente mostraram maior frequência nos insetos alimentados quando comparados aos insetos em jejum, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. Núcleos em degeneração apareceram com maior frequência nos insetos controle quando comparados aos submetidos ao choque. Com relação aos dias de dissecação, os insetos sacrificados 30 dias pós-choque apresentaram maior incidência de núcleos em degeneração quando comparados aos de 7 e 14 dias pós-choque.

-Núcleos com heterocromatina descompactada (Gráfico 13): Estes foram visualizados com maior frequência aparente nos insetos alimentados, quando comparados aos submetidos ao jejum, mas esta diferença não foi significativa. Os insetos controle e sacrificados 30 dias pós-choque também aparentaram mostrar maior incidência de núcleos com heterocromatina descompactada, que também não foi estatisticamente significativa

-Núcleos gigantes (Gráfico 14): Núcleos gigantes apareceram com frequência aparente maior nos insetos em jejum do que nos alimentados e sob condição controle de temperatura, mas estas diferenças não foram estatisticamente significantes. Com relação aos dias para dissecação, os insetos sacrificados 7 dias pós-choque apresentaram maior incidência aparente de núcleos

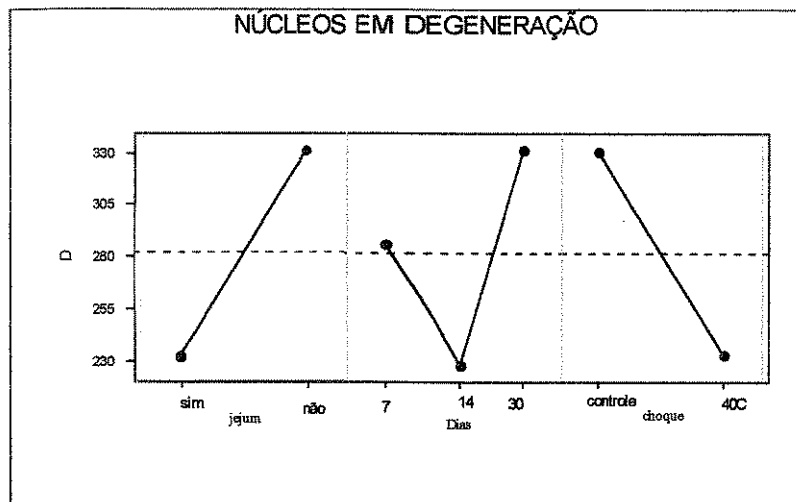


Gráfico-12

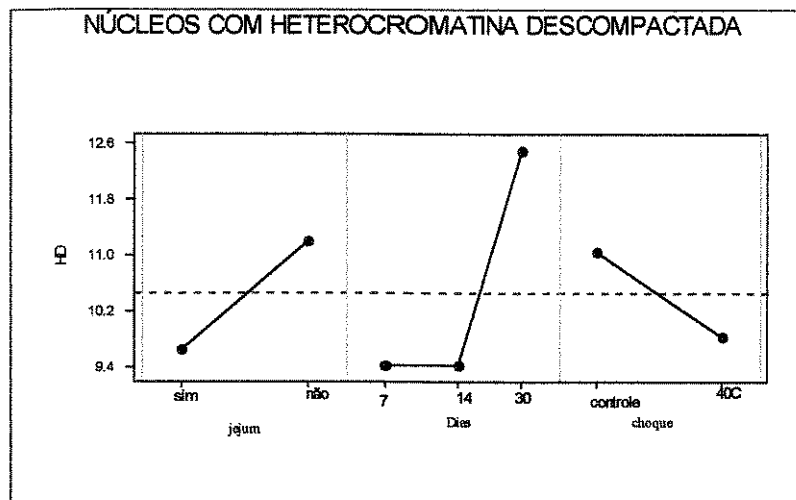


Gráfico-13

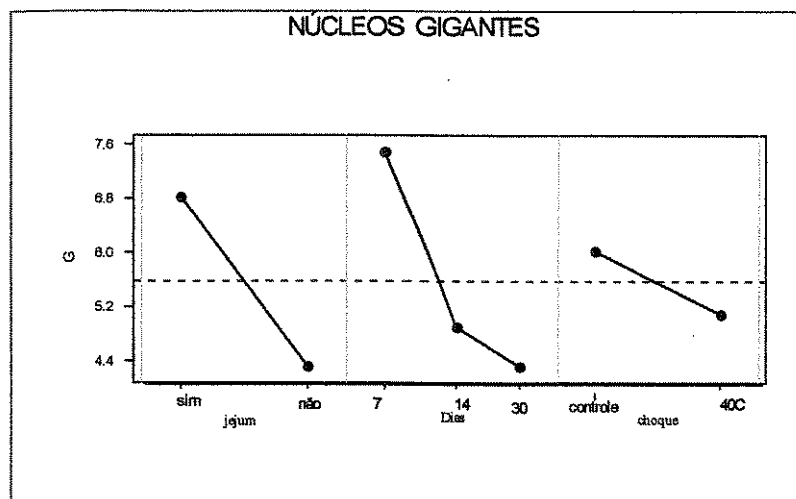


Gráfico-14

gigantes quando comparados aos sacrificados 14 e 30 dias pós-choque, o que também não foi estatisticamente significativo.

-Núcleos gigantes suspeitos de apoptose (Gráfico 15): A frequência absoluta observada deste fenótipo torna inviável uma análise estatística. Através dos gráficos pode-se sugerir que houve um aumento na frequência de núcleos suspeitos de apoptose nos insetos alimentados quando comparados aos insetos em jejum. Nos insetos controle, bem como, nos sacrificados 30 dias pós-choque houve maior frequência aparente de núcleos gigantes suspeitos de apoptose.

-Núcleos gigantes em degeneração (Gráfico 16): A frequência absoluta deste fenótipo torna inviável uma análise estatística. Através dos gráficos pode-se sugerir um aumento na frequência de núcleos gigantes em degeneração nos insetos alimentados quando comparados aos insetos em jejum. Observou-se também que nos insetos controle houve maior incidência aparente de núcleos gigantes em degeneração, bem como, nos insetos sacrificados 14 dias pós-choque.

4.4 Sobrevivência dos insetos

Os índices de sobrevivência de ninfas de 4º estadio e adultos submetidos às condições experimentais deste estudo acham-se descritos na Tabela 5, sendo evidentes níveis relativamente altos de sobrevivência pelo menos até 2 semanas pós-choque.

