

SIMONE LOPES GARCIA



SOBREVIVÊNCIA, OCORRÊNCIA DE MUDA E FENÓTIPOS NUCLEARES APÓS CHOQUE DE TEMPERATURA EM *Panstrongylus megistus* BURMEISTER

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo candidato a)
Simone Lopes Garcia
e aprovada pela Comissão Julgadora

26/09/97
[Signature]

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 S. Mello

Silveira

Campinas
1997

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	9165
	EX.
TOMBO BC/	32063
PROC.	28.1.97
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	15/11/97
N.º CPD	

CM-00102276-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

G165s Garcia, Simone Lopes
Sobrevivência, ocorrência de muda e fenótipos nucleares após choque de temperatura em *Panstrongylus megistus* Burmeister / Simone Lopes Garcia. -- Campinas, Sp : [s.n.], 1997.

Orientador: Maria Luiza Silveira Mello.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Proteínas de choque térmico. 2. *Panstrongylus*.
I. Mello, Maria Luiza Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Local e Data:

Campinas, 26 de setembro de 1997.

Banca Examinadora:

Titulares:

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis



Assinatura

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta



Assinatura

Suplente:

Profa. Dra. Selma Giorgio

Assinatura

Aos meus pais

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello pela orientação e dedicação recebidas ao longo deste período, sem as quais este trabalho não seria possível.

Aos Professores Dra. Marlene Tiduko Ueta, Dr. Sérgio Furtado dos Reis e Dr. José Maria Soares Barata, pela atenção, correções e sugestões apresentadas durante a análise prévia desta dissertação.

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 (S.P), nas pessoas do Sr. Antenor N. Ferraz Filho e Vera Lúcia C.C. Rodrigues pela participação neste trabalho e fornecimento dos insetos utilizados para os experimentos.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal do departamento de Biologia Celular e aos professores do departamento de Parasitologia pelo alto nível de conhecimento transmitido durante as aulas e discussões informais ao longo destes anos.

Ao Mário, D. Maria e Pedro (SUCEN) pelo convívio, apoio e auxílio técnico.

À Cidinha, Lillian e Sidney, pela eficiência e amabilidade.

À Ana Maria, Andréa, Sônia e Jaquitiana, pelo convívio e assistência desde que ingressei no curso de Pós-Graduação.

Às funcionárias da biblioteca de Biologia da UNICAMP, pelo atendimento solícito e auxílio na obtenção de material bibliográfico.

À Silvia (secretária de Pós-Graduação) pela atenção, simpatia e auxílio prestados.

À Estela, Silvy e Cristina, pela amizade, estímulo e disposição contante em auxiliar.

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

À Adriana, Cláudia, Maria Cláudia e Eliane pela amizade nestes anos e valiosa ajuda nos momentos difíceis.

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

Ao Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis pelo estímulo, amizade e confiança.

À Profa. Dra. Urara Kawazoe, pelo auxílio e disponibilidade de local para a realização de parte das atividades práticas deste trabalho.

À Adélia e Antonio, pela paciência e amor que só os pais são capazes de ter.

À minha família, em especial às minhas irmãs Nancy e Inês pela presença constante, carinho e sugestões.

Ao meu querido sobrinho Alexandre por ter vindo recentemente para a nossa família e por me dar tantas alegrias.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos que me foi concedida, e pelo financiamento de parte dos recursos para materiais e apresentação em congressos.

SUMÁRIO

1.- Introdução	1
2.- Objetivos	6
3.- Materiais e métodos	7
3.1.- Análise de sobrevivência e ocorrência de mudas	7
3.2.- Análise estatística das curvas de sobrevivência	8
3.3.- Análise de fenótipos nucleares	10
3.4.- Comparações de frequências relativas médias de diferentes tratamentos	11
4.- Resultados	12
4.1.- Análise de sobrevivência e ocorrência de mudas	12
4.2.- Análise de fenótipos nucleares	36
5.- Discussão	50
5.1.- Análise de sobrevivência e ocorrência de mudas	50
5.2.- Análise de fenótipos nucleares	53
6.- Conclusões	59
7.- Abstract	61
8.- Resumo	62
9.- Referências bibliográficas	64

1.- INTRODUÇÃO

Há mais de trinta anos atrás foi verificado que células ou tecidos, quando levados a uma rápida mudança para temperaturas elevadas, apresentavam uma reação protetora denominada resposta ao choque térmico, com o aumento na produção de certas proteínas (Welch, 1993). Estudos posteriores mostraram que essas proteínas não eram induzidas exclusivamente por choque de temperatura, mas também por outros fatores de estresse, como metais tóxicos, álcoois, agentes quimioterápicos, inibidores metabólicos, privação de O₂, jejum, hormônios esteróides, prostaglandinas, análogos de aminoácidos, metais pesados, agentes oxidantes, infecções viróticas, inflamação e hipertrofia, entre outros (Kelley e Schlesinger, 1978; Ashburner e Bonner, 1979; Johnston et al., 1980; Hightower e White, 1981; Nevins, 1981; Burdon et al., 1982; Li e Shrieve, 1982; Sciandra e Subjeck, 1983; Thomas e Mathews, 1984; Ananthan et al., 1986; Lindquist, 1986; Amaral et al., 1988; Welch, 1993). Essa resposta é de caráter universal, tendo sido observada em vários tipos de organismos, de bactérias a eucariotos superiores, plantas e animais (Maresca e Carratu, 1992).

Devido ao fato de vários estressores diferentes elicitarem respostas similares, muitos deles ativando a mesma série de genes, esse fenômeno passou a ser denominado também de resposta ao estresse, e as proteínas, como proteínas de estresse ou de choque térmico: hsp (do inglês: heat shock proteins) (Ananthan et al., 1986; Welch, 1993).

As primeiras pesquisas sobre resposta ao estresse se iniciaram na década de 60, em *Drosophila buschii* (Ritossa, 1962). Nesses insetos, alterações na distribuição dos puffs nos cromossomos politênicos das glândulas salivares ocorrem normalmente, durante o desenvolvimento, como consequência de alterações no título de ecdisona (Ashburner, 1972). Entretanto, alterações dramáticas nesse modelo de pufação foram verificadas após choque térmico ou tratamento químico com dinitrofenol ou salicilato de sódio, sendo que algumas áreas aumentaram o tamanho de seus puffs enquanto a maioria dos puffs pré-existentes regrediram (Ritossa, 1962).

As implicações moleculares desse fenômeno só foram descritas na década seguinte, por Tissières et al. (1974), os quais reportaram nos cromossomos politênicos das glândulas salivares, cérebro e túbulos de Malpighi de *Drosophila melanogaster*, que os puffs eram sítios de vigorosa síntese de RNA e que, o aparecimento de proteínas recém-sintetizadas seguindo o choque térmico, estavam correlacionadas com a pufação dos cromossomos e ativação gênica. Tais alterações refletiam uma diminuição da síntese protéica normal e o aumento seletivo de uma pequena série específica de proteínas, as proteínas de choque térmico, devido a uma ativação transitória de um pequeno número de genes silentes ou ativos em baixos níveis e da supressão da transcrição da maioria dos genes previamente ativos (Ashburner e Bonner, 1979; Fink e Zeuthen, 1980; Ingolia et al., 1980; Burdon, 1986).

A partir de 1978 foi observado que seguindo um rápido aumento na temperatura ou outros tipos de estresse, tanto bactérias, leveduras, como células animais e vegetais aumentavam a expressão de proteínas similares às proteínas de choque térmico de *Drosophila*, e que, portanto, a resposta ao choque térmico era uma propriedade geral de todas as células, tanto procarióticas quanto eucarióticas (Craig, 1975; Fink e Zeuthen, 1980; Kelley e Schlesinger, 1978; Lemaux et al., 1978; Yamamori et al., 1978; Ashburner e Bonner, 1979; Guttman e Gorovsky, 1979; Vincent e Tanguay, 1979; Francis e Lin, 1980; Lindquist, 1980; Loomis e Wheeler, 1980; Atkinson, 1981; Barnett et al., 1990).

A resposta ao estresse é uma área de pesquisa de grande interesse, visto constituir um excelente modelo para análise de processos celulares básicos envolvidos no controle da expressão

gênica a nível de transcrição e tradução, embora organismos e células diferentes possam responder com a alteração do modelo de síntese protéica de modos diferentes (Burdon, 1986; Bonato e Juliani, 1987; Amaral et al., 1988).

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). O número e os tipos de hsp codificados por esses genes variam com os diferentes organismos e tipos de células, mas predominantemente situam-se nas faixas de 68-110 kDa e 15-30 kDa (Burdon, 1986). Dentre as proteínas de choque térmico, as hsp 70 e 90 (denominação que expressa o peso molecular aproximado, respectivamente 70 kDa e 90 kDa), apresentam uma forte conservação em estrutura protéica em diferentes organismos como animais, plantas, leveduras e bactérias, enquanto as proteínas de baixo peso molecular parecem ser espécie específica (Schlesinger, 1986).

Todas as proteínas de estresse, com algumas poucas exceções, já foram constatadas em diferentes organismos na ausência de agressão, a expressão de alguns genes de choque térmico estando submetida à influência do estágio de desenvolvimento dos organismos, muitas vezes ocorrendo em insetos concomitantemente a um aumento da concentração de ecdisona (Richards, 1981; Handler, 1982; Ireland e Berger, 1982; Kelley e Schlesinger, 1978; Sirotkin et al., 1982; Berger e Woodward, 1983; Cheney e Shearn, 1983; Zimmerman et al., 1983; Mason et al., 1984; Palter et al., 1986; Thomas e Lengyel, 1986). Em vista disso, os pesquisadores subdividiram as hsp em constitutivas e induzidas somente em condições de estresse (Welch, 1993).

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). Ocorre aumento na expressão de algumas proteínas na hora do estresse pois, com a hipertermia há um aumento de proteínas denaturadas, ativando assim, o sistema de degradação das células. Este é dependente da ubiquitina, pequeno polipeptídeo que se liga ao grupo amino terminal das proteínas aberrantes, transformando-as em substrato para as proteases, que as degradam (Bond e Schlesinger, 1985). Com a diminuição no "pool" de ubiquitina livre na célula, o fator de transcrição do choque térmico, que normalmente está associado à ubiquitina, seria ativado (Munro e Pelham, 1985). Esse fator, então, se ligaria a uma sequência de nucleotídeos no gene promotor, altamente conservada evolutivamente, o elemento de choque térmico, HSE (Pelham, 1985; Bienz e Pelham, 1987). A ligação do fator de transcrição do choque térmico (HSTF) ao elemento de choque térmico (HSE) lidera a formação de um complexo de transcrição estável, que permite que a RNA polimerase e outros fatores de transcrição reconheçam no sítio promotor a sequência para a transcrição do gene, fabricando assim, a mensagem para a produção de proteínas de choque térmico (Burdon, 1986; Bienz e Pelham, 1987). Uma possibilidade alternativa é que, após o choque térmico ou tratamento com outros estressores, haveria uma alteração direta na estrutura do fator de transcrição (HSTF), tornando-o capaz de interagir com o elemento de choque térmico (HSE) (Burdon, 1986). Com o aumento na produção de hsp 70, por exemplo, haveria o reconhecimento e restauração correta do dobramento na proteína para um formato biologicamente ativo ou solubilização de agregados de proteínas, tornando-as mais acessíveis às proteases e diminuindo assim a carga do sistema dependente de ubiquitina. Esse mecanismo é auto-regulável, ou seja, no momento em que a quantidade de ubiquitina voltasse a aumentar, o fator de transcrição seria novamente inativado (Bienz e Pelham, 1987).

Além da atuação como chaperonas moleculares, algumas proteínas como as hsp 90 podem se associar transitoriamente com proteínas receptoras de hormônios esteróides e com as

pp60, proteínas transformantes de Rous sarcoma vírus (Sanchez et al., 1985; Schuh et al., 1985).

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 e 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 e Craig, 1988; Sanchez e Lindquist, 1990; Komatsu et al., 1996).

Choque frio é um outro tipo de choque térmico, o qual é definido como injúria celular observada imediatamente após rápido resfriamento, mas na ausência de formação de gelo nos fluidos extracelulares (Chen et al., 1991). Tem sido verificado em vários organismos, incluindo bactérias, leveduras, algas, fungos, protozoários, plantas superiores, peixes, espermatozóides e células somáticas de mamíferos e embriões (Morris e Watson, 1984 apud Chen et al., 1987). Um dos danos causados pelo choque frio é a indução de transições de fase nos lipídios de membrana e subsequente perda da permeabilidade desta. Agentes crioprotetores como o glicerol (produto do metabolismo do glicogênio), poderiam estabilizar as relações entre lipídios da bicamada e lipídios não formadores de bicamada, evitando assim, a redistribuição e segregação de componentes de membrana com o resfriamento (Quinn, 1985 apud Chen et al., 1987).

Além do glicerol (crioprotetor de baixo peso molecular), mecanismos como reorganização da membrana ou produção de proteínas específicas comparáveis àquelas associadas com a resposta após rápido aumento na temperatura, podem estar envolvidas na resposta ao choque frio (Chen et al., 1987; Burton et al., 1988). Entretanto, o rápido desaparecimento do glicerol em insetos submetidos a temperaturas acima de 20°C, a ausência de seu aumento em moscas *Sarcophaga crassipalpis* submetidas a choque hipertérmico e o fato do resfriamento não oferecer proteção contra injúrias ocasionadas por temperaturas elevadas, sugerem que as bases fisiológicas para choques quente e frio sejam diferentes (Zachariassen, 1985; Chen et al., 1991).

Quanto aos efeitos decorrentes dos choques térmicos, tem sido observado que diferentes graus de estresse ocasionam respostas variadas às temperaturas. Em *Drosophila*, por exemplo, respostas adaptativas ocorrem após alterações suaves de temperatura, efeitos na morfologia após tratamento moderado e morte após tratamentos severos (Milkman, 1963). Em *Triatoma infestans*, hemíptero reduviídeo, foram descritas algumas alterações a nível de sobrevivência e ocorrência de mudas, as quais variam de acordo com o tratamento (temperatura) e sua duração, bem como com a fase de desenvolvimento do inseto (Rodrigues et al., 1991).

Tem sido verificado, principalmente em insetos, que ao se provocar o estresse em ocasiões específicas do desenvolvimento, podem ocorrer alterações morfológicas semelhantes a mutações, como formação de bitórax e asas com veias anormais, entre outros (Mitchell e Lipps, 1978). Tais alterações, denominadas de fenocópias, devem-se provavelmente à deficiência em ativar determinadas enzimas, por não transcrição de genes que deveriam ser expressados em intervalos de tempo específicos para resultar em desenvolvimento normal (Mitchell e Lipps, 1978). Em *Triatoma infestans* submetidos a choques, o achado de insetos que apresentaram, mais freqüentemente que nos controles, incapacidade de completar a muda ou a melanização da cutícula, foi considerado como uma possível fenocópia (Dantas, 1990).

A nível celular ultraestrutural, têm sido detectadas várias alterações após choque térmico. Fibroblastos de rato, quando submetidos a temperaturas elevadas, mostram fragmentação do complexo de Golgi, leve inchaço mitocondrial e alteração nos elementos citoesqueléticos que

passam a se localizar ao redor do núcleo. A nível nuclear, verifica-se o aparecimento de corpos compostos de filamentos de actina, alteração no estado de condensação, no número e tamanho dos compostos ribonucleoprotéicos e reorganização do nucléolo (Welch e Suhan, 1985). Em células HeLa, observações com microscopia de interferência indicam que choques hipertérmicos induzem alteração a nível de matriz nuclear e filamentos intermediários nucleares (Mello e Miranda, 1992). Dados morfométricos indicam rearranjo de componentes nucleares (Heine et al., 1971; Miranda et al., 1993).

Collier et al. (1993), ao submeterem fibroblastos de embrião de galinha ao choque hipertérmico, constataram que os mitocôndrias passaram a se localizar na região perinuclear e adquiriram um formato de anel dilatado, em alguns casos, com vesículas fundidas. Além de alterações mitocondriais, também verificaram perturbações nos filamentos intermediários. Em células de *Stylomychia mytilus*, os mitocôndrias apresentaram uma forma distorcida com cristas desorganizadas e espaços vacuolares, retículo endoplasmático dilatado e abundância de polissomos. Porém, a alteração mais proeminente após choque térmico, foi no nucléolo, que mostrou hipertrofia e zona fibrilar delgada segundo uma configuração de anel (Kaul e Sapra, 1991).

Alterações ultraestruturais após choque têm sido também observadas na levedura *Saccharomyces cerevisiae* como contração do nucléolo, formação de partículas eletrodensas nos mitocôndrias e grânulos no citoplasma. Essas partículas eletrodensas foram similares às reportadas em células de plantas expostas a altas temperaturas (Webster e Watson, 1993).

Alterações citogenéticas têm sido descritas como resultado dos choques térmicos. Em machos jovens de *Apis mellifera*, anáfases anormais com atraso na migração cromossômica, inclusive com perda cromossômica, foram observadas após baixas e altas temperaturas e um aumento na frequência de espermátides e espermatozóides binucleados foi obtido após baixas temperaturas (Tarelho, 1981). Outros efeitos nucleares decorrentes de choques térmicos também têm sido descritos, como alterações no grau de ploidia (Beaumont et al., 1989; Randi, 1990; Varadaray, 1990; Kavumpurath e Pandian, 1992; Chermas et al., 1993, 1994; Kim et al., 1993; Myers et al., 1995; Toro e Sastre, 1995), na organização dos centrôssomos liderando disfunção mitótica e morte celular (Vidair et al., 1993), bem como início de transcrição telomérica (Botella et al., 1991).

Na espécie *Triatoma infestans*, vetor da doença de Chagas, a maioria dos estudos sobre efeitos de estressores a nível celular têm sido realizados em túbulos de Malpighi, os quais apresentam células poliplóides, com alto grau de ploidia que aumenta com o desenvolvimento ninfal, atingindo um máximo no 5o. estágio ninfal (classes Feulgen-DNA 32C e 64C) (Mello, 1971, 1975, 1978b, 1989; Mello e Raymundo, 1980). Tais células são binucleadas, com estruturas heterocromáticas do tipo constitutiva que se associam formando corpos maiores denominados cromocentros, os quais, sob certas condições de estresse, podem sofrer descondensação e possivelmente transcrição (Mello, 1983, 1989; Andrade e Mello, 1987; Dantas, 1990). Alterações nucleares na forma e tamanho, bem como no estado de compactação da heterocromatina e eucromatina têm sido descritas em *Triatoma infestans*, após vários estressores como radiação ionizante gama (Álvares- Garcia, 1988); jejum (Andrade e Mello 1987; Mello, 1983, 1989), choque térmico (Dantas e Mello, 1992) e metais pesados (Kubrusly, 1984; Mello et al., 1995). Alguns desses novos fenótipos aparecem como uma possível tentativa de ativação de genes silentes (núcleos com aparente descompactação da heterocromatina), outros como degeneração celular (núcleos vacuolizados ou picnóticos) ou mesmo tolerância celular (núcleos gigantes) (Mello, 1989; Dantas e Mello, 1992).

O encontro de importantes dados a nível de sobrevivência, ocorrência de mudas e

alterações nucleares em *Triatoma infestans* quando os espécimes foram submetidos a diversos estressores, entre eles, choque térmico (Rodrigues et al., 1991; Dantas e Mello, 1992), sugere que outros triatomíneos também possam se revelar modelos interessantes para estudos sobre estresses, inclusive em termos comparativos, visto que esses insetos exercem papel importante como vetores biológicos de *Trypanosoma cruzi*.

Panstrongylus megistus é um dos mais importantes vetores de doença de Chagas no Brasil, devido à ampla distribuição, altos índices de infecção com *T. cruzi* e comportamento variado dependendo da área em que se encontra. É uma espécie nativa do país, que ocorre em regiões silváticas e extra- Amazônia e tornou-se adaptada ao modo de vida domiciliar como consequência das modificações antrópicas ocorridas na paisagem local, que de coberta (florestas do domínio tropical atlântico), vem sendo transformada em paisagem aberta (Forattini, 1980; Silveira et al., 1984). O fenômeno de domiciliação tem sido interpretado de várias maneiras. Pessoa (1962) considera que os diferentes graus de comportamento estariam relacionados com a existência de complexos ou variedades específicas dentro do que se considera espécie. *Panstrongylus megistus* seria, portanto, uma espécie politípica contendo duas subespécies ecológicas, formadas principalmente por mutantes da forma silvestre. Para outros, a explicação para a existência de diferentes comportamentos deve-se ao oportunismo, ou seja, uma vez que são hematófagos obrigatórios, ficam dependentes de locais de abrigo e alimento (longe da aridez e presença de vertebrados) (Aragão, 1975). Segundo Forattini (1980), a domiciliação deve ser interpretada como tentativa de sobrevivência e dispersão decorrentes da destruição florestal ocorrida no domínio atlântico onde se situam os centros de endemismo de Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, juntamente com a adoção de construções precárias representadas principalmente pelas casas de barro, estimulando a transferência dos triatomíneos para ecótopos artificiais e instalando-se o isolamento domiciliar que tende cada vez mais à diferenciação desse comportamento. Diferindo de Pessoa (1962), Forattini (1980) sugere que o patrimônio genético desses triatomíneos seja capaz de promover adaptação a condições diversas.

Forattini (1980) admite também que os componentes de uma população específica podem apresentar comportamento bastante distinto do revelado pelos indivíduos da mesma espécie em outra região. Assim, enquanto *P. megistus* é intradomiciliar, adquirindo grande valor epidemiológico ao longo da zona da mata do Nordeste, em áreas da serra do Mar (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul), apresenta hábitos marcadamente silvestres, invadindo apenas esporadicamente as casas e construindo colônias no domicílio muito raramente (Sherlock, 1979; Silveira et al., 1984; Silveira e Rezende, 1994). Já na região Centro-Oeste de São Paulo, essa espécie é encontrada tanto em biótopos naturais como artificiais e caracteristicamente em peridomicílios, com freqüente invasão do domicílio (Barreto, 1979). Ao lado do *Triatoma sordida*, tem sido considerada a espécie mais importante do Estado de São Paulo, cujos habitats são freqüentemente invadidos pelo homem (Wanderley, 1991). Na região de Campinas, foi verificado que o *P. megistus* é a espécie predominante (89,28%), cujas formas aladas são encontradas com freqüência infectadas com *T. cruzi* e apresentam dispersão principalmente no último trimestre do ano (Rodrigues et al., 1992).