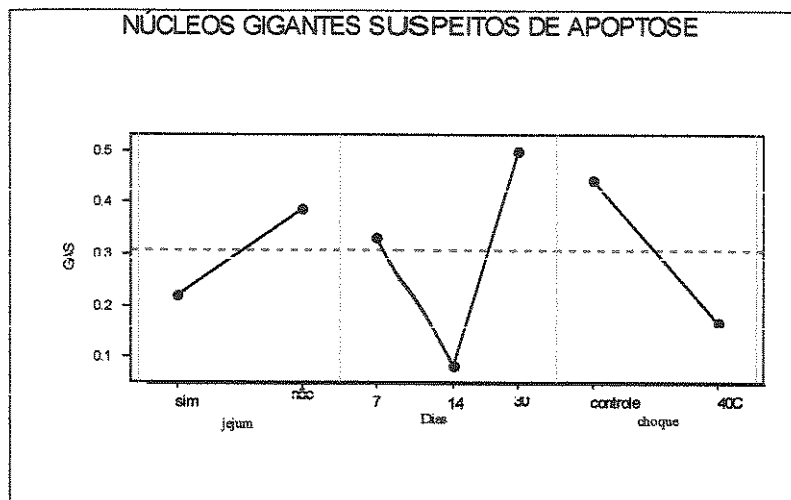


Gráfico-15

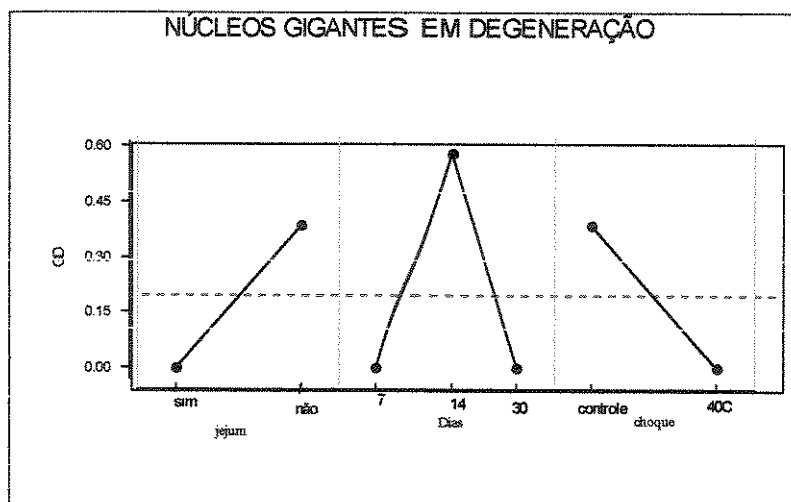


Gráfico-16

Gráficos 9-16. Efeitos principais dos fatores choque, alimentação e dias para dissecação, na frequência absoluta dos fenótipos nucleares de adultos. A: Núcleos apoptóticos, As: Núcleos suspeitos de apoptose, D: Núcleos com degeneração necrótica, G: Núcleos gigantes, GAS: Núcleos gigantes suspeitos de apoptose, GD: Núcleos gigantes em degeneração, HD: Núcleos com heterocromatina descompactada.

Tabela 5. Índices de sobrevivência em espécimes de *Triatoma infestans* submetidos a choque de 40°C por 1 hora. (n=50)

Espécimes	Condição nutricional	Índice de sobrevivência (%) após diferentes tempos pós-choque			Observações
		7 dias	14 dias	30 dias	
ninfas	bem alimentadas	100	98	90	Rodrigues et al., 1991
	jejum moderado	96	94	90	-
adultos machos	bem alimentados	100	92	88	Rodrigues et al., 1991
	jejum moderado	100	100	96	-

5. DISCUSSÃO

5.1. Apoptose e fenótipos nucleares: aspectos descritivos qualitativos

Os dados do presente trabalho salientam a ocorrência de apoptose nos túbulos de Malpighi de ninfas e adultos de *T. infestans* em condições controle e após choque de 40°C por 1 hora, ao lado de outros fenótipos já descritos por Dantas & Mello (1992).

Segundo Dantas & Mello (1992), em tais condições de choque ocorre redução na frequência nuclear e, embora os fenótipos usuais normais exibindo um ou mais corpos heterocromáticos continuem sendo os mais frequentes, ocorre uma certa frequência de degenerações nucleares; descompactação de áreas heterocromáticas e aumento em frequência de núcleos gigantes, que surgem por fusão nuclear/celular. Alguns poucos núcleos muito condensados, picnóticos, dos quais brotavam pequenos corpos Feulgen positivos foram também observados 10 a 30 dias após tal choque moderado (Dantas, 1990), porém na época não mereceram maiores considerações.

No presente estudo as figuras apoptóticas foram demonstradas como típicas em termos de morfologia após reação de Feulgen e reação ao ApopTagTM.

Nos núcleos suspeitos de apoptose, a marcação com o ApopTagTM apenas nas áreas eucromáticas encontra uma possível explicação nos seguintes fatos: 1. A cromatina de distribuição periférica nos núcleos, em células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* é justamente a eucromatina, demonstrável por análise de imagem (Mello, 1978a); 2. Uma das primeiras evidências morfológicas da apoptose caracteriza-se por um posicionamento do DNA fragmentado, no interior

de massas cromatínicas, que se tornam densas, junto à margem nuclear (Gerschenson & Rotello, 1992).

Por outro lado, foi aparentemente inesperado o achado de positividade ao teste para apoptose em núcleos cuja morfologia indicava degenerações típicas de necrose. No entanto, é bem possível que estes estejam numa fase do processo em que haja uma fragmentação do DNA internucleossomal tal que possibilite a marcação com o ApopTagTM tanto quanto na maioria dos núcleos apoptóticos. Por outro lado, a falta de resposta positiva ao ApopTagTM em certos núcleos ou fragmentos apoptóticos densamente compactados faz-nos supor inacessibilidade dos fragmentos de DNA destes à reação imunocitoquímica.

O teste com o ApopTagTM pode, pois, não ser totalmente preciso na identificação de apoptoses em *T. infestans*, o que encontra apoio em considerações de outros autores (Wijsman et al., 1993). Assim, é aconselhável a associação de metodologias para o melhor estudo do fenômeno. Nesse sentido o uso da reação de Feulgen é muito confiável para a identificação de condensações cromatínicas típicas de apoptose. No entanto, quanto a núcleos suspeitos de estarem em fases iniciais de apoptose, o uso do ApopTagTM pode trazer informações importantes.

Quanto ao uso do método de CEC para discriminação de apoptoses em túbulos de Malpighi de *T. infestans* este se revelou possível, porém não tão satisfatório quanto a reação de Feulgen, não sendo mesmo utilizável para o estabelecimento de contagens de fenótipos nucleares nesse material.

O método de CEC pode ser usado para vários sistemas celulares para detecção de apoptose, por ser um método simples, rápido e eficiente, produzindo contrastes de imagens e evidenciando mudanças na distribuição de RNA durante a apoptose, o que o torna de grande interesse para estudos de problemas em biologia

celular (Vidal et al., 1996; Mello, 1997). No presente caso, porém, a pesquisa de núcleos apoptóticos com base em tipo e intensidade de cor se tornou dificultada pela própria distribuição de núcleos no órgão, presença de grandes corpos de cromatina condensada (heterocromatina) nos núcleos normais que se confundem com os próprios núcleos apoptóticos e mascaramento por organelas citoplasmáticas que exibem intensa metacromasia (cor violeta), por conterem RNA. A ocorrência de RNA, seja fina e homogeneamente distribuída no citoplasma, seja no interior de concreções laminares altamente abundantes em túbulos de Malpighi de triatomíneos já havia sido descrita através de observações citoquímicas ao microscópio de luz e eletrônico (Mello & Dolder, 1977; Mello & Viana, 1977; Dolder & Mello, 1978). Além disso, grandes glóbulos citoplasmáticos ricos em RNA podem estar presentes por serem formados às custas de agregados de vírus de RNA reportados como muito comuns para triatomíneos sem sintomas de doenças e provenientes de diferentes insetários do Estado de São Paulo (Dolder & Mello, 1978).

O fato de ter sido diagnosticada apoptose se manifestando simultaneamente em ambos os núcleos de uma mesma célula binucleada em túbulos de Malpighi de *T. infestans* foi um fato interessante, dado que estudos de propriedades citoquímicas dos núcleos dessas células têm revelado nos mesmos não identidade de graus de complexação DNA-proteína e, portanto, de funções de expressão (Mello & Recco-Pimentel, 1987; Mello & Vidal, 1989).

Por outro lado, o achado de células necróticas nas condições de choque hipertérmico em que se pesquisava apoptose em *T. infestans* era esperado, com base em dados de Dantas (1990) e Dantas & Mello (1992), para túbulos de

Malpighi dessa espécie, bem como em dados de Sakaguchi et al. (1995) para outros sistemas celulares.

Admite-se que os núcleos com parcial descompactação da heterocromatina, já reportados para o mesmo material em outras condições de estresse, representem uma tentativa de expressão de genes usualmente repressos (Mello, 1983a, 1989, Dantas & Mello, 1992; Mello et al., 1995).

5.2. Frequência de apoptose e de outros fenótipos nucleares:

Com relação ao número total de núcleos e núcleos usuais normais nos túbulos de Malpighi sob condição controle e após o choque térmico, os dados deste trabalho estão de acordo com os relatos de Dantas & Mello (1992).

Com relação aos fenótipos nucleares alterados, foram exibidas características já descritas para esta espécie sob condições estressantes, inclusive choques térmicos (Mello, 1983a, 1989; Kubrusly, 1984; Andrade & Mello, 1987; Álvares-Garcia, 1988; Dantas & Mello, 1992; Mello et al., 1995).

A maior frequência nuclear observada, tanto para as ninfas de 4^o estadio quanto para os adultos controle e submetidos ao choque, foi de núcleos normais, que se caracterizam pela presença de um ou mais corpos heterocromáticos conspícuos (cromocentros) em meio à cromatina finamente granular e de distribuição homogênea (Mello, 1971, 1978a). No entanto a frequência nuclear seja total seja de fenótipos normais sofre uma queda nos espécimes submetidos ao choque, colaborando para esta queda os fenômenos de apoptose, degenerações por necrose e fusão de núcleos. Com relação à condição alimentar, em algumas situações as ninfas sob jejum moderado apresentaram uma maior frequência de núcleos normais quando comparadas às bem alimentadas, o que pode ter sido

ocasionado por diferenças individuais, frequentes nesses insetos (Dantas & Mello, 1992; Mello et al., 1995)

Com relação aos fenótipos alterados, eles ocorreram tanto nas ninfas quanto nos adultos dos grupos controle e submetidos ao choque térmico, embora com diferentes frequências. Nas ninfas, a condição nutricional baixa influenciou a frequência dos fenótipos alterados, especialmente apoptose, visto ser o jejum um outro fator estressante em hemípteros da família Reduviidae, e que ocasiona nestes fusão nuclear e celular e algumas degenerações (Mello, 1983a, 1989; Andrade and Mello, 1987). Esta situação se intensificou nos espécimes submetidos aos dois tipos de estresse (jejum e choque térmico), o que era de se esperar. Porém, no que se refere especificamente a degenerações necróticas em ninfas, foram elas constatadas com maior frequência em espécimes bem alimentados, mesmo não submetidos ao choque térmico, o que foi comprovado estatisticamente e será discutido mais para a frente.

A hipertermia associada ao jejum moderado revelou altos índices de apoptose em ninfas submetidas ao choque quando comparadas aos controles, mostrando que não só a temperatura mas também a condição alimentar colaboram para a indução de apoptose nesta fase do desenvolvimento. Houve um aumento significativo em apoptoses em insetos dissecados 7 dias após o choque e mantidos sob jejum moderado, sendo esta diferença estatisticamente significante com relação aos demais tempos. Já com relação às necroses, seu aumento foi posterior ao do aparecimento da maior frequência de apoptoses, como uma resposta mais retardada.

Nos adultos a frequência de apoptoses com o choque hipertérmico e/ou jejum não foi acentuada, embora estatisticamente fosse demonstrado aumento de

incidência de apoptose com o tempo pós-choque. Também em adultos os outros fenótipos alterados, incluindo-se necrose, não tiveram frequência elevada como nas ninfas nem pareceram ser influenciadas pelo jejum moderado. Porém o choque hipertérmico provocou alguma resposta que se expressou com o tempo em termos de aumento de necroses (30 dias pós-choque).

Nos núcleos suspeitos de apoptose os cromocentros mostravam-se aparentemente mais expandidos, enquanto a eucromatina fortemente corada, cobria área ligeiramente menor do que nos núcleos usuais, mas ainda assim não apresentavam todas as características para serem considerados em fases adiantadas da apoptose. No entanto, não apenas a morfologia, identificável com a reação de Feulgen, fala em favor de que representem etapas mais precoces de apoptose. Foi identificado um tipo semelhante de morfologia em que se encontrava resposta positiva com o teste ApopTagTM, salientando reação nas porções eucromáticas mais periféricas dos núcleos.

Nas ninfas os núcleos suspeitos de apoptose apareceram em maior frequência 7 dias após o choque e nos respectivos controles. Nos adultos, a maior frequência ocorreu nos insetos sacrificados 14 dias após o choque, o que parece acompanhar o sucedido com respeito aos núcleos apoptóticos.

Núcleos com aparente descompactação de heterocromatina foram observados em todos os grupos dos insetos analisados. Porém, nas ninfas bem alimentadas, excluída uma exceção já mencionada anteriormente, foram tais núcleos predominantes após o choque térmico e, em especial, 14 dias após o mesmo. Há, pois, indicação de que o fenômeno associado a este fenótipo seja elicitado pelo choque de temperatura, e que se desenvolva mais tardiamente, cessado o choque.