A maneira mais importante de transmissão da doença de Chagas no Brasil, até o momento, ainda é pelo vetor, embora outra forma bastante preocupante seja por transfusões sanguíneas. O estudo da biologia dos insetos vetores, inclusive em termos de sua reação a diferentes estressores, é portanto, de grande importância para planejamentos de controle e criação dos insetos em laboratório (Silva e Silva, 1993). O interesse pela resposta ao choque térmico, dentre os diferentes estressores, se reveste, pois, de importância por ser este um dos mais fortes indutores de expressão gênica conhecido (Sass, 1995).

2. -OBJETIVOS

Devido à importância da espécie *Panstrongylus megistus* como vetor na transmissão do *Trypanosoma cruzi*, a determinação de alterações nos seus níveis de sobrevivência, de ocorrência de muda e de fenótipos nucleares após choque hipertérmico e hipotérmico, sob diferentes fases de desenvolvimento e em diferentes condições de nutrição serão estudadas neste trabalho. Pretende-se também comparar as respostas às condições estressantes nesta espécie com as relatadas para *Triatoma infestans*, contribuindo-se para o estabelecimento de manutenção adequada desses insetos em laboratório e compreensão de alterações em espécimes provindos da natureza.

3. - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Análise de sobrevivência e ocorrência de mudas

Foram utilizados ninfas de 3o., 4o., e 5o. estádios e adultos de ambos os sexos de *Panstrongylus megistus* descendentes de insetos de hábito domiciliar obtidos do continente (Fazendas Pedra Balão e Pedra Branca, São João da Boa Vista - SP) e de insetos de hábito silvestre, provenientes do litoral (procedência: Apiaí, Miracatu e Iguape - SP). Esses insetos foram criados e reproduzidos, desde 1990, no insetário da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias), em Mogi Guaçu - SP.

Parte dos procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de Entomologia da SUCEN (Mogi Guaçu - SP) e os demais, nos laboratórios dos Departamentos de Biologia Celular e de Parasitologia- UNICAMP.

Os espécimes foram submetidos a situações de choque hipertérmico (40°C) e hipotérmico (0°C) por períodos de 1 e 12 horas. O choque hipertérmico foi efetuado em estufa microbiológica, calibrada para 40°C, enquanto o choque hipotérmico foi realizado em refrigerador, comprovando-se as temperaturas por meio de termômetro. A escolha das temperaturas de choque se baseou em facilidades operacionais com vistas à realização de experimentos que contemplassem extremos opostos de temperatura em relação ao controle. No caso da hipertemia foram evitadas temperaturas mais elevadas do que 40°C, que poderiam levar os insetos à morte quase imediata, à semelhança do que acontece com *Triatoma infestans* (Rodrigues et al., 1991). Por se desconhecer a existência de crioprotetores na hemolinfa de hemípteros reduviídeos (Rodrigues et al., 1991) foram evitadas, por outro lado, temperaturas inferiores a 0°C.

Foram utilizados espécimes pouco alimentados ou seja, que permaneceram em jejum durante 15 dias antes da realização dos testes e bem alimentados, isto é, que haviam recebido alimentação 48 horas antes dos experimentos. Em todos os experimentos, a alimentação após choque foi mantida semanalmente com sangue de galinha. Para cada situação de choque, bem como na situação controle, foram utilizadas 100 ninfas de mesmo estágio colocadas em um cristalizador de 18x10cm, contendo em seu interior um suporte de papelão quadriculado, e externamente coberto com morim. No caso dos adultos, foram colocados 50 espécimes (25 machos e 25 fêmeas) por cristalizador.

Imediatamente após o choque de temperatura, os insetos retornavam ao ambiente de temperatura e umidade controle e foram acompanhados diariamente durante um período de 30 a 35 dias para se determinar seus níveis de sobrevivência. Condições consideradas controle são as usualmente empregadas no insetário da SUCEN para *P. megistus*, ou seja, 28°C de temperatura e 80% de umidade relativa (informação pessoal, Antenor N. Ferraz Filho). O processo de muda foi também acompanhado durante o mesmo período em que se observou a sobrevivência das ninfas.

3.2) Análise estatística das curvas de sobrevivência.

Para a análise estatística das curvas de sobrevivência foi utilizado o teste não paramétrico de Mantel- Hantzel (Kalbfleisch e Prentice, 1980). Não foi necessário fazer a estimação das curvas de sobrevivência visto que todos os insetos entraram no estudo ao mesmo tempo e a única censura foi simples ao final do experimento. Portanto, as curvas de sobrevivência usuais já são as estimativas de Kaplan-Meyer para as curvas de sobrevivência verdadeiras (admitidas como desconhecidas).

Teste de Mantel- Hantzel: Comparação de curvas de sobrevivência.

Quer-se comparar as curvas de sobrevivência de *Panstrongylus megistus* submetidos a diversas condições de choque. Como as curvas de sobrevivência verdadeiras são desconhecidas, tem-se que se basear as conclusões nas curvas amostrais (obtidas nos experimentos) que são sujeitas a erros aleatórios, portanto, precisa-se detectar se as diferenças entre as curvas são devidas aos choques ou ao acaso.

Supor que se queira testar a igualdade ou não de k curvas de sobrevivência $S_1, S_2, \dots, S_k$. Em linguagem estatística, quer-se testar as hipóteses

$$H_0: S_1 = S_2 = \dots = S_k;$$

H_1 : existe pelo menos uma curva diferente.

Para isso, precisa-se construir uma estatística do teste W , baseada somente nos dados que dêem evidências a favor de H_0 ou H_1 . Esta estatística é uma variável aleatória, visto que se trata de uma função das observações e para se poder construir o teste desejado, W precisa ter uma distribuição conhecida, se H_0 for verdadeira. Este teste é baseado em termos probabilísticos de erros pequenos. Os dois erros possíveis são:

Erro tipo I: Rejeitar H_0 quando H_0 é verdadeira.

Erro tipo II: Não rejeitar H_0 quando H_0 é falsa.

Em geral, o erro tipo I é o mais grave, e deseja-se fixar uma probabilidade máxima para este tipo de erro, chamado nível de significância, α .

$$\alpha = \max P(\text{erro tipo I}) = \max P(\text{rejeitar } H_0 \text{ quando } H_0 \text{ é verdadeira}).$$

Um dos testes mais utilizados é o teste de Mantel- Hantzel (teste log-rank), onde a estatística de Mantel-Hantzel, W , tem distribuição qui-quadrado com $k-1$ graus de liberdade, isto é, $W \sim \chi^2(k-1)$, sob H_0 .

Assim, um valor "grande" de W é evidência contra H_0 , ou seja, uma regra de decisão seria: "Rejeita-se H_0 se $W > c$ e não se rejeita H_0 , caso contrário", onde c é tal que:

$$\alpha = \max P(\text{erro tipo I})$$

$$= \max P(\text{rejeitar } H_0 \text{ quando } H_0 \text{ é verdadeira})$$

$$= \max P(W > c \mid H_0 \text{ é verdadeira})$$

e este valor pode ser encontrado em uma tabela para diversos valores de α .

Notar que c é uma função decrescente de α , então existe um valor de α tal que a constante correspondente: $c(\alpha) = W$ observado. Este valor é chamado valor de significância ("p-value"), assim: se $\alpha > \text{valor de significância}$, rejeita-se H_0 ; se $\alpha \leq \text{valor de significância}$ aceita-se

H_0 . Este é o valor que será obtido quando os dados forem analisados pelo software S- Plus.

Se após testarmos globalmente as hipóteses:

$$H_0: S_1 = S_2 = \dots = S_k;$$

H_1 : pelo menos uma curva é diferente.

rejeitar-se H_0 , temos que identificar quais as curvas diferentes. Um problema quando se fazem comparações múltiplas é distinguir se as diferenças significativas entre as curvas são diferenças reais ou devidas simplesmente ao grande número de comparações feitas, o que aumenta a chance de encontrar diferenças que aparentam ser significantes, portanto, tem-se que selecionar um número limitado de testes a serem feitos e também utilizar níveis de significância pequenos, por exemplo, $\alpha/(\text{número de testes})$, o que garante uma taxa geral de erro menor ou igual a α .

O procedimento acima (teste de Mantel- Hantzel) é considerado não paramétrico, pois não se está supondo nenhuma distribuição de probabilidade para os tempos de vida de *Panstrongylus megistus* sob as diversas condições, assim "deixamos que os dados falem por si". A maior desvantagem dos métodos não paramétricos é que os testes são menos poderosos, isto é, P(erro tipo II) é maior que nos métodos paramétricos. Entretanto, para se utilizar um método paramétrico, precisar-se-ia postular um modelo de probabilidade para os tempos de vida, por exemplo, uma expressão explícita para funções de sobrevivência as quais são conhecidas exceto por um parâmetro numérico. Para tal precisar-se-ia conhecer melhor o fenômeno, pois utilizar um modelo errado inviabiliza toda a análise. Por exemplo, um modelo muito utilizado é o modelo de Weibull, onde se postula que

$$S_i(t) = \exp[-(\lambda_i t)^{\gamma_i}]$$

e quer-se estimar os parâmetros $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ e $\gamma_1, \gamma_2, \dots, \gamma_k$ e testar as hipóteses:

$$H_0: \lambda_1 = \lambda_2 = \dots = \lambda_k \text{ e } \gamma_1 = \gamma_2 = \dots = \gamma_k;$$

H_1 : existe algum parâmetro diferente.

Mas seria preciso estar convencido de que o modelo de Weibull fosse correto, o que não é o caso do presente experimento.

Toda a teoria não paramétrica descrita acima baseia-se na hipótese de homogeneidade dos dados, isto é, um teste estatístico só faz sentido se os dois ou mais grupos de insetos são homogêneos com respeito aos fatores prognósticos. Fatores prognósticos são aqueles que influenciam na resposta do tempo de sobrevivência, ou seja, são os fatores exceto tratamento.

3.3) Análise de fenótipos nucleares

Foram utilizadas ninfas do sexo masculino de 5o. estágio de *Panstrongylus megistus* de hábito domiciliar pouco alimentadas, descendentes de insetos do continente (procedência: Fazendas Pedra Balão e Pedra Branca, São João da Boa Vista - SP) criadas e reproduzidas no insetário da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias), em Mogi Guaçu - SP. A distinção sexual para a seleção de ninfas de 5o. estágio do sexo masculino foi realizada com base nas diferenças morfológicas propostas por Rosa et al. (1992).

Os espécimes foram submetidos às seguintes condições de choque: 40°C por 12 h; 40°C por 1 h e 0°C por 1 h. Os controles foram mantidos a 28°C e 80% UR.

As condições acima foram selecionadas com base na análise estatística das curvas de sobrevivência. Como não se verificaram diferenças devido a alimentação e procedência, foram utilizados insetos pouco alimentados de hábito domiciliar por facilidades operacionais.

As ninfas submetidas a choques de 40°C por 12 h foram dissecadas imediatamente após o choque e 30 dias após. As que foram submetidas a choques hipertérmicos e hipotérmicos por 1 h foram dissecadas imediatamente após o choque, 10 dias e 30 dias após o choque. Esses tempos foram escolhidos com o objetivo de se investigar alterações fenotípicas relacionadas a possíveis períodos de recuperação a curto e a longo prazo (no caso do choque 40°C por 12 h, como a mortalidade foi mais alta, foram utilizados os espécimes sobreviventes somente para a análise imediatamente após o choque e 30 dias após o choque).

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, pelo menos, 3 insetos.

A fixação foi realizada imergindo-se as lâminas em etanol- ácido acético glacial 3:1 por um minuto e em seguida lavando-as em álcool 70% por 5 minutos. Após essa etapa, os materiais foram submetidos à reação de Feulgen, procedimento citoquímico mais conhecido e utilizado para as determinações quantitativas convencionais do DNA (Mello e Vidal, 1978) e que facilita a evidência de fenótipos nucleares (Mello et al., 1986).

Os materiais estendidos em lâminas foram submetidos a hidrólise com HCl 4N por 1h e 5min à 25°C. Em seguida, receberam um banho rápido com HCl 0,1N gelado para paralisar o processo hidrolítico mais drástico. Esse tempo de hidrólise foi escolhido por ser considerado como o ótimo para esse material, ou seja, que permite a depurinação máxima do material (Mello e Vidal, 1978).

As lâminas foram, então, imersas no reativo de Schiff por 40 minutos, após o que, foram submetidas a 3 banhos de água sulfurosa (metabissulfito de sódio 10%, HCl 1N e água destilada 1:1:18) por 5 minutos cada. A seguir, os preparados receberam 3 banhos rápidos em água destilada e foram passados por uma bateria de alcóois etílicos (álcool 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto) por 1,5 minutos cada. O material foi diafanizado em xilol e montado em bálsamo do Canadá ($n_D = 1,54$).

Após essa etapa, fez-se a contagem dos núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi. As contagens foram efetuadas em microscópio binocular Zeiss, usando-se objetiva de 40x e ocular de 10x. Os núcleos observados foram classificados segundo diferentes fenótipos. São eles: núcleos normais, suspeitos de apoptose, degenerados, apoptóticos, com aparente descompactação da heterocromatina, núcleos gigantes, gigantes suspeitos de apoptose, gigantes com aparente descompactação da heterocromatina e gigantes com sinais de degeneração.

Foram obtidas fotomicrografias dos diferentes fenótipos em fotomicroscópio Zeiss,

utilizando-se filme Kodacolor Gold 100.

3.4) Comparações de frequências relativas médias para diferentes tratamentos (Análise de variância)

Foram procuradas evidências que indicassem haver uma diferença real no número de fenótipos nucleares entre os choques térmicos e controles, bem como duração do choque e dias pós-choque para dissecação. A hipótese nula é a de que não existiria influência dos fatores envolvidos no experimento. Para cada fator, assim como a interação entre os fatores dias pós-choque e temperatura, verificou-se se existiria ou não alteração significativa no número de fenótipos nucleares encontrados. Para isto foram utilizadas técnicas gráficas (gráficos de médias), matriz de correlação (frequência relativa) e análise de variância (logit da frequência relativa).

Para cada fenótipo, tem-se como fonte de variação os fatores: temperatura (3 níveis), dias para dissecação (3 níveis) e duração do choque (2 níveis), bem como interação entre dias para dissecação e temperatura. Para cada fonte de variação, calcula-se uma estatística do teste com distribuição conhecida F e constrói-se a tabela de Análise de Variância. Com isto é possível obter-se o valor de significância para cada fonte de variação e determinar-se quais os fatores que influenciam no número de fenótipos nucleares encontrados.

4. -RESULTADOS

4.1) Análise de sobrevivência e ocorrência de muda

Os resultados obtidos da análise de sobrevivência dos insetos acham-se resumidos nas figuras 1 a 6 e nas tabelas 1 a 13, que incluem a análise estatística das curvas de sobrevivência.

4.1.1) Ninfas de hábito domiciliar, bem alimentadas (choques de temperatura de 40°C e 0°C, duração de 1h e 12h).

Após choque hipertérmico de 1 hora, os níveis de sobrevivência de ninfas de 3o., 4o. e 5o. estádios não foram praticamente afetados (Fig. 1 A, B, D, E, G e H, Tabela 1). Uma ligeira diminuição na frequência de mudas foi observada especialmente no 4o. e 5o. estádios (Fig. 1 D, E, G e H). Entretanto, após um período de choque de 12 horas houve mortalidade total dos espécimes nessas fases logo no primeiro dia após choque (Fig. 1 A, B, D, E, G e H, Tabela 1).

Quando as ninfas foram submetidas ao choque hipotérmico de curta duração, um declínio de sobrevivência foi evidente apenas para o 3o. estádio (Fig. 1 A e C). Esse resultado contrasta com o observado após choque de 12 horas, em que houve uma drástica queda de sobrevivência imediatamente após o choque, principalmente no 5o. estádio ninfal, seguida por uma estabilização no valor de sobrevivência para os demais dias de observação (Fig. 1 A, C, D, F, G e I, Tabela 1). Quanto à ocorrência de mudas, foi verificada uma acentuada diminuição (Fig. 1 A, C, D, F, G e I) que se tornou mais intensa após choques de longa duração (Fig. 1 A, C, G e I).

De modo geral, choques de curta duração não influenciaram marcadamente na sobrevivência das ninfas em todos os estádios testados, enquanto choques hipertérmicos de longa duração provocaram morte total e choques hipotérmicos de longa duração afetaram drasticamente a sobrevivência das ninfas, especialmente as de 5o. estádio.

A análise estatística das curvas de sobrevivência confirma as observações visuais (Tabela 2).

4.1.2) Ninfas de hábito domiciliar, pouco alimentadas (choques de temperaturas de 40°C e 0°C, duração de 1h e 12h).

Após choque hipertérmico de 1 hora, não se verificaram grandes diferenças nos níveis de sobrevivência em ninfas de 3o., 4o. e 5o. estádios em relação ao controle (Fig. 2 A, B, D, E, G e H, Tabela 3). Mortalidade total foi observada após choques hipertérmicos de 12 horas para ninfas de 3o. e 4o. estádios (Fig. 2 B e E, Tabela 3). Apesar da mortalidade acentuada para ninfas de 5o. estádio, 18 ninfas foram resistentes ao choque após um período de 34 dias (Fig. 2 H, Tab. 3). Não houve alterações significantes na ocorrência de mudas após choque hipertérmico de 1 hora. Entretanto, no caso do choque de 12 horas, as ninfas sobreviventes de 5o. estádio não sofreram mudas (Fig. 2 H).

Após choque hipotérmico de curta duração houve um declínio na sobrevivência somente em ninfas de 3o. estádio (Fig. 2 A, C, D, F, G e I), enquanto choques hipotérmicos de 12 horas causaram mortalidade total das ninfas de 3o. e 5o. estádio e 17% de sobrevida em ninfas de 4o. estádio, 34 dias após choque (Fig. 2 A, C, D, F, G e I, Tabela 3). A ocorrência de mudas sofreu uma queda acentuada com o choque hipotérmico, principalmente em ninfas de 5o. estádio, onde não se verificou a sua presença (Fig. 2 A, C, D, F, G e I).

A análise estatística das curvas de sobrevivência confirma a análise visual (Tabela 4).

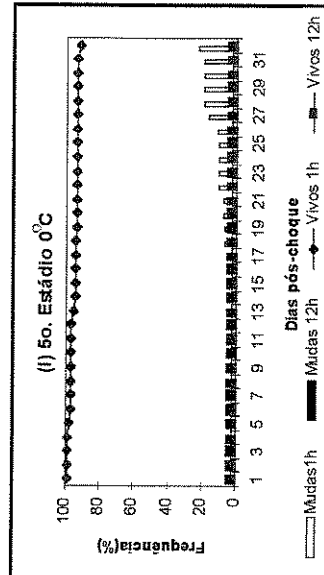
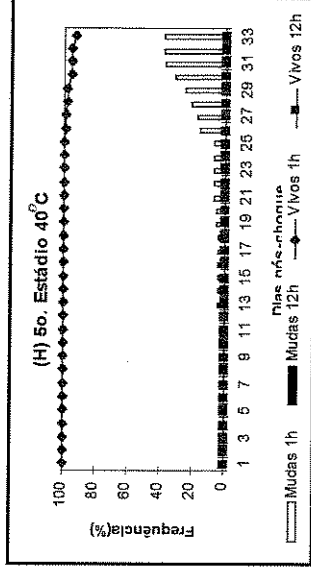
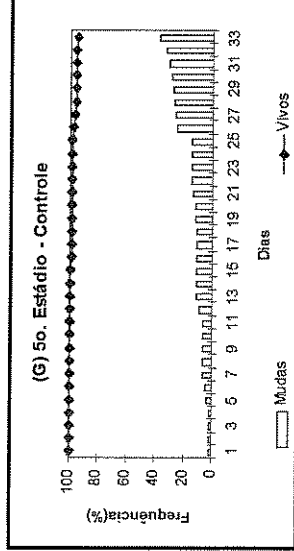
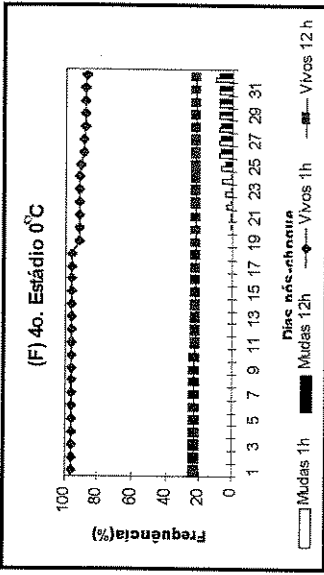
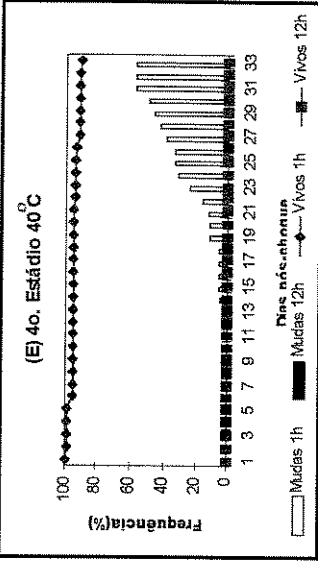
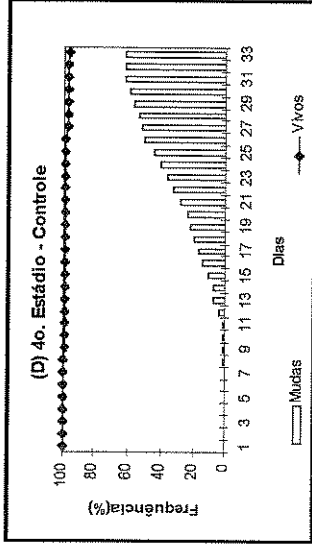
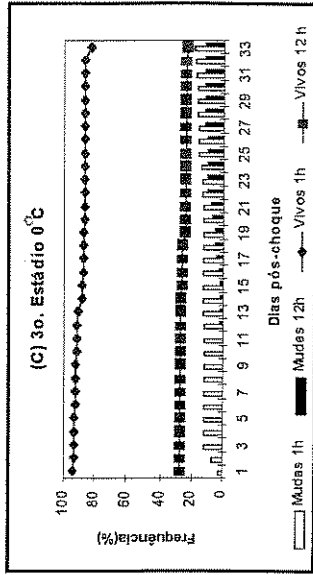
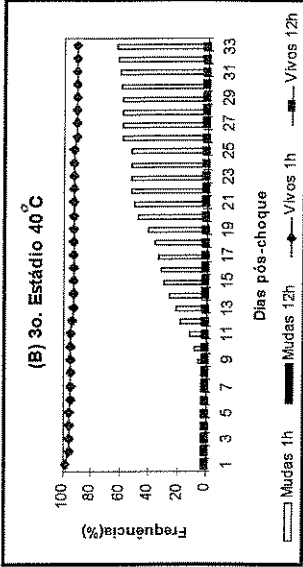
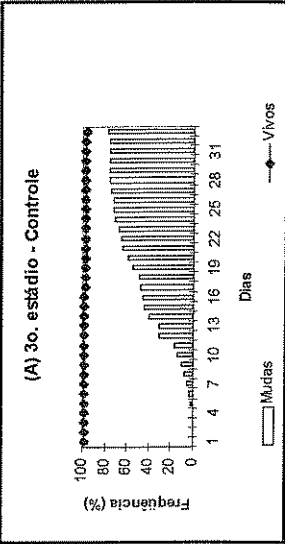


Figura 1: Curvas de sobrevivência e ocorrência de muda em ninfas de hábito domiciliar, bem alimentadas.

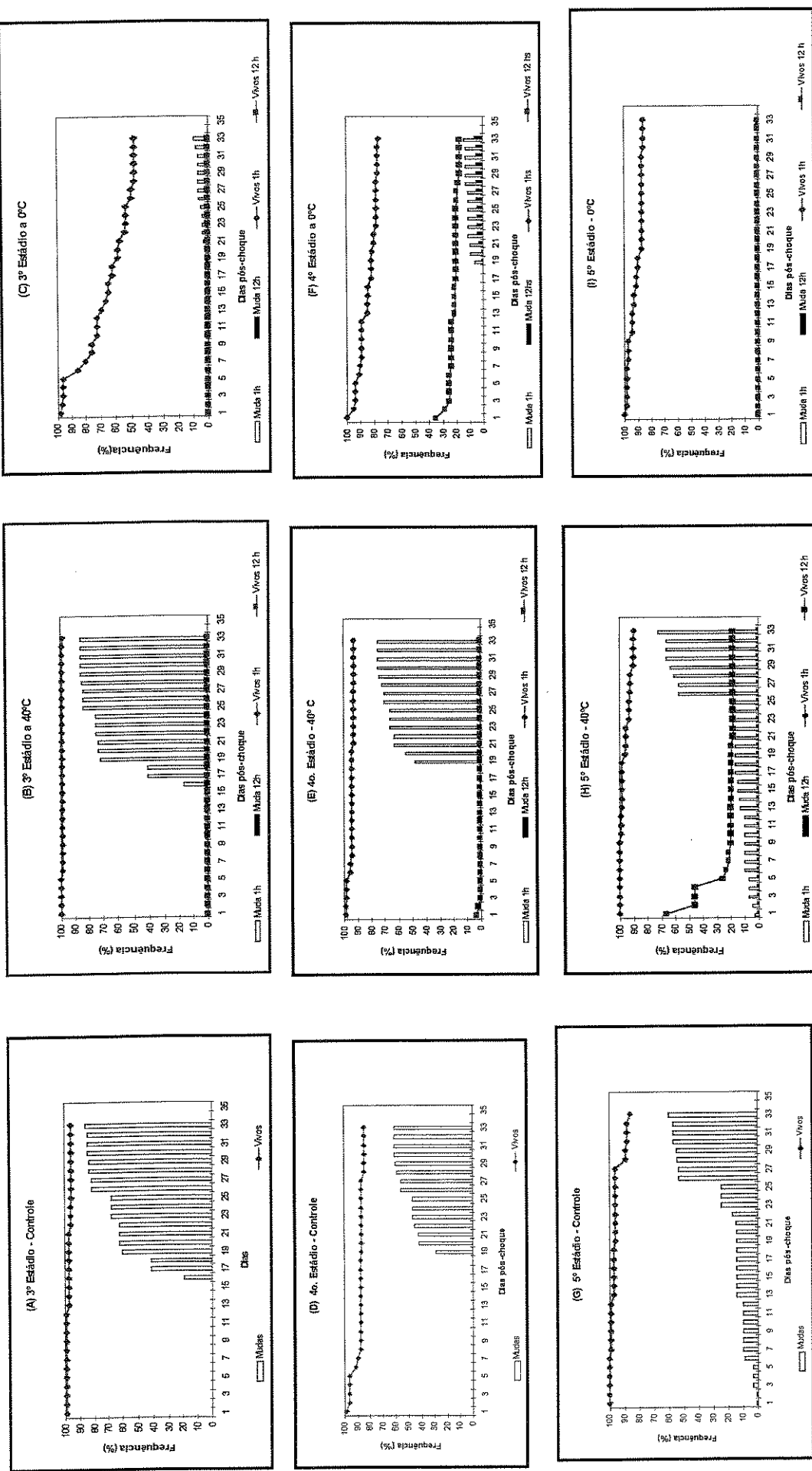


Figura 2: Curvas de sobrevivência e ocorrência de muda em ninfas de hábito domiciliar, pouco alimentadas.

Tabela 1: Sobrevivência ao final de 33 dias pós-choque de ninfas bem alimentadas de *Panstrongylus megistus*, hábito domiciliar.

Condições experimentais de temperatura	Fase do desenvolvimento					
	3o. Estádio		4o. Estádio		5o. Estádio	
	n	Sobrevida (%)	n	Sobrevida (%)	n	Sobrevida (%)
Controle, 28°C	100	96	100	96	100	95
Choque hipertérmico	100	91	100	91	100	93
40°C, 1h		00		00		00
40°C, 12h	100	83	100	87	100	92
Choque hipotérmico		24		23		03
0°C, 1h						
0°C, 12h						

Tabela 2: Comparação das curvas de sobrevivência para ninfas bem alimentadas de *P. megistus*, hábito domiciliar, segundo o teste de Mantel-Hantzel.

Fase de desenvolvimento		W	g.l.	valor de significância
3o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	9,6	2	0,0083 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	2,1	1	0,1472
	Controle vs. 0°C 1h	9,0	1	0,0026 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	214,3	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	195,1	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	109,5	1	0,0000 (*)
4o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	5,2	2	0,0741
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	359,9	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	114,8	1	0,0000 (*)
5o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	0,5	2	0,7827
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	397,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	184,1	1	0,0000 (*)

* = diferenças significativas

Tabela 3: Sobrevivência ao final de 33 dias pós-choque de ninfas pouco alimentadas de *Panstrongylus megistus*, hábito domiciliar.

Condições experimentais de temperatura	Fase do desenvolvimento					
	3o. Estádio		4o. Estádio		5o. Estádio	
	n	Sobrevida (%)	n	Sobrevida (%)	n	Sobrevida (%)
Controle, 28°C	100	95	100	84	100	86
Choque hipertérmico	100	98	100	92	100	89
40°C, 1h		00		00		18
Choque hipotérmico	100	48	100	76	100	86
0°C, 1h		00		17		00

Tabela 4: Comparação das curvas de sobrevivência para ninfas pouco alimentadas de *P. megistus*, hábito domiciliar, segundo o teste de Mantel-Hantzel.

Fases de desenvolvimento		W	g.l.	valor de significância
3o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	112,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	1,3	1	0,2484
	Controle vs. 0°C 1h	55,6	1	0,0000 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	299,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
4o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	9,3	2	0,0095 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	2,5	1	0,1130
	Controle vs. 0°C 1h	2,2	1	0,1421
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	211,1	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	100,2	1	0,0000 (*)
5o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	0,3	2	0,8724
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	270,2	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	120,1	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	191,1	1	0,0000 (*)

* = diferenças significativas

4.1.3) Ninfas de hábito silvestre, bem alimentadas (choques em temperatura de 40°C e 0°C, duração de 1h e 12h).

Após choque hipertérmico de 1 hora, não houve diferenças relevantes na taxa de sobrevivência das ninfas de 3o. e 5o. estádios (Fig. 3 A, B, G e H), enquanto um aumento foi verificado para ninfas de 4o. estágio (Fig. 3 D e E, Tabela 5). Não foi observada uma alteração significativa na ocorrência de mudas de ninfas de 3o. estágio (Fig. 3 A e B), enquanto uma mudança na distribuição foi verificada em ninfas de 4o. estágio, principalmente no período compreendido de 13 a 21 dias após choque, tendendo a se reestabilizar no período seguinte do experimento (Fig. 3 D e E). Uma queda na taxa de mudas foi verificada em ninfas de 5o. estágio (Fig. 3 G e H). Após choque de 12 horas, a mortalidade foi imediata em todos os estádios (Fig. 3 B, E e H), (Tabela 5).

Choques hipotérmicos de 1 hora praticamente não causaram diferenças na taxa de sobrevivência das ninfas de 3o. estágio (Fig. 3 A e C), porém um aumento foi verificado em ninfas de 4o. estágio enquanto um declínio foi verificado quanto às ninfas de 5o. estágio (Fig. 3 A, C, D, F, G e I). Diminuição na ocorrência de mudas após choque de 1 hora foi verificada em todos os estádios, principalmente em ninfas de 5o. estágio onde não se verificaram mudas (Fig. 3 A, C, D, F, G e I). Entretanto, após choque por 12 horas, alguns sobreviventes de 5o. estágio sofreram mudas, ainda que em baixa proporção (Fig. 3 G e I).

A análise estatística das curvas de sobrevivência confirma a análise visual (Tabela 6).

4.1.4) Ninfas de hábito silvestre, pouco alimentadas (choques em temperatura de 40°C e 0°C, duração de 1h e 12h).

Após choque hipertérmico de 1 hora, os níveis de sobrevivência das ninfas de 3o. e 5o. estágio aparentemente não se mostraram afetados (Fig. 4 A, B, G e H, Tabela 7). A análise estatística porém mostrou que existe diferença para as ninfas de 3o. estágio em relação ao controle (Tabela 9, valor de significância: 0,0053). Uma queda na taxa de sobrevivência foi verificada em ninfas de 4o. estágio (Fig. 4 D e E). Entretanto, após um período de choque de 12 horas, verificou-se mortalidade total dos espécimes em todos os estádios testados (Fig. 4 B, E e H, Tabela 7). Quanto à ocorrência de mudas, uma queda foi observada nas ninfas de 3o. e 4o. estádios (Fig. 4 A, B, D e E).

O choque hipotérmico de 1 hora causou diminuição na taxa de sobrevivência das ninfas de 3o., 4o. e 5o. estádios (Fig. 4 A, C, D, F, G e I). Após choque de 12 horas, houve queda total de sobrevivência das ninfas de 4o. estágio, enquanto as de 3o. e 5o. estádios mostraram 10% e 4% de indivíduos resistentes, respectivamente, no período de 30 dias pós-choque (Fig. 4 C, F e I, Tabela 7). Um drástico decréscimo na ocorrência de mudas foi detectado após choque de 1 hora, não sendo observadas mudas nos espécimes sobreviventes ao choque de 12 horas (Fig. 4 A, C, D, F, G e I).

A análise estatística das curvas de sobrevivência no geral, confirma a análise visual, excetuando-se o caso de ninfas de 3o. estágio, em que apesar de visualmente o nível de sobrevivência não se mostrar afetado pelo choque hipertérmico de 1 hora, vê-se pela Tabela 8 que existe diferença significativa (valor de significância = 0,0053) entre as curvas de sobrevivência.

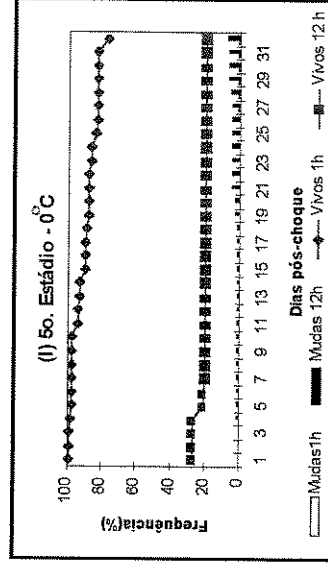
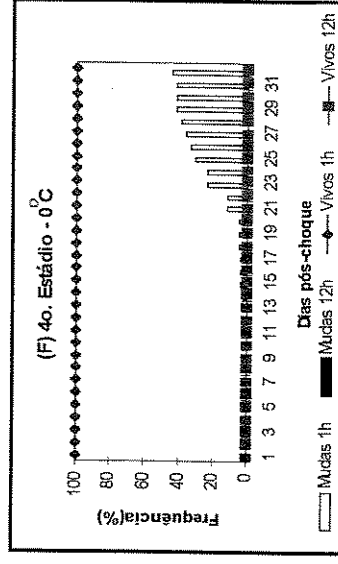
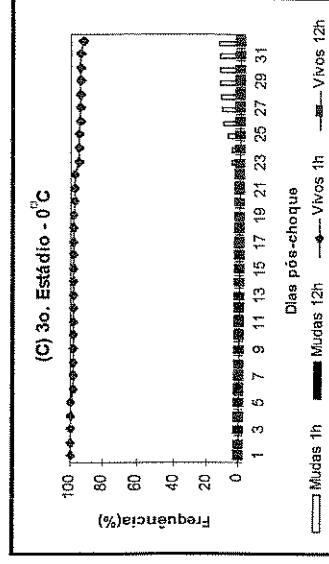
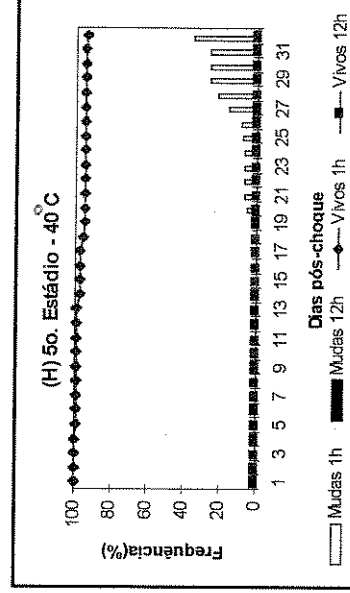
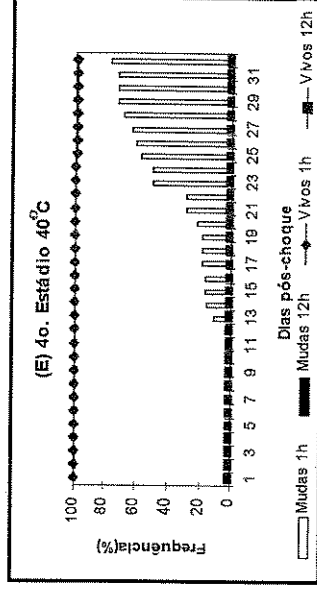
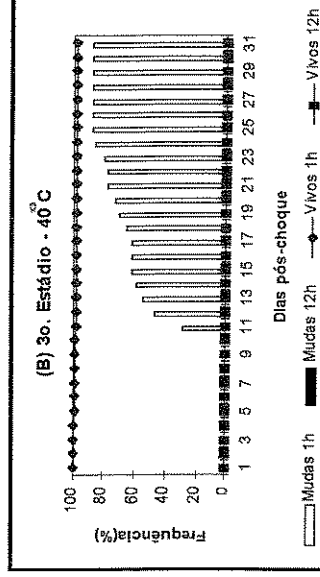
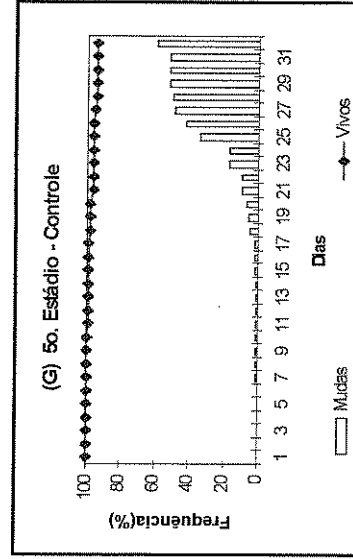
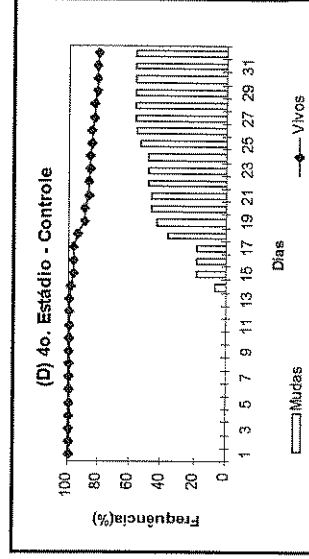
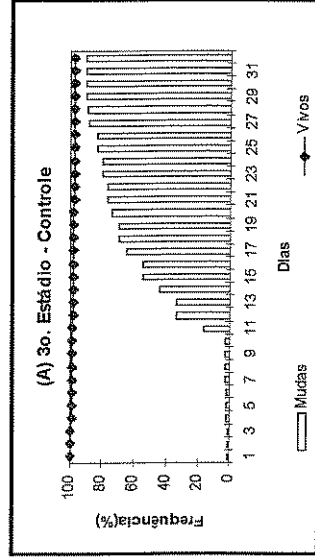


Figura 3: Curvas de sobrevivência e ocorrência de muda de ninfas de hábito silvestre, bem alimentadas.

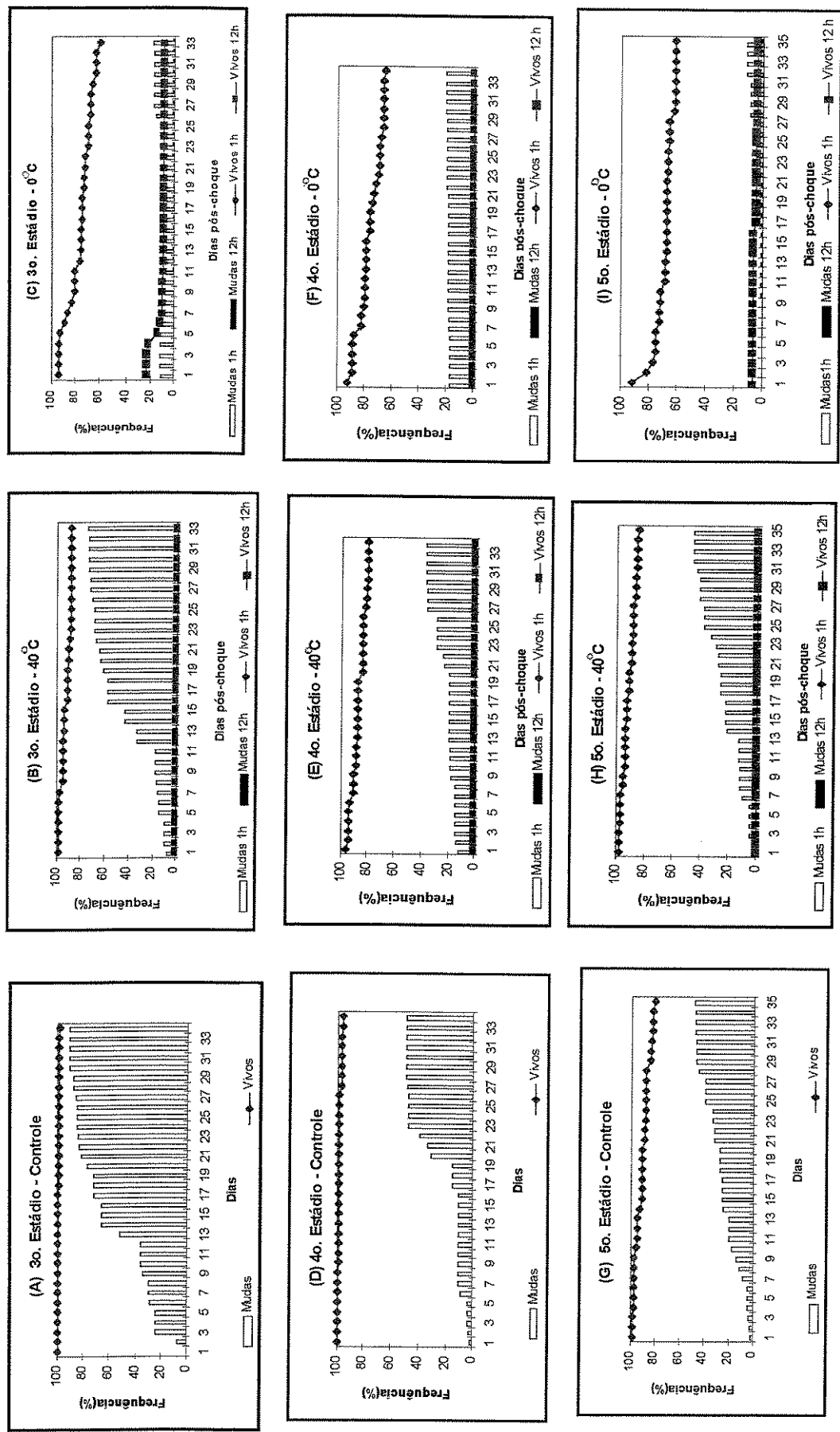


Figura 4: Curvas de sobrevivência e ocorrência de muda de ninfas de hábito silvestre, pouco alimentadas.

Tabela 5: Sobrevivência ao final de 33 dias pós-choque de ninfas bem alimentadas de *Panstrongylus megistus*, hábito silvestre.