Isto já não sucedeu nas ninfas sob jejum moderado, embora justamente este tipo de estresse traga um aumento generalizado de núcleos com tal fenótipo. Há, pois sugestão de que, elicitada a descompactação da heterocromatina com o estresse do jejum, não haja intensificação desse fenômeno com o choque térmico.

Nos adultos, nem o choque térmico nem o jejum parecem induzir a expressão de tal fenótipo, o que salienta diferença de resposta a fatores de estresse com o desenvolvimento.

Admite-se que nesses núcleos, conforme já reportado para o mesmo material em diferentes condições de estresse, ocorra uma tentativa de expressão de genes usualmente repressos (Mello, 1983a, 1989; Mello & Dantas, 1992; Mello et al., 1995). Embora os cromocentros sejam áreas constituídas principalmente por heterocromatina constitutiva (Mello, 1971, 1975, 1978a, 1979, 1983a, 1987), sua propriedade de não codificação não parece ser tão rígida, pois sob certas condições de estresse fisiológico, áreas dessa cromatina chegam a se descondensar e possivelmente sofram transcrição (Mello, 1983a, 1989; Andrade & Mello, 1987; Dantas, 1990). Ainda não se sabe se estas áreas contêm genes codificadores de proteínas de choque térmico (hsp) (Mello, 1989). Embora, possivelmente envolvida na expressão de alguns genes dormentes, a descompactação da heterocromatina não pode ser considerada uma resposta específica rápida nem eficaz a ponto de inibir completamente o efeito do estresse (Mello, 1989).

Quanto aos núcleos gigantes, caracterizados pela fusão nuclear e/ou celular, e descritos para triatomíneos como um possível mecanismo de sobrevivência celular ou do órgão sob condições desfavoráveis, especialmente jejum (Wigglesworth, 1967; Mello & Raymundo, 1980; Mello, 1989; Dantas & Mello, 1992), foram detectados em todas as ninfas sob jejum, porém mais

acentuadamente após o choque térmico e, nesta situação, predominaram em períodos relativamente curtos após o estresse, como 7 dias. Em ninfas e adultos bem alimentados foram raros, mesmo após o choque térmico. Em adultos sob jejum a frequência desses núcleos foi baixa em comparação às ninfas, mas houve também um certo aumento em frequência com o choque, revelado especialmente para o período de 7 dias cessado o estresse.

Confirma-se, portanto, que o fenótipo nuclear representado pelos núcleos gigantes seja elicitado mais por fatores de baixa nutrição do que por outros agentes estressantes (Mello, 1989; Dantas & Mello, 1992; Mello et al., 1995). No entanto, esta resposta pode ser aumentada, se a baixa nutrição tiver sido mantida desde a época do choque até uma semana após o mesmo.

Portanto, se o fenômeno de fusão nuclear participa de um mecanismo de tentativa de sobrevivência celular ativado com a baixa nutrição, à semelhança da descompactação da heterocromatina, uma vez ativado, poderá se propagar a outros núcleos, de outras células, com o efeito de um fator estressante adicional, como um choque de temperatura. Essa capacidade, no entanto, seria mais favorecida na fase ninfal.

Sendo mais frequentes em ninfas sob jejum, submetidas ao choque térmico, os núcleos gigantes foram também nessa situação susceptíveis de sofrerem degenerações e/ou mecanismos de apoptose. Com um aumento excessivo de tamanho nuclear pode haver um desbalanço entre vantagens por economia metabólica e desvantagens por maiores dificuldades de comunicação química entre núcleo e citoplasma (Mello, 1987). Não se pode afirmar que a morte celular desses núcleos ocorra mais em ninfas do que em adultos porque nestes últimos sua frequência foi muito baixa para comparações.

Sabe-se que células em cultura respondem a alterações em seu ambiente normal de crescimento de modo gradual. Em resposta a indução de estresse, é iniciada a síntese de hsp. Quando se remove o elemento de estresse, essas células continuam a funcionar normalmente e os níveis de hsp voltam ao seu nível normal (Craig, 1975; Lindquist, 1986, Lindquist & Craig, 1988). Uma vez aumentado o nível de estresse e o seu limiar ultrapassado, a sobrevivência da célula torna-se impossível, a presença de hsp poderia ser incapaz de proteger as células, a síntese pararia e o estágio para o programa de apoptose seria ativado. Quando o nível de estresse é aumentado ainda mais, a morte por necrose torna-se o modo proeminente de morte celular (Samali & Cotter, 1996). Segundo Cotter & Al-Rubeai (1995), as células sofrem necrose em altos níveis de estresse porque não tem tempo para responderem aos estímulos, enquanto em níveis intermediários, a célula é injuriada mas não morre imediatamente, e como resultado, pode ser ativado seu programa de apoptose.

Os genes envolvidos na síntese de proteínas de choque térmico são altamente conservados em termos de evolução, tanto a nível de codificação quanto de elementos regulatórios. (Lindquist, 1986). Dentre as proteínas de choque encontramos as hsp 70 e 90, que foram constatadas em diferentes organismos. Segundo Welch (1993) as hsp são subdivididas em constitutivas e induzidas somente em condições de estresse.

Alguns membros da família hsp 70 e hsp 90 funcionam como “chaperonas moleculares” (Ellis, 1991). São proteínas sintetizadas sob condições de estresse ou não, que se ligam às cadeias nascentes de polipeptídeos, participando no arranjo conformacional da cadeia protéica, permanecendo associadas até o dobramento correto das proteínas (Welch, 1993). Na hora do estresse ocorre aumento na

expressão de algumas proteínas, pois, com a hipertermia ocorre aumento de proteínas denaturadas, ativando assim, o sistema de degradação da célula.

Com a descoberta da importância das proteínas de choque térmico, veio a ser admitido que a resposta ao choque térmico fosse um mecanismo homeostático geral que protegeria os componentes essenciais celulares, ajudando a minimizar os danos causados pela temperatura ou outros estresses, além de exercer importante papel no crescimento normal e desenvolvimento dos organismos (Cheney & Shearn, 1983; Burdon, 1986). Tem sido sugerido, também, que proteínas de choque térmico poderiam estar envolvidas no desenvolvimento de termotolerância, que é uma resistência transitória a temperaturas mais altas após um condicionamento prévio a temperaturas moderadas ou tratamentos amenos com outros estressores (Lindquist & Craig, 1988; Sanchez & Lindquist, 1990; Komatsu et al., 1996).

O achado de espécimes “controle” com alta frequência de apoptoses, necroses e de núcleos com parcial descompactação de heterocromatina, sugere que outros fatores estressantes, despercebidos do operador, possam estar ocorrendo nas condições de criação dos insetos da SUCEN em Mogi Guaçu. Sabe-se que infecções víricas são detectáveis em maior ou menor grau em hemípteros reduviídeos criados em diversos laboratórios deste Estado (Dolder & Mello, 1978; Mello et al., 1980; Mello, 1983b). Isto poderia por sua vez ocasionar alterações de comportamento, tais como não procura de alimento e consequente indução de jejum, embora o alimento fosse ofertado (Rodrigues, V.L.C.C.-informação pessoal).

Por outro lado, a variabilidade individual quanto à resposta nuclear frente ao choque de temperatura e/ou jejum encontrada neste estudo está de acordo com

descrições já efetuadas para *T. infestans* e *P. megistus*, quando se sugeriu a existência de espécimes com diferentes níveis de resistência à ação deletéria por diferentes estressores (Kubrusly, 1984; Mello, 1989; Dantas & Mello, 1992; Mello et al., 1995; Garcia, 1997).

Dados os valores de sobrevivência dos espécimes às condições experimentais, pode-se concluir que os fenômenos de morte celular não afetaram significativamente a sobrevivência dos insetos, seja ninfas ou adultos. Particularmente no caso dos túbulos de Malpighi a morte de uma certa fração de células pode ser talvez compensada pelos fenômenos de sobrevivência celular e pelo número e tamanho elevado de células que poderiam executar as funções típicas do órgão sem grandes prejuízos.

6. CONCLUSÕES

1. A apoptose é identificável em túbulos de Malpighi de ninfas de 4º estadio e adultos machos de *Triatoma infestans*, além de outros fenótipos nucleares não usuais, como necrose, núcleos com descompactação de heterocromatina e núcleos gigantes.
2. A apoptose nesse material é identificável com a reação de Feulgen, com o teste ApopTag™ e com o método de concentração crítica de eletrólitos (CEC). O primeiro método provou ser recomendável para quantificação da frequência de núcleos apoptóticos, o segundo pôde documentar fases iniciais do processo apoptótico e o terceiro não é recomendável para este material, por ter sua resposta mascarada por RNA citoplasmático e disposição da heterocromatina em núcleos não apoptóticos.
3. Como já reportado para alguns outros materiais, o método de ApopTag™ nem sempre é preciso para a identificação de apoptose, podendo marcar núcleos em necrose e não identificar grandes corpos apoptóticos.
4. Com o choque hipertérmico por 1 hora, há redução na frequência nuclear total e de núcleos normais usuais, colaborando para tal os fenômenos de apoptose, necrose e fusão nuclear.
5. O choque térmico em ninfas intensifica o aumento na frequência de apoptose e de núcleos suspeitos de estarem em fases mais precoces desse

processo, induzido pelo jejum, o que se verifica especialmente 7 dias cessado o choque.

6. O aumento na frequência de necroses nas ninfas, com o choque térmico, é posterior (14 dias) ao das apoptoses.
7. Nos adultos, com o choque hipertérmico e/ou jejum, tanto apoptose como necrose não têm incidência tão elevada como nas ninfas. Núcleos apoptóticos e suspeitos de apoptose ocorrem em maior frequência 14 dias pós-choque. Quanto à necrose, esta se expressa mais tardiamente pós-choque (30 dias).
8. Em ninfas bem alimentadas o fenômeno de descompactação de heterocromatina é elicitado com o choque de temperatura e se desenvolve mais tardiamente que a apoptose, 14 dias pós-choque. Em ninfas em que o fenômeno já havia sido elicitado pelo jejum, ele não é alterado pelo choque de temperatura.
9. O choque térmico intensifica o fenômeno de fusão nuclear (núcleos gigantes), desde que induzido pelo jejum, o que ocorre com predominância em ninfas, 7 dias cessado o choque.
10. Como em adultos nem o jejum nem o choque térmico induzem a expressão do fenômeno de descompactação da heterocromatina e a fusão nuclear é bem menos frequente, admite-se diferente resposta a fatores de

estresse com o desenvolvimento, com adultos sendo aparentemente mais resistentes.

11. Há variabilidade individual quanto à indução de diferentes fenótipos nucleares pelo choque hipertérmico em associação ou não ao jejum.
12. A morte celular com o choque hipertérmico não parece afetar a sobrevivência dos espécimes, pois ao menos até 14 dias pós-choque esta se mantém muito elevada. Em termos de eficiência funcional dos túbulos de Malpighi, possivelmente nas ninfas a morte celular seja compensada por fenômenos de sobrevivência celular, incluindo-se fusão nuclear, expressão de algum gene da área heterocromática e eficiência de hsp, enquanto nos adultos somente este último fator poderia ser sugerido como efetivo.

7. RESUMO

A incidência de morte celular por apoptose bem como de outros fenômenos de resposta celular ao choque hipertérmico de 40°C, por 1 hora, foi pesquisada em túbulos de Malpighi de ninfas de 4º estadio e adultos machos de *Triatoma infestans* (Klug). Foram analisados espécimes bem alimentados e espécimes submetidos a jejum moderado 7, 14 e 30 dias pós-choque, bem como respectivos controles. Foram analisadas montagens totais dos órgãos após reação de Feulgen, teste com ApopTagTM (Oncor) e método de concentração crítica de eletrólitos (CEC), usado para evidenciar núcleos apoptóticos. Com a reação de Feulgen foram bem discriminados e quantificados núcleos com diferentes fenótipos nos túbulos de Malpighi. O teste com ApopTagTM se prestou à descrição de fases precoces do fenômeno de apoptose. O método de CEC foi descartado para estudo de frequências de apoptose por particularidades do material.

Ao lado de apoptose, com o choque hipertérmico foi detectada morte celular por necrose e fenômenos admitidos como de sobrevivência celular, como fusão nuclear (núcleos gigantes) e descompactação de heterocromatina, além da maior frequência de núcleos apresentar fenótipo normal (eficiência de hsp?). Os fenômenos de apoptose, necrose e fusão nuclear colaboram para uma redução na frequência nuclear total e dos fenótipos normais usuais com o choque térmico.

Nas ninfas o choque térmico intensifica o processo de apoptose induzido pelo jejum, especialmente 7 dias após o choque. Já o aumento significativo de necroses é posterior ao das apoptoses (14 dias pós-choque). A descompactação de heterocromatina também é elicitada mais tardiamente após o choque (14 dias) em ninfas bem alimentadas, porém quando este fenótipo é elicitado pelo jejum, sua

incidência não se altera com o choque de temperatura. A fusão nuclear é elicitada mais por baixa nutrição do que pelo choque de temperatura, podendo se intensificar quando os dois fatores estressantes são associados.

Nos adultos não só a incidência de morte celular é mais baixa como mais tardia, além do que a descompactação de heterocromatina e a fusão de núcleos ser bem pouco frequente, o que nos leva a supor que os mecanismos de sobrevivência celular envolvendo as **hsp** sejam possivelmente mais eficientes.