Condições experimentais de temperatura	Fase do desenvolvimento					
	3o. Estádio		4o. Estádio		5o. Estádio	
	n	Sobrevida (%)	n	Sobrevida (%)	n	Sobrevida (%)
Controle, 28°C	100	97	100	80	100	94
Choque hipertérmico 40°C, 1h	100	98	100	99	100	94
40°C, 12h		00		00		00
Choque hipotérmico 0°C, 1h	100	92	100	100	100	77
0°C, 12h		00		00		20

Tabela 6: Comparação das curvas de sobrevivência para ninfas bem alimentadas de *P. megistus*, hábito silvestre, segundo o teste de Mantel-Hantzel.

Fases de desenvolvimento		W	g.l.	valor de significância
3o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	3,5	2	0,1695
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	299,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
4o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	40,3	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	19,1	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0C 1h	22,2	1	0,0000 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	402,3	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0C 12h	195,1	1	0,0000 (*)
5o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	17,3	2	0,0002 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	0,1	1	0,7475
	Controle vs. 0°C 1h	11,4	1	0,0007 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	368,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	126,1	1	0,0000 (*)

* = diferenças significativas

Tabela 7: Sobrevivência ao final de 33 dias pós-choque de ninfas pouco alimentadas de *Panstrongylus megistus*, hábito silvestre.

Condições experimentais de temperatura	Fase do desenvolvimento					
	3o. Estádio		4o. Estádio		5o. Estádio	
	n	Sobrevida (%)	n	Sobrevida (%)	n	Sobrevida (%)
Controle, 28°C	100	98	100	88	100	81
Choque hipertérmico	100	88	100	80	100	85
40°C, 1h		00		00		00
40°C, 12h						
Choque hipotérmico	100	60	100	65	100	62
0°C, 1h		10		00		04
0°C, 12h						

Tabela 8: Comparação de curvas de sobrevivência para ninfas pouco alimentadas de *P. megistus*, hábito silvestre, segundo o teste de Mantel-Hantzel.

Fases de desenvolvimento		W	g.l.	valor de significância
3o. estágio	Controle 40°C 1h 0°C 1h	55,7	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	7,8	1	0,0053 (*)
	Controle vs. 0°C 1h	44,3	1	0,0000 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	279,2	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	177,9	1	0,0000 (*)
4o. estágio	Controle 40°C 1 h 0°C 1h	31,9	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	9,3	1	0,0024 (*)
	Controle vs. 0°C 1h	30,2	1	0,0000 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	404,4	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
5o. estágio	Controle 40°C 1 h 0°C 1h	20,6	2	0,0001 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	0,7	1	0,3954
	Controle vs. 0°C 1h	10,6	1	0,0011 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	391,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	199,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	167,1	1	0,0000 (*)

* = diferenças significativas

4.1.5) Alados de hábito domiciliar (choques de temperatura de 0°C e 40°C , duração de 1h e 12h).

Com relação à sobrevivência dos adultos bem alimentados, choques hipertérmicos de curta duração causaram um declínio mais acentuado nos machos. Quando os insetos foram submetidos ao choque hipotérmico de curta duração a taxa de sobrevivência foi ainda mais afetada em ambos os sexos, sendo que nos machos foi atingida mortalidade quase que total ao redor de 24 dias pós-choque. Mortalidade total foi verificada após choques de longa duração (Fig. 5 A, B e C, Tabela 9).

Para os adultos pouco alimentados, choques hipertérmicos de curta duração causaram um declínio moderado na sobrevivência dos machos, enquanto nas fêmeas não houve praticamente modificação (Fig. 5 D e E). Após choque hipotérmico de curta duração houve um declínio acentuado na taxa de sobrevivência dos adultos (Fig. 5 D e F). Em choques de longa duração, hipertérmico e hipotérmico, a taxa de sobrevivência foi nula (Fig. 5 E e F), de modo semelhante ao que aconteceu para os insetos bem alimentados (Fig. 5 B e C, Tabela 9).

A análise estatística das curvas de sobrevivência confirma a análise visual (Tabelas 10 e 11), excetuando-se o caso de alados machos de hábito domiciliar, pouco alimentados, quando apesar de visualmente choque hipertérmico de 1 hora parecer visualmente causar um leve declínio na sobrevivência dos machos, a análise estatística demonstra que não houve diferença significativa em relação ao controle (Tabela 11, valor de significância = 0,0312).

4.1.6) Alados de hábito silvestre (choques de temperatura de 0°C e 40°C, duração de 1h e 12h).

Em espécimes bem alimentados, choques hipertérmicos de curta duração causaram leve declínio na taxa de sobrevivência (adultos machos), ou praticamente não os afetaram (adultos fêmeas (Fig. 6 A e B), enquanto choques hipotérmicos de 1 hora, causaram uma queda acentuada na taxa de sobrevivência de ambos os sexos (Fig. 6 A e C). Após um período prolongado de choque, hiper- ou hipotérmico, houve mortalidade total dos insetos (Fig. 6 B e C, Tabela 9).

Para alados pouco alimentados, choques hipertérmicos de curta duração causaram diminuição moderada na taxa de sobrevivência das fêmeas; enquanto nos machos foram observados valores até ligeiramente mais elevados do que no controle (Fig. 6 D e E, Tabela 9). Choques hipotérmicos de 1 hora causaram queda acentuada na sobrevivência dos espécimes machos (Fig. 6 D e F). Mortalidade total dos insetos foi verificada após choques de longa duração (Fig. 6 E e F), de modo igual ao verificado para insetos bem alimentados (Fig. 6 B e C, Tabela 9).

A análise estatística das curvas de sobrevivência confirma a análise visual (Tabelas 12 e 13).

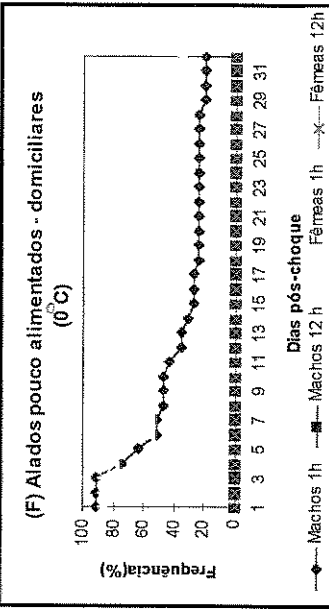
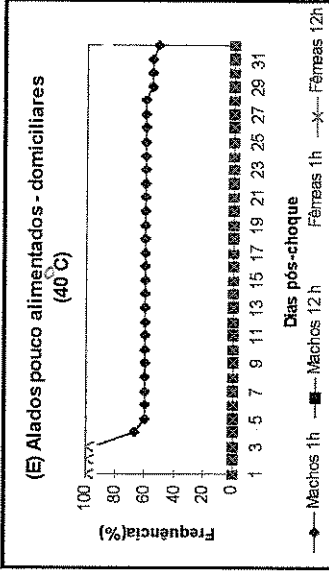
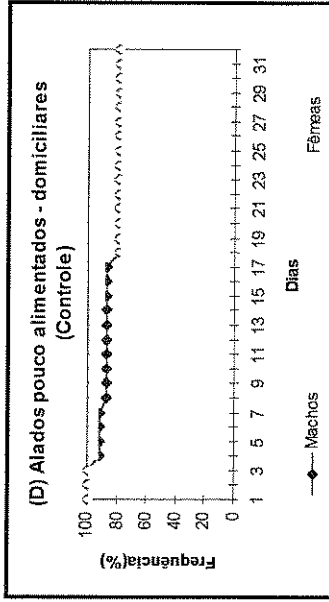
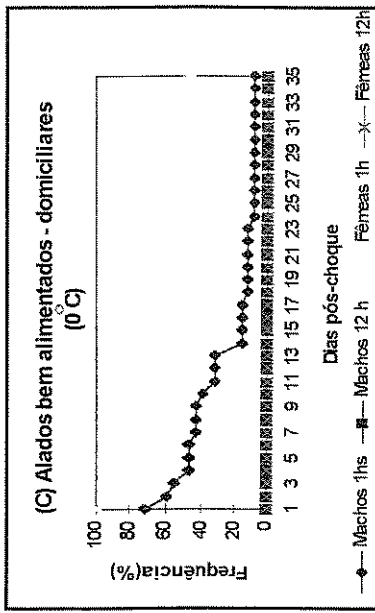
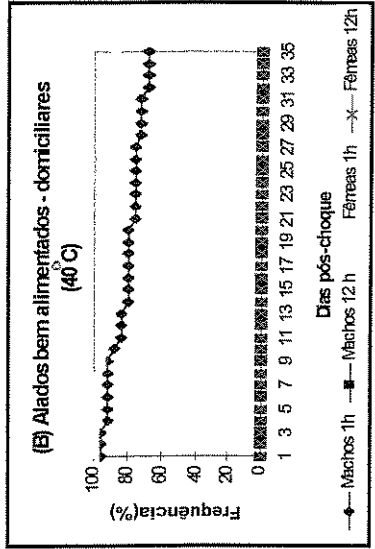
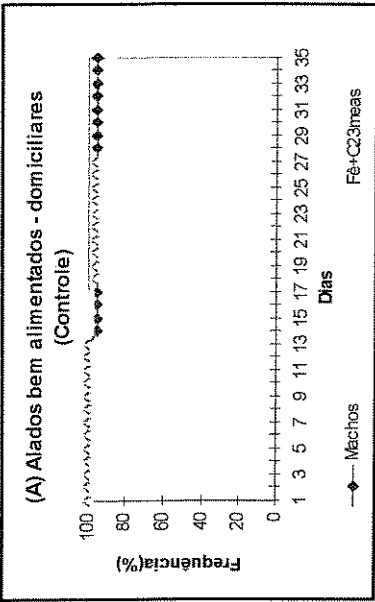


Figura 5: Curvas de sobrevivência de adultos de hábito domiciliar.

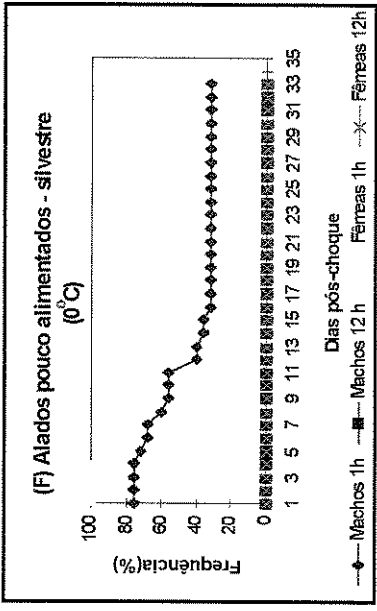
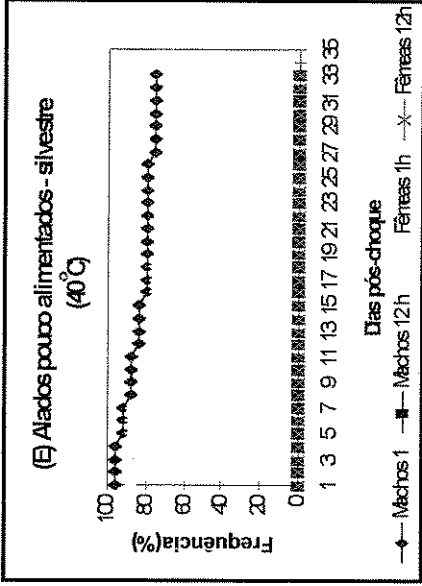
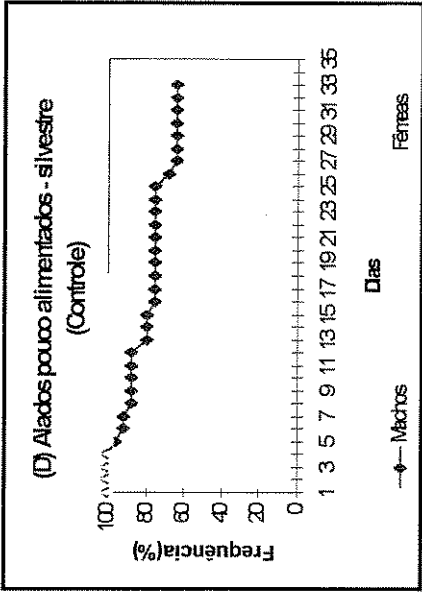
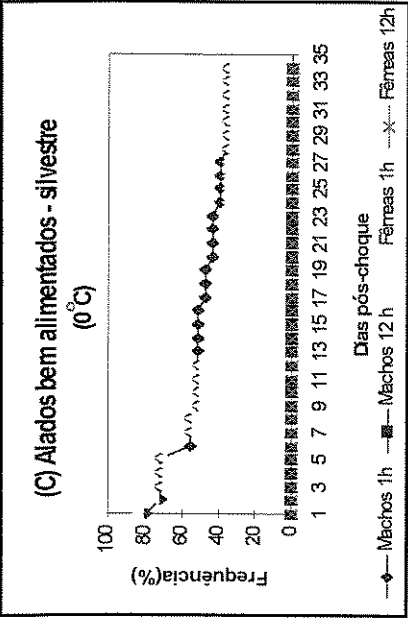
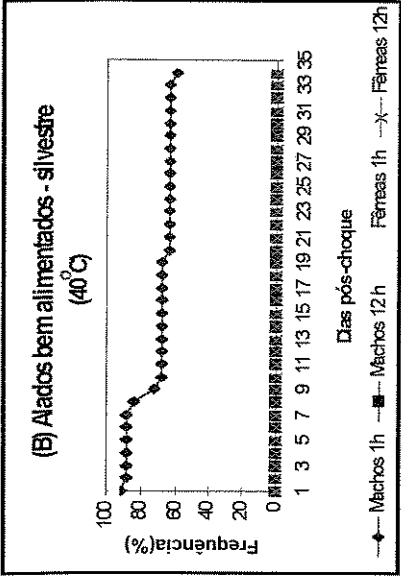
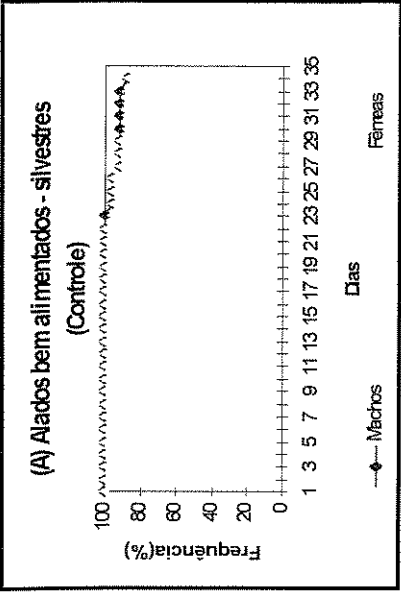


Figura 6: Curvas de sobrevivência de adultos de hábito silvestre.

Tabela 9: Sobrevivência (%) ao final 31 dias pós-choque em adultos de *Panstrongylus megistus*.

Condições experimentais de temperatura	Hábito											
	Domiciliar						Silvestre					
	Pouco alimentados			Bem alimentados			Pouco alimentados			Bem alimentados		
	n	Sobrevida (%)		n	Sobrevida (%)		n	Sobrevida (%)		n	Sobrevida (%)	
		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀
	Controle, 28°C	25	80	80	25	96	88	25	64	92	25	92
Choque hipertérmico 40°C, 1h 40°C, 12h	25	56 00	88 00	25	72 00	88 00	25	76 00	64 00	25	64 00	88 00
Choque hipotérmico 0°C, 1h 0°C, 12h	25	20 00	36 00	25	08 00	52 00	25	32 00	64 00	25	36 00	36 00

Tabela 10: Comparação de curvas de sobrevivência para adultos bem alimentadas de *P. megistus*, hábito domiciliar, segundo o teste de Mantel-Hantzel.

		W	g.l.	valor de significância
Machos	Controle 40°C 1h 0°C 1h	59,2	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	6,6	1	0,0103 (*)
	Controle vs. 0°C 1h	44,0	1	0,0000 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	74,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
Fêmeas	Controle 40°C 1 h 0°C 1h	16,8	2	0,0002 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	0,0	1	0,9994
	Controle vs. 0°C 1h	9,9	1	0,0016 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	74,2	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
Machos vs. Fêmeas	Controle	1,0	1	0,3197
	40°C 1h	3,0	1	0,0819
	40°C 12h	0,0	1	1,0000
	0°C 1h	13,8	1	0,0002 (*)
	0°C 12h	0,0	1	1,0000

* = diferenças significativas

Tabela 11: Comparação de curvas de sobrevivência para adultos pouco alimentadas de *P. megistus*, hábito domiciliar, segundo o teste de Mantel-Hantzel.

		W	g.l.	valor de significância
Machos	Controle 40°C 1h 0°C 1h	18,2	2	0,0001(*)
	Controle vs. 40°C 1h	4,6	1	0,0312
	Controle vs. 0°C 1h	19,5	1	0,0000 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	74,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
Fêmeas	Controle 40°C 1h 0°C 1h	19,7	2	0,0001 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	1,0	1	0,3191
	Controle vs. 0°C 1h	9,4	1	0,0021 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	74,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
Machos vs. Fêmeas	Controle	0,1	1	0,7605
	40°C 1h	7,5	1	0,0060 (*)
	40°C 12h	0,0	1	1,0000
	0°C 1h	1,2	1	0,2695
	0°C 12h	0,0	1	1,0000

* = diferenças significativas

Tabela 12: Comparação de curvas de sobrevivência para adultos bem alimentadas de *P. megistus*, hábito silvestre, segundo o teste de Mantel-Hantzel.

		W	g.l.	valor de significância
Machos	Controle 40°C 1h 0°C 1h	18,9	2	0,0001 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	6,2	1	0,0126 (*)
	Controle vs. 0°C 1h	18,1	1	0,0000 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	74,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
Fêmeas	Controle 40°C 1h 0°C 1h	28,6	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	0,0	1	0,9585
	Controle vs. 0°C 1h	17,0	1	0,0000 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	74,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
Machos vs. Fêmeas	Controle	0,2	1	0,6467
	40°C 1h	4,1	1	0,0427 (*)
	40°C 12h	0,0	1	1,0000
	0°C 1h	0,0	1	0,9899
	0°C 12h	0,0	1	1,0000

* = diferenças significativas

Tabela 13: Comparação de curvas de sobrevivência para adultos pouco alimentadas de *P. megistus*, hábito silvestre, segundo o teste de Mantel-Hantzel.

		W	g.l.	valor de significância
Machos	Controle 40°C 1h 0°C 1h	14,5	2	0,0007 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	0,7	1	0,4106
	Controle vs. 0°C 1 h	7,4	1	0,0064 (*)
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	74,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
Fêmeas	Controle 40°C 1h 0°C 1h	6,1	2	0,0484 (*)
	Controle vs. 40°C 1h	5,8	1	0,0161 (*)
	Controle vs. 0°C 1h	4,4	1	0,0356
	Controle 40°C 12h 0°C 12h	74,0	2	0,0000 (*)
	Controle vs. 40°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
	Controle vs. 0°C 12h	49,0	1	0,0000 (*)
Machos vs. Fêmeas	Controle	4,3	1	0,0373 (*)
	40°C 1 h	1,5	1	0,2251
	40°C 12 h	0,0	1	1,0000
	0°C 1h	7,1	1	0,0077 (*)
	0°C 12h	0,0	1	1,0000

* = diferenças significativas

4.1.7) Ninfas de hábito domiciliar bem alimentadas x pouco alimentadas

Comparando-se os dados de ninfas de *Panstrongylus megistus* de hábito domiciliar (Figs. 1 e 2, Tabelas 1 a 4), verifica-se que choques hipertérmicos de curta duração praticamente não afetam a taxa de mortalidade em todos os estádios, independente de suas condições alimentares. Já para o choque hipertérmico de 12 horas, embora a mortalidade total tenha sido induzida em ninfas bem alimentadas, ninfas pouco alimentadas de 5o. estágio mostraram uma taxa de sobrevivência de 18% ao final do experimento.

Choques hipotérmicos de curta duração causaram declínio comprovado como estatisticamente significativo na taxa de sobrevivência de ninfas de 3o. estágio em ambas as condições nutricionais, porém não alteraram a sobrevivência de ninfas de 4o. e 5o. estádios bem e pouco alimentadas. Queda acentuada na taxa de sobrevivência foi constatada após choques hipotérmicos de longa duração.

Com relação às mudas, choques hipertérmicos de 1 hora não afetaram sua ocorrência em ninfas pouco alimentadas, contrastando com uma ligeira diminuição em ninfas de 3o. e 4o. estádios bem alimentadas. As ninfas de 5o. estágio sobreviventes ao choque de 12 horas não sofreram mudas. Choques hipotérmicos de curta duração assim como choques de longa duração (hipertérmicos e hipotérmicos) induziram queda na incidência de mudas, independente das condições alimentares.

4.1.8) Ninfas de hábito silvestre bem alimentadas x pouco alimentadas

Com relação às ninfas de *Panstrongylus megistus* de hábito silvestre (Figs. 3 e 4, Tabelas 5 a 8), o fator pouca alimentação esteve implicado na sobrevivência ao choque hipertérmico de 1 hora apenas de ninfas de 3o. estágio. Uma leve diminuição na incidência de mudas foi verificada em todos os estádios, exceto em ninfas de 3o. estágio bem alimentadas, onde não houve alteração. Choque hipertérmico de 12 horas causou mortalidade total dos insetos.

O choque hipotérmico de 1 hora causou pequena queda significativa de sobrevivência, independente das condições nutricionais, sendo verificada uma diminuição acentuada quanto à ocorrência de mudas. Após choque hipotérmico de 12 horas, ninfas de 3o. e 5o. estágio pouco alimentadas e de 5o. estágio bem alimentadas mostraram-se mais resistentes, porém não sofreram mudas.

4.1.9) Ninfas de hábito domiciliar x silvestre

- Bem alimentadas:

Comparando-se os dados de ninfas bem alimentadas, mas de hábito diferente (Figs. 1 e 3, Tabelas 1, 2, 5, 6), verificou-se que de modo geral, choques hipertérmicos de curta duração não afetaram a sobrevivência, enquanto os de longa duração causaram mortalidade total para espécimes de ambos os hábitos. O choque hipotérmico de curta duração causou leve diminuição na sobrevivência de ninfas bem alimentadas de hábito domiciliar e silvestre, exceto as de 4o. estágio de hábito silvestre onde até se verificou um aumento na taxa de sobrevivência. Já após o choque de 12 horas, houve queda total ou acentuada da sobrevivência para todas as ninfas, sendo esta um pouco menos drástica em ninfas de 5o. estágio de hábito silvestre e ninfas de 3o. e 4o.

estádio de hábito domiciliar. Diminuição na ocorrência de mudas foi observada para todos os casos, exceto nas ninfas de 3o. estágio submetidas a choque hipertérmico de curta duração.

- Pouco alimentadas:

Comparando-se ninfas pouco alimentadas de hábito domiciliar vs. silvestre (Figs. 2 e 4, Tabelas 3, 4, 7 e 8) pôde-se verificar que o choque hipertérmico de curta duração causou pequena diminuição tanto na sobrevivência quanto na ocorrência de mudas somente nas ninfas de 3o. e 4o. estádios de hábito silvestre. O choque hipotérmico de curta duração afetou significativamente as ninfas de 3o. estágio em ambos os casos, bem como as de 4o. e 5o. estádios de hábito silvestre. Quanto aos choques de longa duração, o hipertérmico causou mortalidade total (exceto para ninfas de 5o. estágio de hábito domiciliar), enquanto o hipotérmico induziu pequena porcentagem de sobreviventes no 3o. e 5o. estágio de hábito silvestre e no 4o. estágio de hábito domiciliar.

4.1.10) Alados domiciliares x silvestres

Com relação aos alados domiciliares e silvestres de *Panstrongylus megistus*, notou-se que choques de longa duração, tanto o hipotérmico quanto o hipertérmico, causaram mortalidade total dos espécimes, logo no primeiro dia após choque (Figs. 5 e 6, Tabelas 9 a 13).

Quanto a choques de curta duração, na quase totalidade dos casos (exceto adultos pouco alimentados de hábito silvestre), as fêmeas tiveram uma sobrevida maior quando submetidas aos choques. Dentre estes, os hipotérmicos foram os que, em geral, afetaram mais a sobrevivência, especialmente com relação aos machos (Figs. 5 e 6, Tabelas 9 a 13).

4.2) Análise de fenótipos nucleares

O fenótipo nuclear usual observado em túbulos de Malpighi de indivíduos machos de *Panstrongylus megistus* é aquele que exhibe pequenos grânulos cromatínicos de distribuição homogênea e um pequeno e conspícuo corpo heterocromático contribuído pelo cromossomo Y (Mello et al., 1986) (Figs. 7a, 8c). Este fenótipo foi detectado como o mais frequente nos insetos dos grupos controles, bem como naqueles submetidos às situações de choque (Tabelas 14 e 15). Além deste, outros fenótipos nucleares foram observados em todas as condições experimentais, , porém geralmente com maior frequência após o choque, embora com variações individuais (Tabelas 14 e 15). Esses fenótipos são: núcleos com aparente descompactação da heterocromatina (HD) (Fig. 7b); núcleos gigantes, obtidos por fusão nuclear e celular (G) (Figs. 7 e,f, 8c,d); núcleos apoptóticos (A) (Figs. 7f, g; 8a-d; 9b,c) ou suspeitos de processo apoptótico (A_s) (Fig. 7d) (A apoptose foi considerada aqui em termos morfológicos clássicos); núcleos com vacuolizações degenerativas, típicas de necrose (D) (Figs. 9a-c).

Os próprios núcleos gigantes podem se apresentar com sinais de degeneração (GD) ou suspeita de apoptose (G_s), ou ainda com aparente descompactação da heterocromatina (GHD) (Fig. 7 c, e, g).

O número total de núcleos das células epiteliais de túbulos de Malpighi, bem como, a frequência relativa dos diversos fenótipos nucleares são mostrados nas Tabelas 14 e 15, onde se pode verificar conforme mencionado acima, que o fenótipo mais comum foi aquele considerado normal, seguido pelos núcleos com suspeita de apoptose, em degeneração e núcleos com aparente descompactação da heterocromatina. Nota-se também, uma certa variação de fenótipos mesmo dentro da mesma condição experimental.

Núcleos em degeneração foram encontrados em todas as condições, sendo que em alguns poucos espécimes, apresentaram maior percentual entre os alterados. Núcleos apoptóticos foram encontrados em maior número em insetos submetidos a choque hipertérmico, principalmente 10 dias após choque. Quanto aos núcleos gigantes, estes foram observados em baixo percentual, sendo um pouco mais frequentes 10 e 30 dias após choques hipertérmicos de curta e longa duração, respectivamente, e em insetos submetidos a choques hipotérmicos, dissecados logo após o choque (Tabela 14).

Foi utilizada para se verificar a relação entre as condições estressantes e os diversos fenótipos nucleares, correlação linear (Tabela 16), a qual mede a relação linear entre as variáveis.

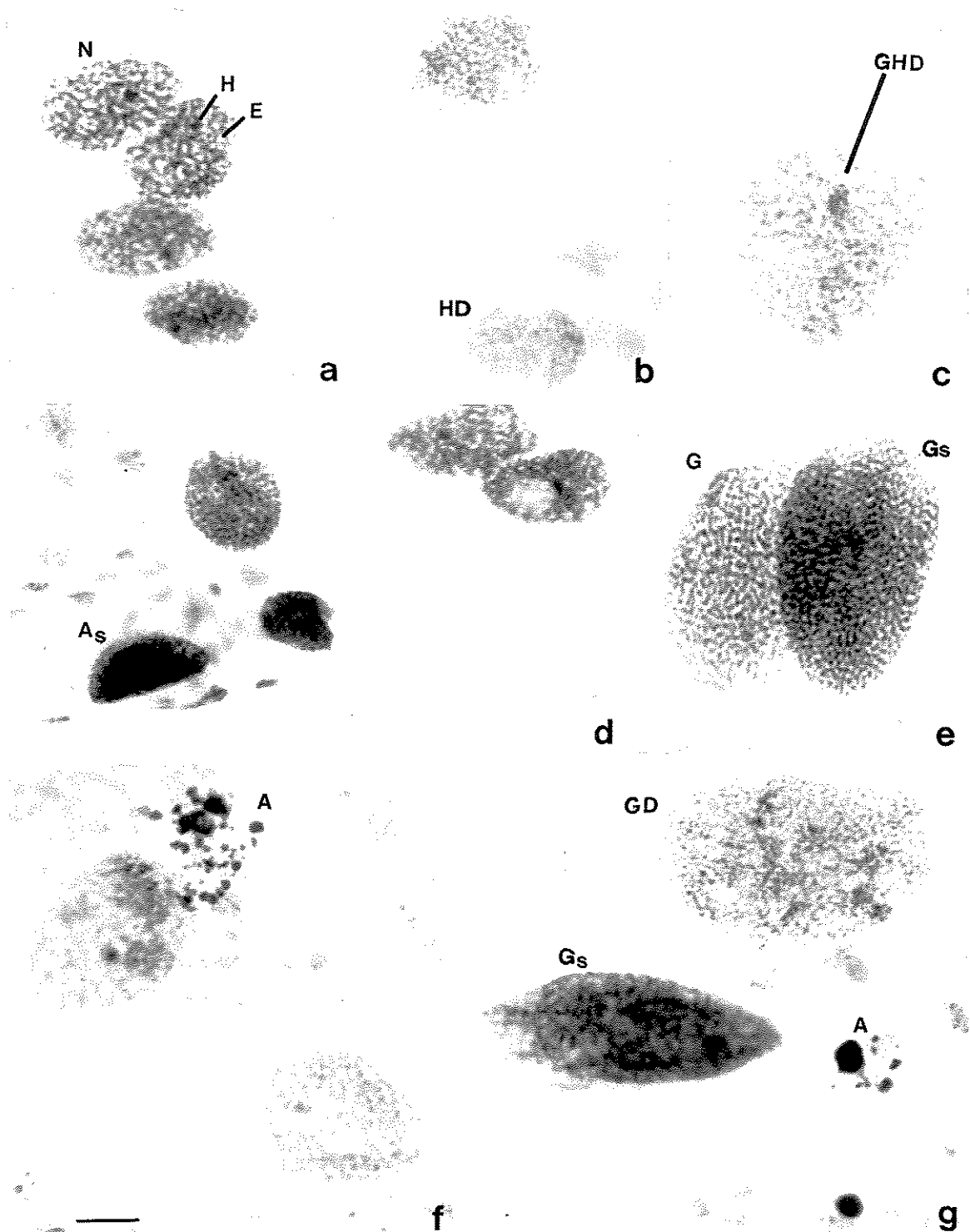


Figura 7: Fenótipos nucleares de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Panstrongylus megistus*. Reação de Feulgen. N = normal com pequenos grânulos cromatinicos de distribuição homogênea (E = euromatina) e conspícuo corpo heterocromático (H), A =apoptose, A_s = suspeito de apoptose, G = gigante, G_s = gigante com suspeita de apoptose, HD = aparente descompactação da heterorocromatina, GD = gigante em degeneração, GHD= gigante com heterocromatina aparentemente descompactada. Barra = 14,5 μm.

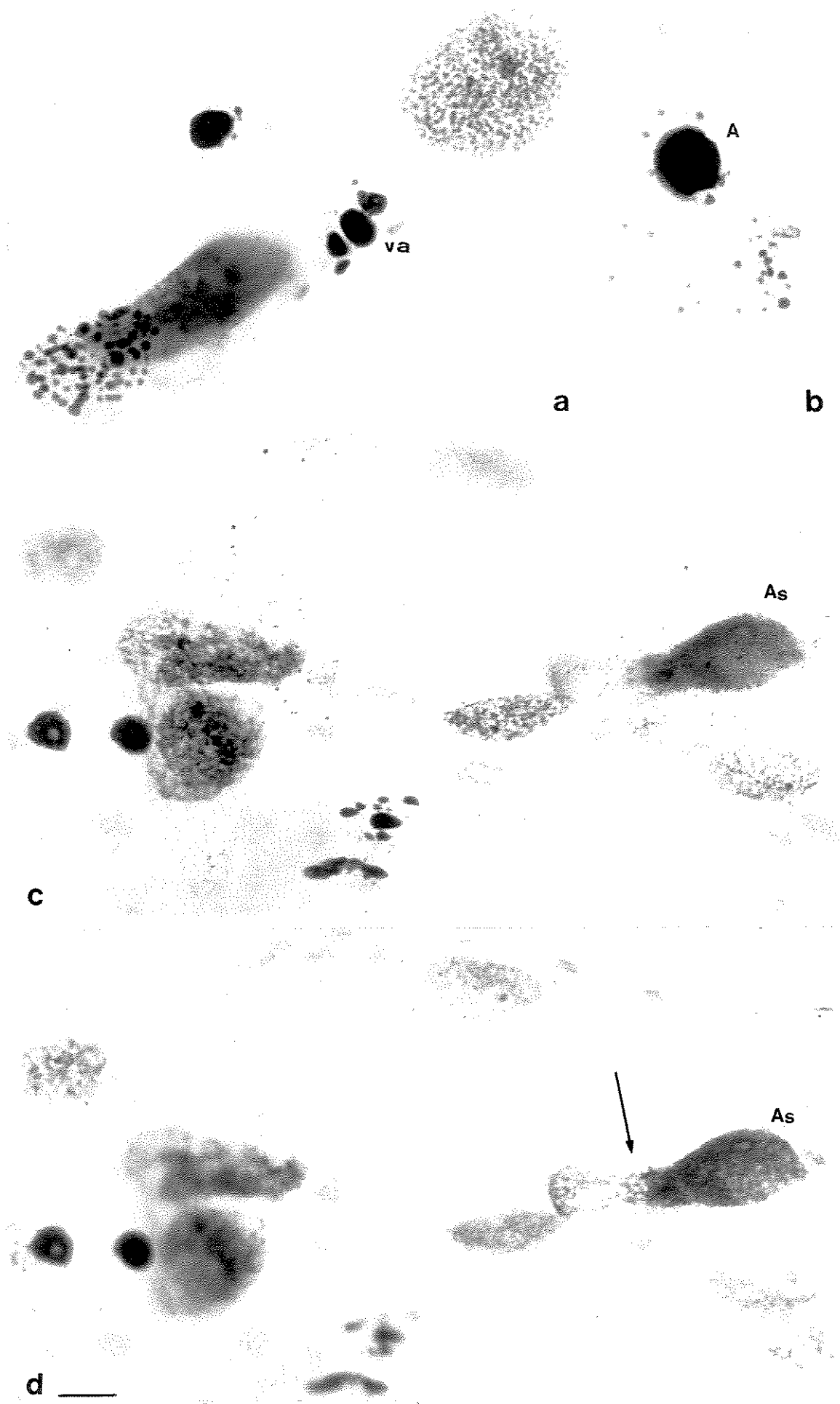


Figura 8: Fenótipos nucleares de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Panstrongylus megistus*. Reação de Feulgen. A = apoptose, A_s = suspeito de apoptose, va = vesículas apoptóticas; c e d = mesmo campo com diferentes profundidades de foco; seta (↘) núcleos em processo de fusão. Barra = 14,5 µm.

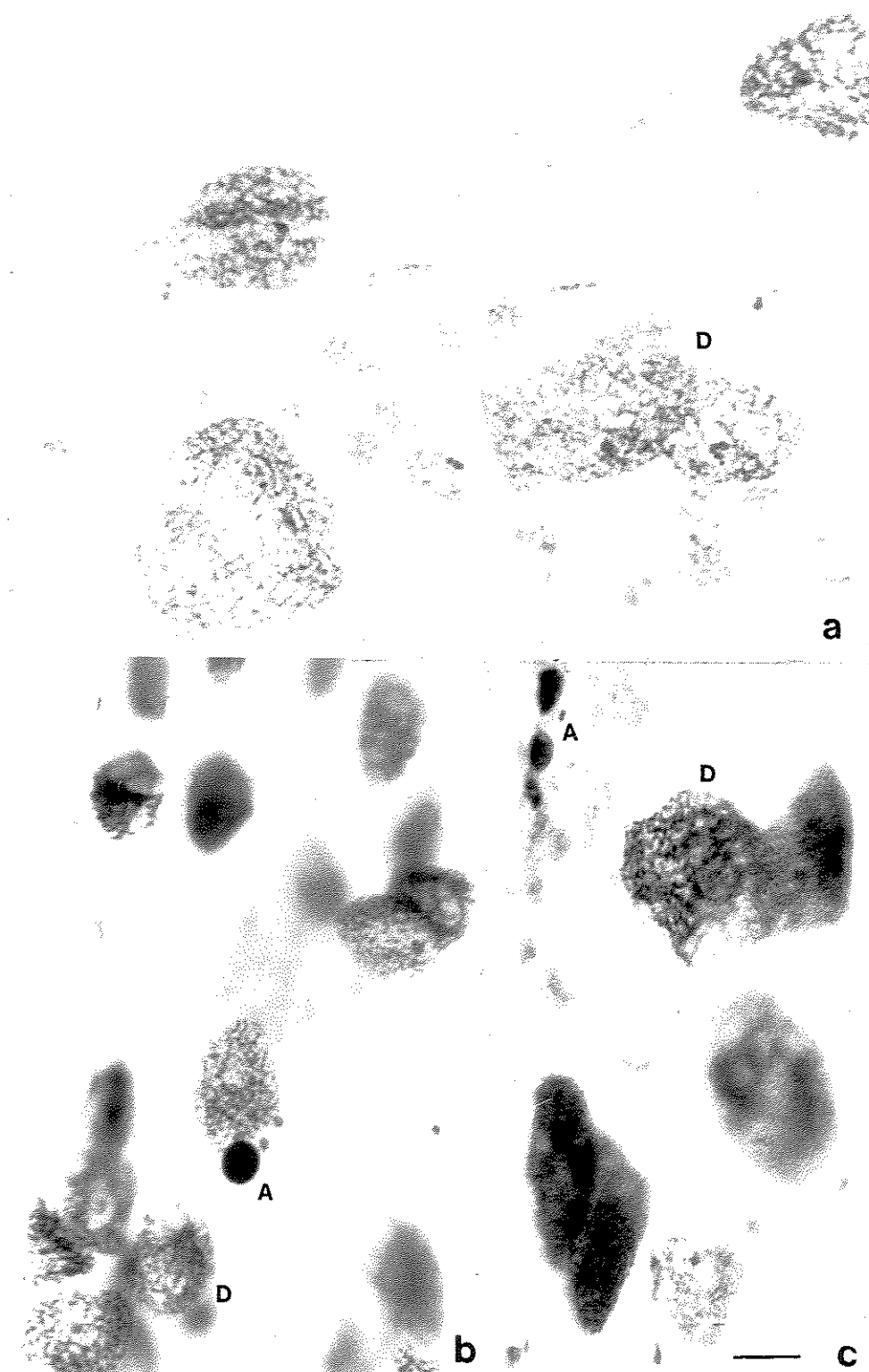


Figura 9: Fenótipos nucleares de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Panstrongylus megistus*. Reação de Feulgen. D = núcleos em degeneração, A =apoptose. Barra = 14,5 μ m.

Situação Exper.	Inseto	Fenótipos Nucleares									
		A	A _s	D	G	GD	GHD	G _s	HD	N	Total
Controle t ₀	I ₁	10	1324	1255	25	4	3	0	147	5302	8070
	I ₂	0	1345	192	1	1	0	0	54	8786	10378
	I ₃	6	2347	1037	0	0	0	0	35	10499	13951
40°, 1h t ₀	I ₄	54	2405	2292	12	1	2	15	143	9934	14858
	I ₅	77	1295	655	11	2	0	0	284	7914	10238
	I ₆	18	1447	984	3	0	0	0	340	13714	16506
0°, 1h t ₀	I ₇	49	1982	791	15	1	1	4	80	9083	12006
	I ₈	1	994	472	54	2	12	1	135	6956	8627
	I ₉	51	3036	946	42	2	4	17	396	12349	16823
40°, 12h t ₀	I ₁₀	16	2661	1402	1	0	0	4	119	13354	17557
	I ₁₁	3	2244	676	13	7	2	4	224	15389	18562
	I ₁₂	5	2954	1655	12	4	3	51	1048	11678	17410
Controle t _{10 dias}	I ₁₃	7	1729	325	6	0	0	0	98	9039	11204
	I ₁₄	9	2482	116	0	0	0	0	76	6479	9162
	I ₁₅	16	3252	728	0	0	0	0	268	11428	15692
40°, 1h t _{10 dias}	I ₁₆	371	2783	1477	14	0	3	17	667	9904	15236
	I ₁₇	25	1385	1272	68	20	17	22	275	3978	7062
	I ₁₈	35	2703	1696	229	87	33	20	525	10834	16162
0°, 1h t _{10 dias}	I ₁₉	52	2313	1298	7	1	0	0	110	13792	17570
	I ₂₀	33	2004	668	11	0	0	2	75	10699	13492
	I ₂₁	19	3587	1032	1	0	0	0	446	10495	15580

Tabela 14 : Frequência absoluta dos fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de 5o. estágio de *P. megistus* após choque hipotérmico de 1h (logo após choque, 10 dias após choque), hipertérmico de 1h (logo após choque, 10 dias após choque) e hipertérmico de 12 hs (logo após choque). Fenótipos nucleares: A =apoptótico, A_s = suspeito de apoptose, D = em degeneração, G = gigante, GD = gigante em degeneração, GHD = gigante com heterocromatina aparentemente descompactada, G_s = gigante com suspeita de apoptose, HD = heterocromatina em descompactação, N = normal (usual com um corpo de heterocromatina).

Situação Exper.	Inseto	Fenótipos Nucleares									
		A	A _s	D	G	GD	GHD	G _s	HD	N	Total
Controle t _{30 dias}	I ₂₂	25	2587	1476	3	0	0	0	173	10242	14506
	I ₂₃	11	1351	1882	10	0	0	8	295	8169	11726
	I ₂₄	23	2704	1962	5	0	0	0	424	10673	15791
	I ₂₅	8	1408	1522	5	0	1	0	164	7271	10379
40°, 1h t _{30 dias}	I ₂₆	29	3960	1164	1	0	0	0	864	11206	17224
	I ₂₇	13	3973	1576	0	0	0	0	335	10386	16283
	I ₂₈	8	2754	866	3	0	0	0	696	10877	15204
	I ₂₉	19	2218	745	5	0	0	0	130	7122	10239
0°, 1h t _{30 dias}	I ₃₀	5	2529	1057	0	0	0	0	68	6653	10312
	I ₃₁	7	2850	482	0	0	0	0	309	9830	13478
	I ₃₂	8	2910	4905	4	0	4	3	101	8733	16668
40°, 12h t _{30 dias}	I ₃₃	93	2329	2995	43	75	13	165	148	11894	17755
	I ₃₄	96	4787	840	19	15	0	12	124	12446	18339
	I ₃₅	47	3046	2455	14	3	3	17	204	7766	13555

Tabela 14(cont.) : Frequência absoluta dos fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de 5o. estágio de *P. megistus* após choque hipotérmico de 1h (logo após choque, 10 dias após choque), hipertérmico de 1h (logo após choque, 10 dias após choque) e hipertérmico de 12 hs (logo após choque). Fenótipos nucleares: A =apoptótico, A_s = suspeito de apoptose, D = em degeneração, G = gigante, GD = gigante em degeneração, GHD = gigante com heterocromatina aparentemente descompactada, G_s = gigante com suspeita de apoptose, HD = heterocromatina em descompactação, N = normal (usual com um corpo de heterocromatina).