Com relação aos fenômenos de morte celular descritos, estes não afetaram a sobrevivência dos insetos. No caso dos túbulos de Malpighi a morte de uma certa fração de células pode ser talvez compensada pelos fenômenos de sobrevivência celular, e pelo número e tamanho elevado de células que poderiam executar as funções típicas do órgão sem grandes prejuízos.

Quanto à variabilidade nuclear individual frente ao choque hipertérmico e/ou jejum, está de acordo com descrições já efetuadas para *T. infestans* e *Panstrongylus megistus*, quando se sugeriu a existência de espécimes com diferentes níveis de resistência à ação deletéria de diferentes estressores.

8. ABSTRACT

The incidence of cell death by apoptosis as well as by other cellular response phenomena to hyperthermal shock at 40°C for 1 hour, was studied in the Malpighian tubules of 4th stage nymphs and adults male of *Triatoma infestans* Klug. Both well fed specimens and specimens submitted to a moderate fasting 7, 14 and 30 days post-shock, were analysed, as well as their respective controls. Whole mounts of the organs were analyzed after the Feulgen reaction, ApopTag™ (Oncor) test and critical electrolyte concentration method (CEC), used to show up apoptotic nuclei. Using the Feulgen reaction, nuclei in the Malpighian tubules with different phenotypes were well discriminated and quantified. The ApopTag™ test was used to describe early phases of the apoptosis phenomenon. Due to characteristics of the material, the CEC method was discarded for use in the study of the frequency of apoptosis.

Besides apoptosis, other results of the hyperthermal shock were detected, such as cellular death by necrosis and phenomena admitted as being results of cellular survival, such as nuclear fusion (giant nuclei) and decompaction of the heterochromatin, as well as a greater frequency of nuclei presenting the normal phenotype (hsp efficiency?). The phenomena of apoptosis, necrosis and nuclear fusion contributed to a reduction in the total nuclear frequency and of the normal phenotypes usually appearing as a result of thermal shock.

In the nymphs, the thermal shock intensified the process of apoptosis induced by the fasting, especially 7 days after the shock. However the significant increase in necrosis came later than the apoptosis (14 days post-shock). In well fed nymphs, decompaction of the heterochromatin also occurred later (14 days), although when this phenotype was induced by fasting, the incidence was not altered by the temperature shock. Nuclear fusion was induced more by inadequate nutrition than by temperature shock, although it could intensify as a result of the association of the two stress factors.

In the adults, the incidence of cellular death is both lower and later; and both decompaction of the heterochromatin and nuclear fusion are observed very infrequently, from which one can suppose that the cellular survival mechanisms involving hsp are more efficient.

The cellular death phenomena described here do not affect insect survival. In the case of the Malpighian tubules, the death of a certain fraction of the cells maybe be compensated by the cellular survival phenomena and by the increase number and size of cells which could carry out the typical functions of this organ with no problems.

With respect to the individual nuclear variability as a result of hyperthermal shock and/ or fasting; this is in agreement with the existing descriptions for *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus*, where the existence of specimens with different levels of resistance to the deleterious action of different stress factors was suggested.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Alison, M.R. and Saffaf, C.E. Apoptosis: a gene- directed programme of cell death. **J.R. Coll. Physicians Lond.**, 26: 25-35, 1992.
- Álvares-Garcia, R.S. Efeitos da radiação gama sobre os fenótipos nucleares de alguns tipos celulares de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). **Masters Thesis**, UNICAMP, Campinas, 1988.
- Amaral, M.D.; Galego, L. and Rodrigues-Pousada, C. Stress response of *Tetrahymena pyriformis* to arsenite and heat shock. Differences and similarities. **Eur. J. Biochem.**, 171: 463-70, 1988.
- Ananthan, J.; Goldberg, A.L. and Voellmy, R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. **Science**, 232: 522-24, 1986.
- Andrade, C.G.T.J. and Mello, M.L.S. Phenotypes and number of Malpighian tubule nuclei in *Triatoma infestans* Klug along development and starvation. **Rev. Bras. Genet.**, 10: 449-57, 1987.
- Ashburner, M. and Bonner, J.J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. **Cell**, 17: 241-54, 1979.
- Atkinson, B.G. and Walden, D.B. Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. Orlando, Academic Press, 1985.
- Barry, M.A.; Behnke, C.A. and Eastman, A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. **Biochem. Pharmacol.**, 40: 2353-62, 1990.
- Berger, E.M. and Woodward, M.P. Small heat shock proteins in *Drosophila* may confer thermal tolerance. **Exp. Cell. Res.**, 147: 437-42, 1983.
- Burdon, R.H. Heat shock and the heat shock proteins. **J. Biochem.**, 240: 313-24, 1986.
- Burdon, R.H.; Slater, A.; McMahon, M. and Cato, A.C.B. Hyperthermia and heat-shock proteins of Hela cells. **Br. J. Cancer**, 45: 953-63, 1982.

- Bursell, E. Environmental aspects: Temperature. In: Rockstein, M. Ed. *The physiology of Insecta*. 1964. v1. 283-321.
- Camby, I.; Salmon, A.; Danghy, A.; Pasteels, J.L. and Kiss, R. The use of digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei to detect apoptosis. **Histochem. Cell. Biol.**, 104: 407-14, 1995.
- Cheney, C.M. and Shearn, A. Developmental regulation of *Drosophila* imaginal discs proteins: synthesis of a heat shock protein under nonheat-shock conditions. **Dev. Biol.**, 95: 325-30, 1983.
- Cohen, G.M.; Sun, X.M.; Snowden, R.T.; Dinsdale, D.S. and Killeter, D.N. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. **Biochem. J.**, 286: 331-34, 1992.
- Collins, R.J.; Harmon, B.V.; Gobé, G.C. and Kerr, J.F.R. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. **Int. Radiol. Biol.**, 61: 451-53, 1992.
- Cotter, T.G.; Lennon, S.V.; Glynn, J.G. and Martin, S.J. Cell death via apoptosis and its relationship to growth. Development and differentiation of both tumour and normal cells. **Anticancer Res.**, 10: 1153-60, 1990.
- Cotter, T.G. and Al-Rubeai, M. Cell death (apoptosis) in cell culture systems. **Tibtech**, 13: 150-55, 1995.
- Craig, N. Effect of reduced temperature on protein synthesis in mouse. **Cell**, 4: 329-35, 1975.
- Dantas, M.M. Efeitos de choque de temperatura sobre fenótipos nucleares de *Triatoma infestans* Klug, em condições de insetário da SUCEN de Mogi-Guaçu-SP. **Masters Thesis**, UNICAMP, Campinas, 1990.
- Dantas, M.M. and Mello, M.L.S. Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. **Rev. Bras. Genet.**, 15(3): 509-19, 1992.
- Dyson, J.E.D. Kinetic and physical studies of cell death induced by chemotherapeutic agents or hyperthermia. **Cell. Tissue Kinet.**, 19: 311-24, 1986.

- Dolder, H. and Mello, M.L.S. Virus-like particles in the Malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. **Cell. Mol. Biol.**, 23: 299-310, 1978.
- Durval, E. and Wyllie, A.H. Death and the cell. **Immunol. Today**, 7: 115-19, 1986.
- Ellis, R.J. Molecular chaperons. **Ann. Rev. Biochem.**, 60: 321-47, 1991.
- Evan, G.I.; Wyllie, A.H.; Gilbert, C.S.; Littlewood, T.D.; Land, H.; Brooks, M.; Waters, C.M.; Penn, L.Z. and Hancock, D.C. Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. **Cell**, 69: 119-28, 1992.
- Garcia, S.L. Sobrevivência, ocorrência de muda e fenótipos nucleares após choque de temperatura em *Panstrongylus megistus* Burmeister. **Masters Thesis**, UNICAMP, Campinas, 1997.
- Garcia, S.L.; Rodrigues, V.L.C.C.; Garcia, N.L.; Ferraz-Filho, A.N and Mello, M.L.S. Survival and molting incidence after heat and cold shocks in *Panstrongylus megistus* Burmeister. Subm. à public., 1998.
- Gerschenson, L.E. and Rotello, R.J. Apoptosis: a different type of a cell death. **FASEB J.**, 6: 2450-55, 1992.
- Harmon, B.V.; Corder, A.M.; Collins, R.J.; Gobé, G.C. and Allan, D.J. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42° - 47°C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. **Int. J. Radiat. Biol.**, 58: 854-58, 1990.
- Hightower, L.E. and White, F.P. Cellular responses to stress: comparison of a family of 71-73 kilodalton proteins rapidly synthesized in rat tissue slices and canavanine treated cells in culture. **J. Cell. Physiol.**, 108: 261-75, 1981.
- Jonhston, D.; Oppermann, H.; Jackson, J. and Levinson, W. Induction of four proteins in chick embryo cells by sodium arsenite. **J. Biochem. Chem.**, 255: 6975- 80, 1980.
- Juarez, E. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. **Rev. Saúde Públ.**, 4: 147-66, 1970.
- Juarez, E. and Silva, E.P.de C. Comportamento do *Triatoma sordida* em condições de laboratório. **Rev. Saúde Públ.**, 16 (supl.): 1-36, 1982.

- Kelley, P.M. and Schlesinger, M.J. The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression on chicken embryo fibroblasts. **Cell**, 15: 1277-86, 1978.
- Kerr, J.F.R.; Harmon, B. and Searle, J. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibres. **J. Cell. Sci.**, 14: 571-85, 1974.
- Kerr, J.F.R. and Winterford, C.M. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, 73 (8): 2013-26, 1994.
- Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H. and Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, 26: 239-57, 1972.
- Komatsu, Y.; Kodama, O. and Fujita, K. Heat shock treatment reduces *in situ* temperature in yeast at sub-lethal high temperature. **Cell. Mol. Biol.** 42 (6): 839-45, 1996.
- Kubrusly, F.S. Ação de cobre e mercúrio sobre estrutura nuclear e atividade de alguns sistemas enzimáticos em *Triatoma infestans* Klug. **Masters Thesis**, UNICAMP, Campinas, 1984.
- Lennon, S.V.; Martin, S.J. and Cotter, T.G. Induction of apoptosis (programmed cell death) in tumor cell lines by widely diverging stimuli. **Biochem. Soc. Trans.**, 18: 343-45, 1990.
- Li, G.C. and Shrieve, D.C. Thermal tolerance and specific protein synthesis in chinese hamster fibroblast exposed to prolonged hypoxia. **Exp. Cell. Res.**, 142: 464-68, 1982.
- Lindquist, S. The heat shock response. **Ann. Rev. Biochem.**, 55: 1151-91, 1986.
- Lindquist, S. and Craig, E.A. The heat shock proteins. **Ann. Rev. Genet.**, 22: 631-77, 1988.
- Lowe, S.W.; Schmitt, E.M.; Smith, S.W.; Osborne, B.A. and Jacks, T. P53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. **Nature**, 362: 847-49, 1993.
- Majno, G. and Joris, I. Apoptosis, oncosis and necrosis An overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, 146: 3-15, 1995.

- Maria, S.S.; Vidal, B.C. and Mello, M.L.S. Image analysis of DNA fragmentation and loss in V79 cells under apoptosis. Subm. à public., 1998.
- Martelli, A.M., Bareggi, R.B., Grill, V. Narducci, P. and Zweyer, M. The nuclear matrix and apoptosis. **Histochem. Cell. Biol.**, 108: 1-10, 1997.
- Mello, M.L.S. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv., Hemiptera). **Cytologia**, 36: 42-9, 1971.
- Mello, M.L.S. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, 8: 101-7, 1975.
- Mello, M.L.S. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero- e eucromatinas. Tese de Livre Docência, UNICAMP, Campinas, 1976.
- Mello, M.L.S. Computer analysis of stained chromatin on Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) **Mikroskopie**, 34: 285-99, 1978a.
- Mello, M.L.S. Mechanism of polyploidization in the Malpighian tubes of blood-sucking reduviid hemipterans. **Rev. Bras. Genet.**, 1: 97-102, 1978b.
- Mello, M.L.S. Patterns of lability towards acid hydrolysis in heterochromatins and euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. **Cell. Mol. Biol.**, 24: 1-16, 1979.
- Mello, M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. **J. Histochem.**, 15: 739-51, 1983a.
- Mello, M.L.S. Cytoplasmic inclusions in virus infected salivary gland cells of *Triatoma infestans* Klug. **Rev. Bras. Biol.**, 43: 251-56, 1983b.
- Mello, M.L.S. O ciclo celular e a mitose . In *Biologia Celular* (Vidal, B.C. & Mello, M.L.S., ed.), p. 231-246. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1987.
- Mello, M.L.S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. **Rev. Bras. Genet.**, 12: 485-98, 1989.
- Mello, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Braz. J. Genet.**, 20 (2): 257-64, 1997.