Situação Exper.	Inseto	Fenótipos Nucleares								
		A	A _s	D	G	GD	GHD	G _s	HD	N
Controle t ₀	I ₁	0,12	16,41	15,55	0,31	0,05	0,04	0,00	1,82	65,70
	I ₂	0,00	12,96	1,85	0,01	0,01	0,00	0,00	0,52	84,65
	I ₃	0,04	16,86	7,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	75,40
40°, 1h t ₀	I ₄	0,36	16,19	15,43	0,08	0,01	0,01	0,10	0,96	66,86
	I ₅	0,75	12,65	6,40	0,11	0,02	0,00	0,00	2,77	77,30
	I ₆	0,11	8,77	5,96	0,02	0,00	0,00	0,00	2,06	83,08
0°, 1h t ₀	I ₇	0,41	16,51	6,59	0,12	0,01	0,01	0,03	0,67	75,65
	I ₈	0,01	11,52	5,47	0,63	0,02	0,14	0,01	1,56	80,63
	I ₉	0,30	18,03	5,62	0,25	0,01	0,02	0,10	2,35	73,32
40°, 12h t ₀	I ₁₀	0,10	15,16	7,99	0,01	0,00	0,00	0,02	0,68	76,06
	I ₁₁	0,02	12,09	3,64	0,07	0,04	0,01	0,02	1,21	82,91
	I ₁₂	0,03	16,97	9,51	0,07	0,02	0,02	0,29	6,02	67,08
Controle t _{10 dias}	I ₁₃	0,06	15,43	2,90	0,05	0,00	0,00	0,00	0,87	80,68
	I ₁₄	0,10	27,09	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	70,72
	I ₁₅	0,10	20,72	4,64	0,00	0,00	0,00	0,00	1,71	72,83
40°, 1h t _{10 dias}	I ₁₆	2,44	18,27	9,69	0,09	0,00	0,02	0,11	4,38	65,00
	I ₁₇	0,35	19,61	18,01	0,96	0,28	0,24	0,31	3,89	56,33
	I ₁₈	0,22	16,72	10,49	1,42	0,54	0,20	0,12	3,25	67,03
0°, 1h t _{10 dias}	I ₁₉	0,30	13,16	7,39	0,04	0,01	0,00	0,00	0,63	78,48
	I ₂₀	0,24	14,85	4,95	0,08	0,00	0,00	0,01	0,56	79,30
	I ₂₁	0,12	23,02	6,62	0,01	0,00	0,00	0,00	2,86	67,36

Tabela 15: Frequência relativa (%) dos fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de 5o. estágio de *P. megistus* após choque hipotérmico de 1h (logo após choque, 10 dias após choque), hipertérmico de 1h (logo após choque, 10 dias após choque) e hipertérmico de 12 hs (logo após choque). Fenótipos nucleares: A =apoptótico, A_s = com suspeita de apoptose, D = em degeneração, G = gigante, GD = gigante em degeneração, GHD = gigante com heterocromatina aparentemente descompactada, G_s = gigante com suspeita de apoptose, HD = heterocromatina em descompactação, N = normal (usual com um corpo de heterocromatina).

Situação Exper.	Inseto	Fenótipos Nucleares								
		A	A _s	D	G	GD	GHD	G _s	HD	N
Controle t _{30 dias}	I ₂₂	0,17	17,83	10,18	0,02	0,00	0,00	0,00	1,19	70,61
	I ₂₃	0,09	11,52	16,05	0,09	0,00	0,00	0,07	2,52	69,67
	I ₂₄	0,15	17,12	12,43	0,03	0,00	0,00	0,00	2,69	67,59
	I ₂₅	0,08	13,57	14,66	0,05	0,00	0,01	0,00	1,58	70,05
40°, 1h t _{30 dias}	I ₂₆	0,17	22,99	6,75	0,01	0,00	0,00	0,00	5,02	65,06
	I ₂₇	0,08	24,39	9,68	0,00	0,00	0,00	0,00	2,06	63,78
	I ₂₈	0,05	18,11	5,69	0,02	0,00	0,00	0,00	4,58	71,54
	I ₂₉	0,19	21,66	7,28	0,05	0,00	0,00	0,00	1,27	69,56
0°, 1h t _{30 dias}	I ₃₀	0,05	24,52	10,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,66	64,52
	I ₃₁	0,05	21,14	3,57	0,00	0,00	0,00	0,00	2,29	72,93
	I ₃₂	0,05	17,46	29,43	0,02	0,00	0,02	0,02	0,60	52,39
40°, 12h t _{30 dias}	I ₃₃	0,52	13,12	16,87	0,24	0,42	0,07	0,93	0,83	66,99
	I ₃₄	0,52	26,10	4,58	0,10	0,08	0,00	0,06	0,67	67,87
	I ₃₅	0,35	22,47	18,11	0,10	0,02	0,02	0,12	1,50	57,29

Tabela 15 (cont.): Frequência relativa (%) dos fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de 5o. estágio de *P. megistus* após choque hipotérmico de 1h (logo após choque, 10 dias após choque), hipertérmico de 1h (logo após choque, 10 dias após choque) e hipertérmico de 12 hs (logo após choque). Fenótipos nucleares: A =apoptótico, A_s = com suspeita de apoptose, D = em degeneração, G = gigante, GD = gigante em degeneração, GHD = gigante com heterocromatina aparentemente descompactada, G_s = gigante com suspeita de apoptose, HD = heterocromatina em descompactação, N = normal (usual com um corpo de heterocromatina).

	Dias	°C	h	N	D	A	HD	G	GD	GHD	A _s
N	-.53	-.13	-.02								
D	.34	.06	.06	-.76							
A	-.06	-.20	-.07	-.17	.06						
HD	.05	.33	-.01	-.29	.03	.25					
G	-.19	.10	-.14	-.20	.19	.04	.23				
GD	-.03	.27	.16	-.24	.25	.08	.12	-.81			
GHD	-.15	.10	-.10	-.28	.29	.05	.24	-.94	-.77		
A _s	.43	.00	-.02	-.55	-.07	.02	.09	-.08	-.12	-.10	
G _s	.01	.26	.48	-.27	.35	.19	.11	.27	-.67	.39	-.13

	Correlação moderada (entre 20% e 50%)
	Correlação alta (maior que 50%)

Tabela 16: Correlação linear entre os fatores de estresse (Dias = dias após choque, °C = temperatura do choque e h = duração do choque em horas) e frequência relativa dos fenótipos encontrados (A =apoptótico, A_s = com suspeita de apoptose, D = em degeneração, G = gigante, GD = gigante em degeneração, GHD = gigante com heterocromatina aparentemente descompactada, G_s = gigante com suspeita de apoptose, HD = heterocromatina em descompactação, N = normal (usual com um corpo de heterocromatina).

Constatou-se haver uma correlação negativa entre o número de núcleos normais e núcleos alterados, isto é, quanto maior o número de núcleos alterados menor a frequência de núcleos normais. Verifica-se também uma correlação positiva moderada entre aumento da temperatura e percentual de núcleos com aparente descompactação da heterocromatina, núcleos apoptóticos, núcleos gigantes em degeneração e com suspeita de apoptose. Com o aumento da duração do estresse (em horas), uma correlação moderada positiva pode ser observada com os núcleos gigantes suspeitos. Núcleos gigantes apresentaram alta correlação com os demais núcleos gigantes portadores de características adicionais (GD, GHD, G_s).

Resultados estatísticos para fenótipos nucleares

Nas figuras 10 e 11, podemos observar as tendências da frequência relativa dos diversos fenótipos, no decorrer dos dias após choque, aumento de temperatura e com relação à duração do choque (em horas).

Núcleos normais (figura 10A) diminuíram significativamente com o passar dos dias (valor $p = 0,005$) mesmo quando os insetos da situação controle foram considerados. Quanto aos demais fatores (temperatura e duração do choque), a análise estatística mostrou não haver diferenças.

A figura 10B indica que os núcleos apoptóticos aparecem com mais frequência nas condições de choque que nas condições controle, sendo esta diferença, estatisticamente significativa (valor $p = 0.034$). Visualmente, um aumento na frequência de núcleos apoptóticos para insetos

examinados 10 dias após choque pôde ser observado, bem como uma pequena queda com o aumento do estresse (em horas). Porém, tais alterações não foram confirmadas estatisticamente (valor de significância, respectivamente $p = 0,203$ e $p = 0,719$).

Na figura 10C, pode-se observar um aumento na frequência de núcleos suspeitos de apoptose conforme aumentam os dias pós choque para a dissecação dos insetos (valor $p = 0,023$). Se investigarmos somente insetos submetidos a choque, o aumento é ainda mais significativo (valor $p = 0,002$). Os outros fatores (temperatura e duração do choque não ocasionaram diferenças estatisticamente significantes).

Quando se consideram todos os insetos, núcleos em degeneração (figura 10D) apresentaram um aumento significativo na frequência entre 10 e 30 dias pós choque (valor $p = 0,052$). Entretanto, quando se analisa somente os insetos submetidos aos choques, essa diferença não é significativa (valor $p = 0,420$). Os demais fatores (temperatura e duração do choque) não mostraram alterações a nível estatístico.

Núcleos com heterocromatina aparentemente descompactada (figura 10E) sofreram um aumento significativo somente quando os insetos foram submetidos a choques hipertérmicos (valor $p = 0,021$). Quanto aos demais fatores, embora visualmente tenham sido observadas diferenças com relação a dias pós-choque e duração do estresse (em horas), estas não foram estatisticamente significantes.

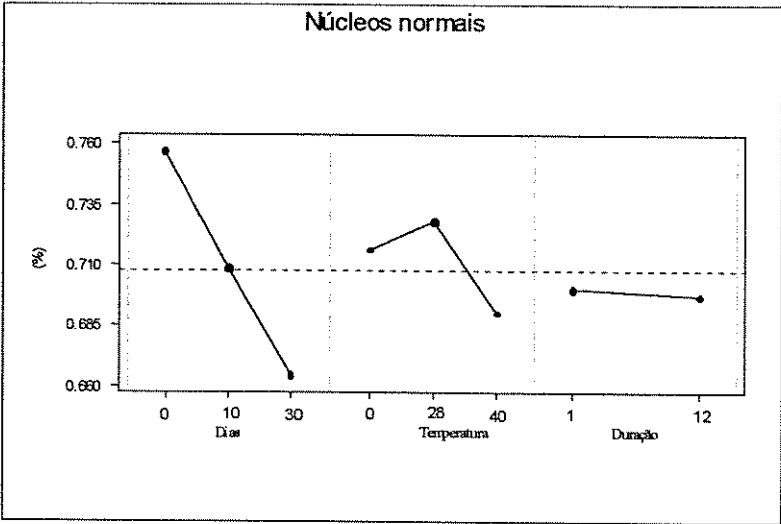
Núcleos gigantes (figura 10F) mostraram uma diminuição estatisticamente significativa em insetos dissecados após 30 dias (espécimes do grupo controle juntamente com os submetidos a choques) (valor $p = 0,038$). Alterações decorrentes da temperatura também foram significantes (valor $p = 0,015$) em termos estatísticos, principalmente por se modificarem com o passar dos dias para dissecação, isto é, existe uma interação entre efeitos da temperatura (choque hipotérmico, controle e choque hipertérmico) e os dias para análise (valor $p = 0,001$) (figura 11).

Núcleos gigantes com sinais de degeneração (figura 10G) foram encontrados com frequência significativamente maior em insetos submetidos a choque hipertérmico ($p = 0,018$), e em menor percentual após choques hipotérmicos.

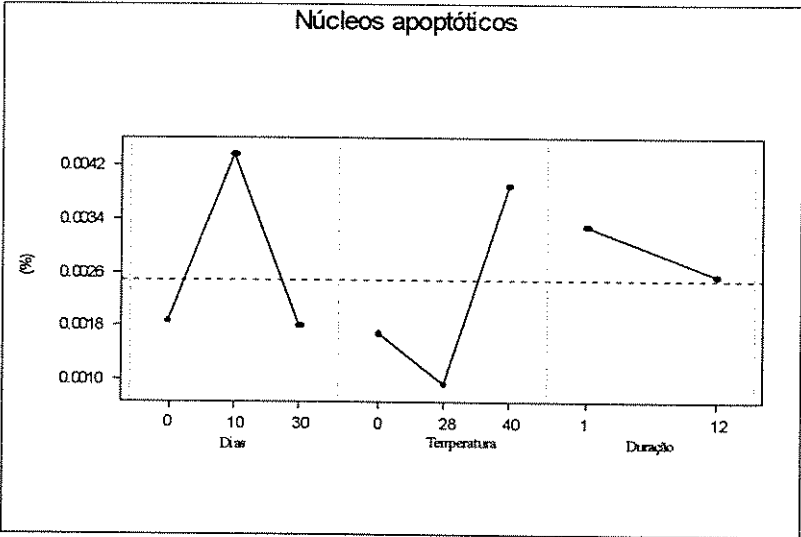
Na figura 10H observa-se uma tendência dos núcleos gigantes com heterocromatina aparentemente descompactada sofrerem queda na frequência aos 30 dias pós- choque. Entretanto, a baixa frequência relativa observada deste fenótipo tornou inviável uma análise estatística.

Núcleos gigantes com suspeita de apoptose (figura 10I) representaram o único fenótipo onde houve influência da duração do choque (valor $p = 0,053$). A análise estatística demonstrou não haver diferenças quanto à temperatura e dias para dissecação.

(A)



(B)



(C)

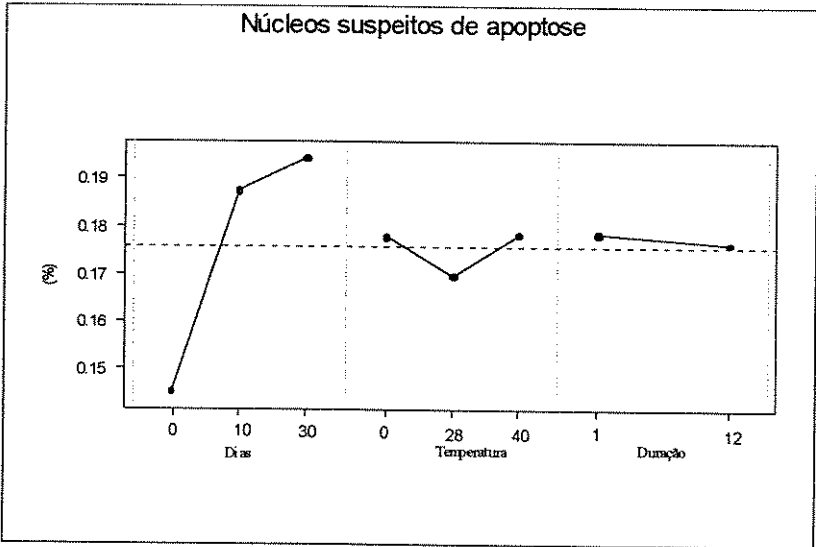
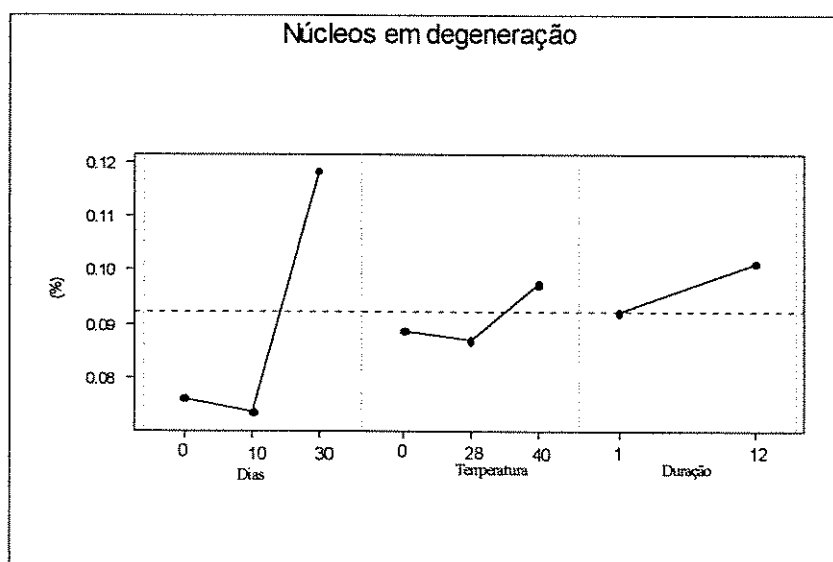
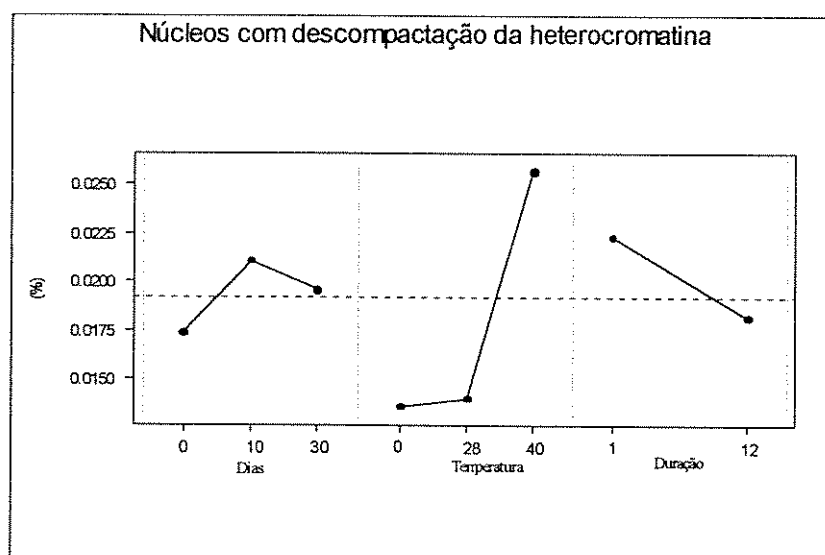


Figura 10: Efeitos dos fatores dias para dissecação, temperatura do choque (em °C) e duração do choque (em horas) na frequência relativa dos fenótipos nucleares.

(D)



(E)



(F)

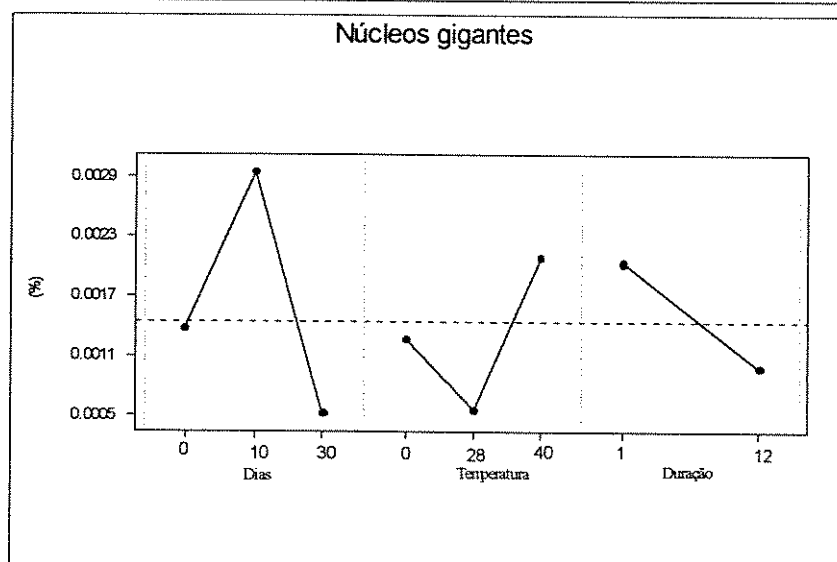
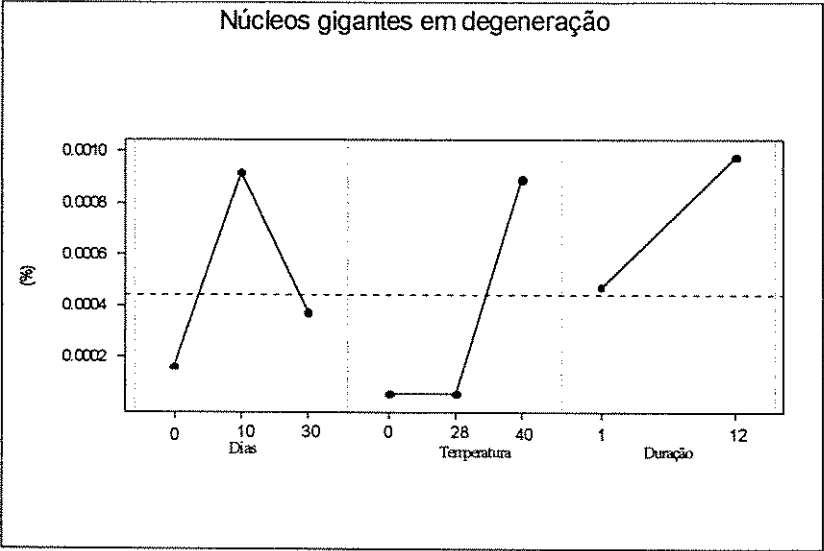
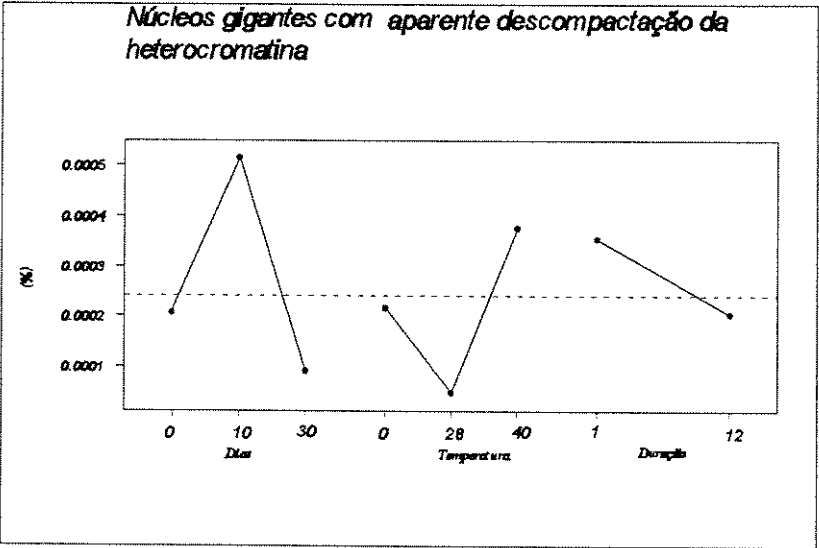


Figura 10 (cont.): Efeitos dos fatores dias para dissecação, temperatura do choque (em °C) e duração do choque (em horas) na frequência relativa de fenótipos nucleares.