- Mello, M.L.S. and 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., and Raymundo, H.H. Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a blood-sucking hemipteran. **Cytologia**, 45: 203-9, 1980.
- Mello, M.L.S. and Recco-Pimentel, S.M. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the Malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, 52: 175-84, 1987.
- Mello, M.L.S. and Viana, A.M. Some cytochemical characteristics of the Malpighian tube cells in the blood-sucking bug, *Triatoma infestans* Klug. **Cell. Mol. Biol.**, 22: 367-72, 1977
- Mello, M.L.S. and Vidal, B.C. A reação de Feulgen. **Ciênc. Cult (São Paulo)**, 30 (6): 665-76, 1978.
- Mello, M.L.S. and Vidal, B.C. Práticas de Biologia Celular. Edgard Blücher ed., São Paulo, 1980.
- Mello, M.L.S. and Vidal, B.C. Critical electrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, 59: 87-93, 1989.
- Mello, M.L.S.; Rodrigues, V.L.C.C. and Dolder, H. Viral infection in blood-sucking hemipterans. **J. Submicrosc. Cytol.**, 12: 85-93, 1980.
- Mello, M.L.S.; Randi, M.A.; Giorgio, S.; Ferraz-Filho, A.N.; Rodrigues, V.L.C.C.; Rocha-e-Silva, E.O. and Cordeiro, J.A. Number of chromosomes, Feulgen-DNA content and nuclear phenotypes in domestic and wild specimens of *Panstrongylus megistus*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 80 (6): 641-48, 1986.
- Mello, M.L.S.; Vidal, B.C.; Dantas, M.M. and Monteiro, A.L.P. Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. **Acta Histochem. Cytochem.**, 26: 1-3, 1993.
- Mello, M.L.S.; Kubrusly, F.S.; Randi, M.A.; Rodrigues, V.L.C.C. and Ferraz Filho, A.N. Effects of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. **Entomol. Exp. Appl.**, 74: 209-18, 1995.

- Moreira, M.E.C.; del Portillo, H.A.; Milder, R.V.; Balanco, J.M.F. and Barcinski, M.A. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*. **J. Cell. Physiol.**, 167: 305-13, 1996.
- Mosser, D.D. and Martin, L.H. Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line. **J. Cell. Physiol.**, 151: 561-70, 1992.
- Neiva, A. Informações sobre a biologia da vinchuca, *Triatoma infestans* Klug. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 5(1): 24-31, 1913.
- Nevins, J. Induction of the synthesis of a 70.000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus mE 1A product. **Cell**, 29: 913-19, 1981.
- O'Shea, J.D.; Hay, M.F. and Cran, D.G. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. **J. Reprod. Fertil.**, 54: 183-87, 1978.
- Perlowagora-Szumlewicz, A. A eficácia do expurgo domiciliário com hexaclorociclohexana no controle do vetor da doença de Chagas (A importância de algumas desuas características biológicas no planejamento de esquemas de combate a esse vetor). **Rev. Bras. Malar. Doença trop.**, 21(1) 117-59, 1969.
- Pessoa, S.B. Biologia dos triatomíneos. **Rev. Goiana Med.**, 5: 3-11, 1959
- Pessoa, S.B. and Barros, N.V. Criação do *Triatoma infestans* em uma temperatura de estufa. **Folha Med.**, 20: 285-87, 1939.
- Rodrigues, V.L.C.C.; Mello, M.L.S.; Ferraz Filho, A.N. and Dantas, M.M. Sobrevivência e ocorrência de muda em *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) após choque de temperatura. **Rev. Saúde Públ. (São Paulo)**, 25(6): 461-67, 1991.
- Sakaguchi, Y.; Stephens, L.C.; Makino, M.; Kaneko, T.; Strebel, F.R.; Danhauser, L.L.; Jenkins, G.N. and Bull, J.M.C. Apoptosis in tumours and normal tissues induced by whole body hyperthermia. **Cancer Res.**, 55: 5459-64, 1995.
- Samali, A and Cotter, T.G. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. **Exp. Cell. Res.**, 223: 163-70, 1996.
- Sanchez, Y. and Lindquist, S.L. HSP 104 required for induced thermotolerance. **Science**, 248: 1112-15, 1990.

- Sciandra, J.J. and Subject J.R. The effects of glucose on protein synthesis and thermosensitivity on chinese hamster ovary cells. **J. Biochem. Chem.**, 258: 12091-93, 1983.
- Shi, Y.; Glynn, J.M.; Guilbrt, L.J.; Cotter, T.G.; Bissonnette, R.P and Green, D.R. Role for *c-myc* in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. **Science**, 257: 212-14, 1992.
- Silva, I.G. and Silva, H.H.G. Influência da temperatura na biologia de Triatomíneos. IV. *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). **Ann. Soc. Ent. Brasil.**, 17(2): 443-54, 1988.
- Silva, I.G., and Silva, H.H.G. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. III. *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera, Reduviidae). **Rev. Bras. Entomol.**, 37 (3): 489-96, 1993.
- Smith, M.L. and Fornace, A.J.Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. **Mutation Res.** 340: 109-24, 1996.
- Stephens, L.C.; Hunter, N.R.; Ang, K.K.; Milas, L. and Meyn, R.E. Apoptosis in irradiated murine tumors. **Radiat. Res.**, 127: 308-16, 1991.
- Takano, Y.S.; Harmon, B.V. and Kerr, J.F.R. Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumor cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. **J. Pathol.**, 163: 329-36, 1991.
- Thomas, G.P. and Mathews, M.B. Alterations of transcription and translation in Hela cells exposed to amino acid analogs. **Mol Cell. Biol.**, 4 (6): 1063-72, 1984.
- Umansky, S.R. Apoptosis: Molecular and cellular mechanisms (A Review). **Mol. Biol.**, 30 (3): 285-95, 1996.
- Vidal, B.C. and Mello, M.L.S. Critical eletrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes in vitro. **Acta Histochem. Cytochem.**, 22: 471-8, 1989.
- Vidal, B.C.; Barbisan, L.F.; Maria, S.S.; Russo, J. and Mello, M. L. S. Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. **Apoptosis**, 1: 218-21, 1996.

- Walker, N.I.; Bennet, R.E. and Rotello, J.F.R. Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. **Am. J. Anat.**, 185: 19-32, 1989.
- Welch, W.J. How cells respond to stress. **Scientific American**, 5: 56-64, 1993.
- Wigglesworth, V.B. Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of *Rhodnius* (Hemiptera). **J. Cell.Sci.**, 2: 603-16, 1967.
- Wigglesworth, V.B. The principles of insect physiology. New York Halsted, 1972. 741pp.
- Wijsman, J.H.; Jonker, R.R.; Keijiser, R.; van de Velde, C.J.H.; Cornelisse, C.J. and van Dierendonck, J.H.V. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. **J. Histochem. Cytochem.**, 41 (1): 7-12, 1993.
- Williams, G.T. Programmed cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.** 68: 251-306, 1990.
- Wyllie, A.H.; Morris, R.G.; Smith, A.L. and Dunlop, D. **J. Pathol.**, 142, 67-77, 1984.
- Zeledon, R., Guardia, V.M.; Zúniga, A. and Swartzwelder, J.C. Biology and ethiology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). I. Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation, and size of adults. **J. Med. Entomol.**, 7(3): 313-19, 1970.