(G)



(H)



(I)

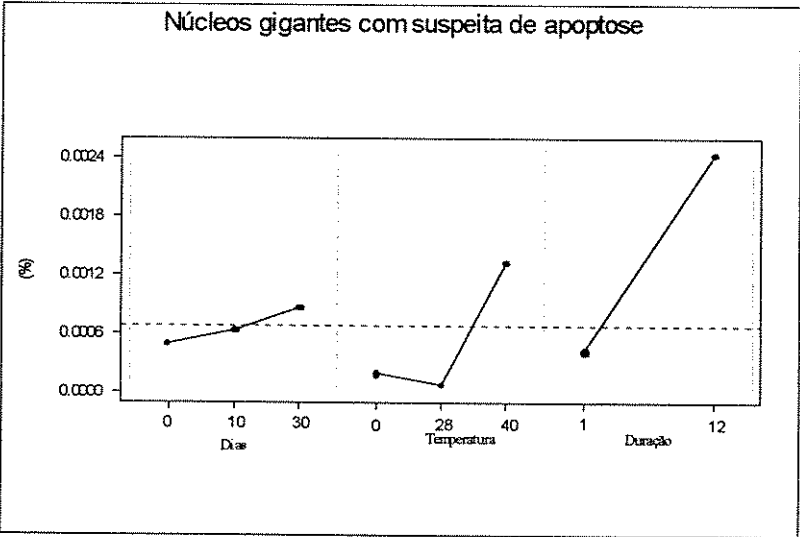


Figura 10 (cont.): Efeitos dos fatores dias para dissecação, temperatura do choque (em °C) e duração do choque (em horas) na frequência relativa de fenótipos nucleares.

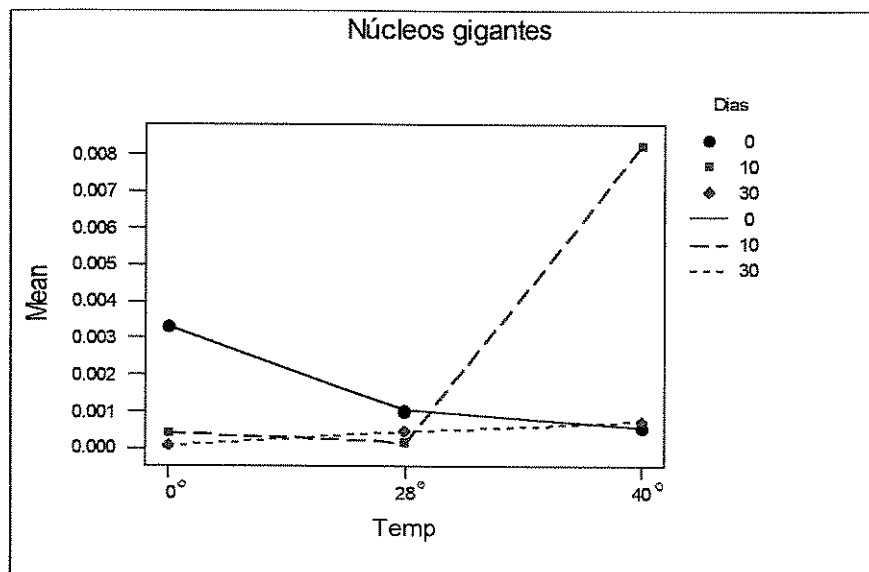


Figura 11: Efeito da interação dos fatores dias e temperatura do choque na frequência relativa de núcleos gigantes.

5.- DISCUSSÃO

5.1) Análise de sobrevivência e ocorrência de mudas

Os resultados descritos acima indicam variabilidade de resposta aos choques de temperatura quando se consideram a sobrevivência dos espécimes e a ocorrência de mudas em *Panstrongylus megistus*. Essa variabilidade depende da temperatura a que os insetos são expostos, duração do tratamento, fase do desenvolvimento e sexo dos espécimes. Choques hipertérmicos de curta duração pouco afetaram a sobrevivência dos insetos, principalmente das ninfas, enquanto os de longa duração foram letais na maioria dos casos. Quanto à ocorrência de mudas, pouca ou nenhuma alteração foi induzida. Embora choques hipotérmicos de longa duração tenham promovido um efeito drástico na taxa de sobrevivência dos insetos, os de curta duração também apresentaram efeitos deletérios em ninfas de 3o. estágio. Choques frios foram mais eficazes em promover uma diminuição na ocorrência de mudas em todos os estádios ninfais. De modo geral, as fêmeas mostraram-se mais resistentes aos choques de temperatura se comparadas aos machos. Os efeitos da alimentação e procedência não pareceram exercer grandes alterações na resposta ao choque térmico.

Comparando-se os dados de ninfas bem alimentadas de *Panstrongylus megistus* determinados neste estudo, com os de *Triatoma infestans* em mesma condição, previamente publicados (Rodrigues et al., 1991), são salientadas semelhanças e diferenças. Em geral, o comportamento das ninfas de 4o. e 5o. estádios em termos de sobrevida, quando submetidas aos choques de curta duração, é o mesmo para as duas espécies, porém, as ninfas de 3o. estágio de *T. infestans* parecem ser mais resistentes. Choques hipertérmicos de longa duração, cujo maior efeito sobre a sobrevida de *T. infestans* foi afetar não mais que 30% das ninfas de 3o. estágio (Rodrigues et al., 1991), provocaram a morte de todas as ninfas de 3o., 4o. e 5o. estádios de *P. megistus* aqui analisadas. Com relação às mudas, choques hipertérmicos de curta duração induziram ligeira diminuição em *P. megistus*, diferindo do comportamento de *T. infestans* em que houve um aumento na ocorrência no 3o. estágio e um declínio no 4o. e 5o. estádios sob a mesma condição experimental (Rodrigues et al., 1991). Choques hipotérmicos de longa duração induziram queda na taxa de sobrevivência em ambas as espécies, porém com maior intensidade em *P. megistus*. Independente da sua duração, o choque hipotérmico causou uma diminuição na ocorrência de mudas tanto em *T. infestans* quanto em *P. megistus*, com exceção das ninfas de 3o. estágio de *T. infestans* as quais em sua totalidade (100%) sofreram muda após choque de 1 hora (Rodrigues et al., 1991).

Comparando-se também os alados de *P. megistus* bem alimentados e procedentes do continente com os alados de *T. infestans*, nas mesmas condições nutricionais, verificou-se que choques de longa duração afetaram de modo significativo a taxa de sobrevivência de ambas as espécies, porém o efeito na espécie *P. megistus* foi mais drástico, acarretando mortalidade total dos espécimes. Com relação ao choque hipertérmico de curta duração, enquanto os adultos da espécie *T. infestans* apresentaram um aumento na sobrevida (ambos os sexos) (Rodrigues et al., 1991), os alados de *P. megistus* apresentaram um leve declínio na sobrevida, sendo este um pouco mais acentuado nos machos. Um aumento na taxa de sobrevivência também foi verificado em alados de *T. infestans* submetidos a choques hipotérmicos de curta duração, diferindo dos

espécimes de *P. megistus*, onde foi verificada uma queda acentuada. Nesta espécie, os machos mostraram-se menos resistentes aos choques de curta duração, enquanto em *T. infestans* os machos parecem ser mais sensíveis ao frio e mais resistentes ao calor (choques de longa duração).

É conhecido que o estresse ocasionado pelo rápido aumento na temperatura e outros agentes induzem, em todas as células, a síntese aumentada de proteínas de choque térmico, as quais parecem agir como um mecanismo homeostático de proteção celular em períodos críticos, além de exercerem importante papel no crescimento normal e desenvolvimento dos organismos (Burdon, 1986). A ação dessas proteínas poderia pois explicar a resistência das ninfas de *Panstrongylus megistus* aos choques hipertérmicos de curta duração. Entretanto, a alta mortalidade observada em todos os casos após choques hipertérmicos de 12 horas pode ser devida à insuficiência ou ineficácia das hsp constitutivas e/ou induzidas em proteger a maioria desses insetos de choques de longa duração. Sabe-se que embora a indução de hsp em diferentes organismos seja rápida, a temperatura ótima para indução de hsp varia com os organismos, diferentes tipos celulares de um mesmo organismo e entre hsp individuais dentro de um mesmo tipo celular (Lindquist, 1986). Além disso, a resposta parece ser transitória em temperaturas moderadas e sustentada em altas temperaturas até um nível, acima do qual as células começam a morrer. Essa amplitude de temperatura para a manutenção da síntese de hsp varia de organismo para organismo, podendo ser estreita para alguns e mais ampla para outros (Lindquist, 1986). Tal fato poderia ser uma das razões porque *Panstrongylus megistus* mostrou-se mais suscetível se comparado ao *Triatoma infestans* nas mesmas condições experimentais.

Diferindo de ninfas de 4o. e 5o. estágio bem como de adultos de *Triatoma infestans*, que apresentaram maior resistência aos choques hipertérmicos de longa duração, o que foi relacionada, à presença de núcleos gigantes, bem como a uma síntese maior de hsp por ocasião do choque, ou constitutivamente à produção de ecdisona (Rodrigues et al., 1991), em *P. megistus*, a mortalidade em todos os estádios foi acentuada ou total.

A queda na frequência de mudas ocorrida em insetos submetidos a choques hipertérmicos de curta duração e, em alguns casos, na velocidade de avanço, poderia ser explicada pela interferência no balanço hormonal do inseto. Wigglesworth (1984), por exemplo, verificou que o processo de muda em *Rhodnius* é retardado em temperaturas altas devido ao favorecimento do hormônio juvenil.

Os adultos de *P. megistus*, principalmente os machos, se mostraram mais afetados pelos choques hipertérmicos de curta duração que as ninfas. O tamanho dos insetos não foi um dos mecanismos de defesa ao choque por rápido aumento de temperatura. Tem sido descrito que com a hipertermia acentuada, os insetos morrem pelo efeito da temperatura em si, ou dessecação por evaporação e que insetos de maior tamanho poderiam diminuir a temperatura corporal, reduzindo com isso o nível fatal por curtos períodos. Manter-se-iam frios, por evaporação da água do corpo, exercendo assim, um grau limitado de controle de temperatura (Wigglesworth, 1984).

Já os choques hipotérmicos de curta duração (1h) causaram um efeito mais significativo para as ninfas de 3o. estágio de *P. megistus* (principalmente pouco alimentadas). Neste caso, é possível que tenha ocorrido uma maior suscetibilidade ao choque, relacionada ao menor tamanho desses espécimes. Em geral, insetos maiores são também mais eficientes em promover alterações químicas visando uma proteção contra o frio (Wigglesworth, 1984). A interferência no processo de muda (queda) devido ao choque hipotérmico, pode ser devida também à alteração hormonal, como já relatado em *T. infestans* (Rodrigues et al., 1991).

O encontro de um pequeno número de ninfas de *P. megistus*, que não foram capazes de completar o processo de muda pode ser devido ao fenômeno de fenocópia, como também já sugerido em *T. infestans*, por Dantas (1990). Defeitos de desenvolvimento induzidos por choque

térmico têm sido descrito por vários autores. Welte et al. (1995), verificaram que tratamentos térmicos produzem diversas anomalias que frequentemente mimificam efeitos de mutações, sendo, portanto, referidas como fenocópias. Diversos efeitos teratogênicos, entre eles, grandes alterações na oviposição e viabilidade dos ovos, bem como anomalias morfogenéticas têm sido descritos quando fêmeas de *Drosophila* foram transferidas de 26° C para 31° C (Lage e Rocha, 1993). Várias alterações na organização do citoplasma, entre eles, agregação de filamentos intermediários do citoesqueleto ao redor do núcleo, têm sido verificadas quando embriões de *Drosophila* são submetidos a choques térmicos severos e parecem estar envolvidos na indução de fenocópia. (Walter et al., 1990). Mitchell e Petersen (1985) também observaram que o choque térmico age impedindo a expressão de genes selvagens o que poderia atuar na indução desse fenômeno.

O efeito deletério acentuado, ocasionado pelo choque frio, foi considerado por Dantas (1990), em estudos a nível de sobrevivência em *T. infestans*, como devido a provável ineficiência de crioprotetores em tempos longos de exposição ao frio desde que existissem crioprotetores nesses insetos. O mesmo pode ser aplicado para explicar a alta mortalidade observada entre os espécimes de *P. megistus* submetidos a essa condição experimental. Além do glicerol, tem sido sugerido que as proteínas de choque térmico (hsp), possam também atuar como crioprotetores, de acordo com a observação de que estes são macromoléculas estabilizadoras (Komatsu et al., 1996). Outra sugestão é de que o estresse produzido pelo frio possa induzir a presença de proteínas denaturadas ou de proteínas anormais biossinteticamente, as quais são capazes de induzir síntese de hsp (Hightower e White, 1981). Entretanto, da mesma forma que em *Triatoma infestans* (Rodrigues et al., 1991), se a indução dessas proteínas ocorreu em espécimes de *P. megistus*, não foi suficientemente capaz de protegê-los do choque hipotérmico de 12 horas.

Sob condições favoráveis de laboratório, tem sido observado que espécimes machos de *P. megistus* apresentam um ciclo de vida mais curto se comparado às fêmeas (Heitzmann-Fontenelle, 1976 apud Lima et al., 1987). Essa maior resistência das fêmeas parece se aplicar, também, frente às condições desfavoráveis, já que após choques térmicos de curta duração, os espécimes machos de *P. megistus* mostraram-se menos resistentes que as fêmeas, sugerindo algum fator para proteção relacionado ao sexo. Tal observação está de acordo com os estudos de Lima et al. (1987) e Vercosa et al. (1993), os quais verificaram que os machos são menos resistentes a condições adversas, como jejum e irradiação gama, respectivamente. Os resultados encontrados em *P. megistus* contrastam, em parte, com o observado em *T. infestans*, onde os machos apresentaram menor resistência ao frio e maior resistência ao calor que as fêmeas (Rodrigues et al., 1991).

A não discriminação da resposta ao choque térmico entre os espécimes de hábito domiciliar e silvestre está em concordância com resultados obtidos a nível celular por Mello et al (1986), onde também não foram constatadas diferenças drásticas para outros parâmetros, como número de cromossomos, conteúdo de DNA, frequência nuclear e cromocêntrica, embora diferenças de comportamento entre espécimes de hábito domiciliar e silvestre sejam bem documentadas em condições naturais (Forattini, 1980). Segundo dados obtidos da SUCEN (informação pessoal: Antenor N. Ferraz Filho), os insetos utilizados neste estudo eram descendentes de espécimes domiciliares e silvestres, criados e reproduzidos no insetário desde 1990. Por não terem ultrapassado a 10a. geração, deveriam ser semelhantes àqueles provenientes da geração inicial. Entretanto, o fato desses espécimes terem sido mantidos em condições de laboratório, pode ter atenuado possíveis características comportamentais frente aos choques.

O efeito das condições nutricionais também não exerceu grandes alterações na resposta ao choque térmico, a nível de sobrevivência e ocorrência de mudas, embora tenha sido

demonstrado que espécimes de *Triatoma infestans* mantidos em jejum são mais resistentes aos efeitos de estressores como metais pesados e a infecções com fungos *Metarhizium anisopliae* (Mello et al., 1995). Deve ser salientado, entretanto, que a baixa condição nutricional (15 dias de jejum) a que os espécimes de *P. megistus* foram submetidos não pode ser considerada uma situação de jejum extremo, já que os triatomíneos são capazes de suportar a falta de alimento por período prolongado (meses) (Sherlock, 1979; informação pessoal de Antenor N. Ferraz Filho - SUCEN). Este fato, talvez, possa explicar a pouca diferença observada entre espécimes bem e pouco alimentados em termos de sobrevivência e ocorrência de mudas.

5.2) Análise de fenótipos nucleares

O número máximo de núcleos, detectado nos túbulos de Malpighi de *Panstrongylus megistus*, acha-se de acordo com os relatos de Mello et al. (1986), onde as frequências nucleares foram em torno de 18.000 a 19.000, embora esses dados sejam referentes à alados, diferindo deste trabalho onde foram utilizadas ninfas de 5o. estágio. Tem sido demonstrado que nesses órgãos, o número total de núcleos permanece constante ao longo do desenvolvimento do inseto, sendo esse achado, referente somente a espécimes bem nutridos (Mello, 1978c).

A maioria dos fenótipos nucleares alterados observados em *Panstrongylus megistus* têm sido também encontrados em *Triatoma infestans* submetidos a choques térmicos e outras condições estressantes (Mello, 1983, 1989; Kubrusly, 1984; Andrade e Mello, 1987; Álvares-Garcia, 1988; Dantas e Mello, 1992; Mello et al., 1995), embora os níveis de sobrevivência dessas espécies difira (Rodrigues et al., 1991; item 1 da discussão). Esses fenótipos são ou de caráter degenerativo, ou são uma forma de proteção ou tentativa de ativação de genes silentes (Dantas, 1990).

Como também verificado em *T. infestans* (Dantas, 1990), os núcleos mais frequentes observados em *P. megistus*, foram os normais, os quais apresentam um formato elipsoidal e a cromatina granular. Entretanto, enquanto na primeira espécie os núcleos exibem grandes corpos heterocromáticos, representados principalmente pelos cromossomos autossômicos A, B, C (Schreiber e Pellegrino, 1950; Mello e Recco-Pimentel, 1987), em espécimes machos de *P. megistus*, são detectados nas células dos túbulos de Malpighi, núcleos com um pequeno e conspicuo corpo heterocromático ou então ausência do mesmo (Mello, 1978a; Mello et al., 1986). Há sugestões de que na espécie *P. megistus*, o cromocentro presente apenas em machos, seja representado pelo cromossomo Y heterocromático (Mello et al., 1986).

O fato de fenótipos alterados ocorrerem mesmo nos grupos controles (Tabelas 14 e 15), embora geralmente em menor frequência, pode ser devido às condições de baixa nutrição (15 dias de jejum) nas quais os espécimes foram mantidos antes da realização dos experimentos, mesmo tendo sido oferecida alimentação semanal após o início dos experimentos. Essa situação de baixa condição nutricional foi escolhida, por aparentemente não interferir com os resultados de sobrevivência dos insetos e por facilitar as atividades operacionais de dissecação. Entretanto, sabe-se que o jejum é um fator estressante em hemípteros reduviídeos ocasionando nestes, a fusão nuclear e celular e até mesmo degeneração de alguns núcleos (Mello, 1983, Mello, 1989; Andrade e Mello, 1987). Além do jejum, outros fatores poderiam estar envolvidos, como infecção viral (Dolder e Mello, 1978; Mello et al., 1980; Mello e Raymundo, 1980).

Dentre os fenótipos alterados, núcleos em degeneração foram muito comuns. Esse fenótipo é decorrente de morte celular por necrose e parece representar uma falha catastrófica no metabolismo, diretamente causador de vários danos moleculares e/ou estruturais. É comumente

marcado por um aumento no volume total da célula e das organelas subcelulares, seguido por autólise com danificação da membrana (Kerr et al., 1972). Alterações nucleares são eventos posteriores resultantes da ativação de enzimas hidrolíticas as quais clivam o DNA de forma ao acaso (Kerr et al., 1972; Duvall e Wyllie, 1986). A condensação da cromatina ocorre em estágios precoces de necrose, mas esta não é redistribuída radicalmente, tendendo a formar grupos irregulares e pobremente definidos, embora a configuração total mostre-se preservada até que seja removida pelos fagócitos mononucleares. Esse tipo de morte celular caracteriza-se por envolver um grupo de células contíguas, queda da produção de ATP, dissolução das membranas, ruptura da célula com liberação de um exudado inflamatório o qual geralmente provê uma evidência confirmatória de necrose (Samali e Cotter, 1996). Tem sido descrita somente em distúrbios patológicos e pode resultar da exposição à hipertermia severa, hipóxia ou altas concentrações de substâncias tóxicas (Mosser e Martin, 1992). Neste trabalho, núcleos degenerados apresentaram sinais de desorganização do material cromatínico, resultando muitas vezes, em deformação do contorno nuclear, bem como presença de vacúolos. Tais características também haviam sido descritas em *T. infestans*, onde a maior frequência desse fenótipo foi observada em insetos submetidos a choques hipotérmicos de 12 horas, dissecados 1 mês após, situação experimental com a maior taxa de mortalidade (Dantas, 1990). Já em *P. megistus*, quando se analisaram apenas os dados de insetos submetidos a choques, não foi observada diferença significativa na frequência desse fenótipo em relação aos dias para dissecação. Porém, quando esses insetos foram analisados juntamente com os do grupo controle, um aumento estatisticamente significativo foi constatado, sugerindo que outros fatores de estresse, além do choque térmico, se revelaram capazes de promover uma intensificação na frequência de degenerações com o decorrer dos dias. Embora visualmente tenha sido observada uma pequena tendência dos choques térmicos, principalmente hipertérmicos, promoverem um aumento em núcleos degenerados, esta não foi confirmada estatisticamente, ou seja, os choques térmicos não alteraram a presença desse fenótipo em relação ao controle. Além da temperatura, a duração do tratamento também não interferiu nos resultados. Parece, portanto, que embora choques hipertérmicos de 12 horas, tenham ocasionado mortalidade quase total, os poucos insetos mais resistentes não sofreram degenerações adicionais, em frequência estatisticamente significativa a nível citológico. Deve ser salientado que o efeito do choque hipotérmico de longa duração a nível nuclear, não pôde ser estudado, pois a taxa de sobrevivência dos insetos submetidos a essa situação experimental foi nula. Entretanto, existe a possibilidade de que haja ocorrência de alta frequência de degenerações nucleares nessa situação de estresse, como relatado em *T. infestans*, e que por isso mesmo não haja sobrevivência dos insetos.

Apoptose, ao contrário da morte celular por necrose, consiste em alterações que requerem gasto de energia, sendo um mecanismo essencial de deleção celular que ocorre sob condições fisiológicas e patológicas. Exerce, portanto, papel fundamental na regulação do desenvolvimento dos tecidos em todos os organismos, permitindo que as células participem ativamente de sua própria morte (Wyllie et al., 1980; Samali e Cotter, 1996). Ocorre durante estágios precoces de embriogênese, na formação de órgãos, substituição de um tecido por outro e reabsorção de órgãos temporários, e em organismos adultos, tem um efeito oposto ao da mitose no controle da população celular (Umansky, 1996). Em tecidos normais, atua na regressão larval durante a metamorfose (Kerr et al., 1974), fusão do palato (Farbman, 1968), deleção de áreas interdigitais (Hammar e Mottet, 1971), na proliferação do epitélio do fígado, próstata (Kerr, 1971; Kerr e Searle, 1973) e cristas intestinais (Potten, 1977), bem como atresia do folículo ovariano (O'Shea et al., 1978), involução da lactação (Walker et al., 1989) e deleção de certos clones de linfócitos (Shi et al., 1989), entre outros. Morfologicamente, a apoptose envolve

redução do volume celular, formação de vesículas, condensação cromatínica e, *in vivo*, está associada com a formação de corpos (apoptóticos) contendo organelas bem preservadas, os quais são fagocitados por macrófagos ou células vizinhas (Kerr e Winterford, 1994). Diferindo da necrose, afeta células isoladas e não grupos de células, não envolve processos inflamatórios e tem por característica bioquímica principal a clivagem do DNA nuclear em fragmentos oligonucleossomais, pela ativação da endonuclease endógena, liderando então, a condensação cromatínica que geralmente precede a perda da integridade da membrana nuclear externa (Wyllie, 1980; Gerschenson e Rotello, 1992; Kerr e Winterford, 1994; Umansky, 1996). O reconhecimento por células fagocitárias ou células vizinhas, parece ocorrer através de moléculas específicas na superfície das células apoptóticas (Savill et al., 1990; Fadok et al., 1992).

A apoptose tem sido descrita em vários organismos, como um processo regulado geneticamente, modulado por íons e suscetível a vários inibidores e indutores (Moreira et al., 1996). Age como uma resposta fisiológica para remover células danificadas ou tecidos, podendo exercer importante papel na manutenção da estrutura do órgão e/ou impedindo funções alteradas por fatores externos (Sakaguchi et al., 1995). Em células tumorais, a frequência de células apoptóticas aumenta após vários estímulos como drogas citotóxicas (Searle et al., 1975; Barry et al., 1990), radiação (Macklis et al., 1992), hormônio (Miller et al., 1985; Szende et al., 1990), calor (Barry et al., 1990; Harmon et al., 1990; Takano et al., 1991). Perotti et al (1990) verificou que também choques frios induzem em células sinoviais humanas, quebras do DNA em fragmentos típicos de morte por apoptose.

O efeito do jejum moderado em associação à hipertermia, está sendo pesquisado no momento em *Triatoma infestans*, revelando níveis de apoptose mais elevados do que em controles (Vidal et al., 1996). Em *Panstrongylus megistus*, porém, independente do fato de que choques hipertérmicos eram de 1 ou 12 horas, não se verificou diferença estatisticamente significativa. A análise visual mostrou que com o decorrer dos dias para dissecação, houve uma tendência de um aumento de núcleos apoptóticos (de 0 a 10 dias), seguido por uma diminuição (de 10 a 30 dias), o que sugere que o programa para apoptose se intensificou no início do período de choque, e diminuiu posteriormente. Entretanto, a análise estatística demonstrou que essas alterações não foram significantes. Tais achados, sugerem que em *P. megistus*, o programa para apoptose se manteve em nível relativamente constante enquanto o estresse foi mantido e com o decorrer dos dias, com poucas novas células sendo estimuladas para ativar o programa de auto-destruição, enquanto os corpos apoptóticos foram sendo fagocitados.

Núcleos suspeitos de apoptose foram encontrados em maior frequência em insetos dissecados 10 e 30 dias após o início dos experimentos, independente se submetidos a choques ou não. São núcleos intensamente corados e possivelmente estariam entrando em processo apoptótico, mas ainda não apresentavam todas as características para serem considerados alterados.

O fato de muitos núcleos com cromocentros aparentemente descompactados terem sido detectados com frequência estatisticamente significativa em insetos submetidos a choques hipertérmicos, sugere que esses tratamentos sejam mais eficazes no afrouxamento da heterocromatina, se comparado aos choques hipotérmicos, o que também foi verificado em *T. infestans* (Dantas, 1990). Entretanto, enquanto nesta espécie, a maior frequência desse fenótipo foi observada logo após o choque (10min. a 2 horas), em *P. megistus* não foram detectadas diferenças significantes quanto aos dias para dissecação dos insetos, sugerindo que a descompactação da heterocromatina, a qual tem sido sugerida como uma possível tentativa de ativar genes silentes durante o estresse (Mello, 1983, 1989), se prolongou por mais tempo do que em *T. infestans*. Além de choque térmico, esse fenótipo tem sido descrito em *T. infestans*

após vários fatores de estresse tais como, jejum (Mello, 1983, 1989; Andrade e Mello, 1987), radiação ionizante gama (Álvares-Garcia, 1988) e metais pesados (Kubrusly, 1984; Mello et al., 1995), embora estes últimos pareçam ocasionar uma frequência mais elevada (Mello et al., 1995). Zonas com aumento de área heterocromática também têm sido reportadas em outros sistemas celulares em resposta a tratamentos térmicos, vírus, infecções microsporidianas, ação de antibióticos e em certas células tumorais (Simões et al., 1975; Simões e Cestari, 1982; Diaz et al., 1969; Sandritter et al., 1974).

Embora os cromocentros sejam áreas constituídas principalmente por heterocromatina constitutiva (Mello, 1971, 1975, 1978a, 1979, 1983; 1987), sua propriedade de não codificação não parece ser tão rígida, pois sob certas condições de estresse fisiológico, áreas dessa heterocromatina chegam a se descondensar e possivelmente sofram transcrição (Mello, 1983, 1989; Andrade e Mello, 1987; Dantas, 1990). Ainda não se sabe se essas áreas contêm genes codificadores de proteínas de choque térmico (Mello, 1989). Em regiões heterocromáticas de outros sistemas celulares, esses genes têm sido encontrados, mas sua expressão após o estresse, não determinada (Soughtgate, 1985 apud Dantas e Mello, 1992). 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 cessar a ação direta do estresse (Mello, 1989).

Outro fenótipo observado foram os núcleos gigantes, os quais se caracterizam pelo tamanho bem mais acentuado se comparado aos normais. São decorrentes de fusão nuclear e/ou celular e têm sido descritos nos triatomíneos como um possível mecanismo de sobrevivência celular ou do órgão sob condições desfavoráveis (Wigglesworth, 1967; Mello e Raymundo, 1980; Mello, 1989; Dantas e Mello, 1992). Dentre os estressores, Wigglesworth (1967) verificou que o jejum extremo promoveu, em células do corpo gorduroso de *Rhodnius prolixus*, o surgimento de poliploidia esporádica através de fusão celular, produzindo células binucleadas ou multinucleadas e então a fusão dos núcleos. Em ninfas de 5o. estágio de *Triatoma infestans* submetidas a 3 meses de jejum, fusão envolveu 40% núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi (Andrade e Mello, 1987). Nestes insetos, a presença acentuada de núcleos gigantes, ao lado das proteínas de choque térmico, foram consideradas um dos fatores responsáveis pela alta razão de sobrevivência em insetos submetidos a choques hipertérmicos de longa duração (12h) (Dantas e Mello, 1992). Embora um aumento significativo desse fenótipo em relação ao controle tenha sido observado nos espécimes de *P. megistus* submetidos a choques hipertérmicos, a frequência não se intensificou com a duração do tratamento. A alta taxa de mortalidade observada quando os espécimes foram submetidos a choques de 12 horas, sugere que esses núcleos foram insuficientes ou ineficazes em proteger a maioria dos insetos nessa condição experimental. Os sobreviventes do choque, quando analisados juntamente com os insetos do grupo controle, apresentaram uma diminuição significativa de núcleos gigantes com o decorrer dos dias para dissecação (principalmente entre 10 e 30 dias), sugerindo a existência de um limiar para a ocorrência de fusão celular e/ou nuclear, que parece ser inferior ao de *T. infestans*, onde a maior frequência desse fenótipo foi aos 30 dias. Além do declínio de novas fusões, o fato de alguns núcleos gigantes terem sido encontrados com características adicionais como degenerações, início de apoptose ou descompactação da região heterocromática, pode ter contribuído para a redução em sua frequência.

A elevação da frequência de núcleos gigantes com suspeita de apoptose, conforme o aumento da duração do choque, sugere que alguns núcleos gigantes já presentes ou recém-fundidos podem não ter suportado manter seu metabolismo nestas condições, ativando um programa para auto-destruição. Quanto aos núcleos gigantes com sinais de degeneração, os

insetos submetidos a choques hipertérmicos apresentaram um aumento significativo, ao contrário do obtido com núcleos degenerados. Tais achados parecem indicar que células e/ou núcleos resultantes de fusão foram mais suscetíveis a falhas no metabolismo induzidas por choque hipertérmico, se comparados aos normais, embora núcleos gigantes sejam considerados como uma possível tentativa de sobrevivência celular em situações desfavoráveis (Wigglesworth, 1967; Mello e Vidal, 1978; Mello, 1989; Dantas e Mello, 1992).

Tem sido descrito que células em cultura respondem a alterações em seu ambiente normal de crescimento de modo gradual. Em resposta a baixos níveis de estresse, é iniciada a síntese de uma série de hsp. Quando o elemento de estresse é removido, essas células continuam a funcionar normalmente e os níveis de hsp voltam ao seu nível normal (Craig, 1975; Lindquist, 1986; Lindquist e Craig, 1988). É possível que as proteínas de choque térmico protejam as células contra a apoptose, por inibição ou modificação de uma ou mais proteínas envolvidas no programa de morte, ou talvez, através de seu papel no dobramento das proteínas, poderiam atuar na manutenção da forma inativa da endonuclease que promove a quebra do DNA em fragmentos oligonucleossômicos (Mailhos et al., 1993; Samali e Cotter, 1996). Uma vez aumentado o nível de estresse e o seu limiar ultrapassado, tornando a sobrevivência da célula 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 e Cotter, 1996). Lennon et al. (1990), ao estudarem linhagens de células tumorais submetidas a peróxido de hidrogênio, oxidantes e etanol, entre outros, verificaram que baixas concentrações desses agentes promoviam um aumento na frequência de apoptose, enquanto altas concentrações resultavam em necrose. Esses mesmos autores observaram que dependendo da temperatura de choque térmico empregada, o tipo mais proeminente de morte celular poderia ser alterado. Quando culturas de mastocitoma de rato foram mantidas em temperaturas de 43°C a 44°C, apresentaram um aumento na frequência de apoptose. À 45°C, verificou-se um aumento de casos tanto de apoptose quanto de necrose, e quando submetidas a temperaturas mais elevadas (46°C e 47°C), pelo mesmo período de tempo, somente morte celular via necrose era detectada (Harmon et al., 1990). Segundo Cotter e Al-Rubeai (1995), as células sofrem necrose em altos níveis de estresse porque não têm tempo para responderem aos estímulos, enquanto em níveis intermediários, a célula é injuriada mas não morre imediatamente, e como resultado, tem um tempo para ativar o seu programa de apoptose. No presente trabalho, o fato de núcleos apoptóticos serem observados com frequência significativa após choques hipertérmicos (40°C), ao contrário de núcleos em degeneração, sugere que nessa temperatura, ainda foi possível a célula ativar sua auto-destruição. O aumento na frequência de núcleos apoptóticos após choques hipertérmicos de curta duração parece não ter refletido na taxa de sobrevivência dos insetos. Entretanto, após choques de longa duração, os insetos podem ter sofrido alterações nucleares adicionais, exceto nos poucos sobreviventes nos quais provavelmente o nível de hsp se manteve por mais tempo, impedindo a intensificação desse programa de morte celular.

A diminuição na frequência de fenótipos normais com o decorrer dos dias de dissecação dos insetos, sugere que houve um aumento na frequência de alguns fenótipos alterados, o que foi confirmado estatisticamente para núcleos suspeitos de apoptose (dados de insetos submetidos a choque + grupo controle, ou somente de insetos submetidos a choque) e núcleos em degeneração (insetos submetidos a choque + grupo controle). Parece, portanto, que o efeito do estresse se intensificou com o avanço dos dias para dissecação, mesmo com os insetos retornando às condições normais. Através dos dados de correlação, pode-se verificar que em alguns casos (núcleos apoptóticos, gigantes com suspeita de apoptose e núcleos com heterocromatina

aparentemente em descompactação) houve um aumento da frequência com a elevação da temperatura).

Como descrito em espécimes de *T. infestans* submetidos a vários estressores (Kubrusly, 1984; Mello, 1989; Dantas e Mello, 1992; Mello et al., 1995), em *P. megistus* também foram verificadas variações em termos de número e tipos de fenótipos observados, mesmo dentro da mesma condição experimental. Tais discrepâncias individuais sugerem a existência de espécimes com diferentes níveis de resistência à ação deletéria dos diferentes estressores, incluindo choques térmicos.

A variabilidade no número de núcleos totais nas mesmas situações de choque ou controle deve-se provavelmente, além das diferenças individuais, a perdas ocasionais do tecido no sítio de inserção do túbulo durante a dissecação.

Comparando-se os dados deste trabalho para *Panstrongylus megistus*, com os reportados para *Triatoma infestans*, conclui-se que não devam ser feitas generalizações para diferentes espécies, quando se deseja considerar sua resposta de resistência ou comportamento de muda, bem como frequências fenotípicas, frente a agentes ambientais estressantes. Assim, há necessidade que se realizem estudos para diferentes espécies, para se conhecer seus comportamentos particulares. Essas considerações devem ser lembradas para a manutenção mais eficaz de insetos em laboratório, inclusive visando o seu uso em esquemas experimentais.

6.- CONCLUSÕES

1. A variabilidade na resposta ao choque térmico em *Panstrongylus megistus* depende da temperatura, duração do tratamento, fase do desenvolvimento e sexo dos espécimes. De modo geral, a condição alimentar e a procedência (hábito) dos insetos não parecem causar diferenças na taxa de sobrevivência e ocorrência de mudas.
2. Enquanto choques hipertérmicos de curta duração praticamente não afetaram a sobrevivência dos insetos bem como a ocorrência de mudas, os de longa duração foram letais na maioria dos casos. Choques hipotérmicos foram mais eficazes em promover queda na ocorrência de mudas, sendo que principalmente os de longa duração, ocasionaram efeito drástico na taxa de sobrevivência.
3. Em termos de nível de sobrevivência, ninfas de 4o. e 5o. estádios de *Panstrongylus megistus* apresentaram comportamento semelhante às de *Triatoma infestans* quando submetidas a choques de curta duração, enquanto as de 3o. estágio, parecem ser mais resistentes em *T. infestans*. Choques de longa duração afetaram ambas as espécies, porém, com maior intensidade as ninfas de *P. megistus*. Com relação às mudas, choques hipertérmicos de curta duração induziram ligeira diminuição em *P. megistus*, ao contrário de *T. infestans*, onde se verificou um aumento nas de 3o. estágio e uma diminuição nas de 4o. e 5o. estágio. Choques hipotérmicos, independente da duração, causaram diminuição na ocorrência de mudas em ambas as espécies.
4. Choques de longa duração afetaram os alados de *P. megistus* de modo mais drástico do que em *T. infestans*. Choques hipertérmicos de curta duração ocasionaram leve aumento na sobrevivência dos alados de *T. infestans*, diferindo de *P. megistus*, onde se verificou um leve declínio. Choques hipotérmicos de curta duração aumentaram a taxa de sobrevivência de espécimes de *T. infestans*, enquanto em *P. megistus*, uma queda acentuada foi verificada. Enquanto nesta espécie os machos mostraram-se menos resistentes aos choques de curta duração, em *T. infestans* os machos são mais sensíveis ao frio e mais resistentes ao calor, quando comparados às fêmeas.
5. Choques térmicos ocasionaram um aumento na frequência de vários fenótipos nucleares nas células epiteliais dos túbulos de Malpighi das ninfas de 5o. estágio de *P. megistus*. Os fenótipos alterados encontrados foram: núcleos apoptóticos, com suspeita de apoptose, degenerados, com heterocromatina aparentemente descompactada, núcleos gigantes, gigantes com suspeita de apoptose, gigantes degenerados, ou com heterocromatina aparentemente descompactada. Entretanto, o fenótipo mais frequente tanto nos insetos submetidos a choques quanto nos controles, foi o que manteve o aspecto normal.
6. Núcleos degenerados por necrose não aumentaram significativamente com os choques térmicos, sendo encontrados em alta proporção também nos grupos controles. Diferenças também não foram observadas com relação aos dias de dissecação ou duração do choque. Embora choques hipertérmicos de longa duração tenham ocasionado mortalidade quase total nos insetos, os poucos sobreviventes, parecem, portanto, não terem sofrido degenerações adicionais.
7. A frequência de núcleos apoptóticos aumentou com os choques de temperatura

(principalmente hipertérmico), independente da duração e dos dias de dissecação dos insetos, sugerindo, portanto, que o programa de auto-destruição se manteve, uma vez ativado. Em insetos submetidos a 40°C, o encontro de núcleos apoptóticos em frequência estatisticamente significativa, sugere que essa temperatura represente um estresse de nível intermediário, embora quando de longa duração tenha ocasionado mortalidade quase total dos insetos. É provável que os sobreviventes do choque hipertérmico de longa duração tenham mantido por mais tempo níveis suficientes de hsp, capazes de evitar uma intensificação do programa de apoptose.

8. Núcleos com heterocromatina aparentemente descompactada alcançaram maior frequência nos insetos submetidos a choques hipertérmicos, indicando que estes sejam mais eficientes em promover o afrouxamento da heterocromatina quando comparados aos choques hipotérmicos.

9. Choques hipertérmicos promoveram um aumento significativo na frequência de núcleos gigantes, independente da duração do tratamento. Apesar de mortalidade acentuada quando os insetos foram submetidos a choques de longa duração, os sobreviventes parecem não ter sofrido fusões adicionais com o aumento da temperatura. Com o decorrer dos dias pós-choque, houve uma diminuição na frequência desses núcleos, sugerindo a existência de um limite, acima do qual não são mais produzidos, sofrendo inclusive alterações adicionais (degenerações, início de apoptose ou descompactação da heterocromatina).

10. O achado de fenótipos alterados em insetos do grupo controle pode ter sido ocasionado por outros fatores de estresse no insetário como baixa condição nutricional a que os insetos foram mantidos, bem como presença de vírus. As variações individuais quanto aos tipos de fenótipos observados parecem estar relacionadas com os diferentes graus de resistência dos espécimes a nível de sobrevivência, mesmo dentro da mesma condição experimental.

11. Considerando-se as diferenças de resultados de *Panstrongylus megistus* comparados aos de *Triatoma infestans*, enfatiza-se a importância de estudos para diferentes espécies, a fim de se conhecer seus comportamentos particulares.

7.- ABSTRACT

Domestic and silvatic third, fourth and fifth instar nymphs and male and female adults of *Panstrongylus megistus* Burmeister with different feeding conditions were submitted to thermal shocks at 0°C and 40°C for 1 and 12 hours. After the shock the insects were returned to normal temperature and humidity conditions and followed for 30 to 35 days in order to determine survival rates, molting and nuclear phenotypes of Malpighian tubules. Since feeding and living conditions were not significant factors in the survival rates of specimens submitted to the thermal shock, fasting domestic fifth instars male nymphs were used in order to investigate nuclear phenotypes. The insects were submitted to thermal shocks at 0°C (1 hour) and 40°C (1 hour and 12 hours) being returned to control conditions (28°C). The insects were dissected right after shock, 10 and 30 days after shock for cytological analysis of their Malpighian tubule. The objective was to investigate the changes promoted by the shocks with views to provide adequate laboratory conditions and to understand changes caused by experimental schemes.

The results indicate that the response varies according to temperature, duration of treatment, development stage and sex. Short hyper thermic shocks had little effect, mainly for the nymphs, while long shocks were lethal in the majority of studied cases. About molting, few alterations were observed after hyper thermic shocks in contrast to hypothermic shocks which promoted a fall in the observed frequency. Hypothermic shocks, specially long ones, promoted a drastic fall in the survival rate of the specimens.

The most frequent phenotype observed was the one considered normal, not only for the control group but also for the insect submitted to the shocks. Altered phenotypes, found also in nuclear group, included degenerated, apoptotic, suspected of apoptosis, heterocromatin partially or completely unraveled, giant nuclei, this last phenotype being classified also as usual, degenerated, suspected of apoptosis and with heterocromatin partially unraveled. Among the altered phenotypes the predominant one was the suspected of apoptosis nuclei, followed by degenerated and heterocromatin partially unraveled nuclei. There were a rising statistically significant in the frequency of degenerated nuclei when analyzed 30 days after shock. Apoptotic nuclei were observed specially after hyper thermic shocks independently of duration of shock and time after shock. However, suspect of apoptosis nuclei were more frequently observed 30 days after shock. The most frequency of apparently unraveled heterocromatin nuclei occurred after hyper thermic shocks no matter the duration of the shock.

A rising in the frequency of giant nuclei was observed after hyper thermic shocks although it did not increase for insects submitted to long duration shocks. The few remain from long hyper thermic shocks presented a significant fall when analyzed 30 days after shock. An interaction between the factors days and temperature was verified for this experimental condition. Degenerated giant nuclei were observed mostly after hyper thermic shocks, while it was observed a rising in the frequency of suspected of apoptosis giant nuclei after long shocks. The rising in the temperature of the shock caused a rising in the frequency of apoptotic, suspects of apoptosis giant and apparently unraveled heterocromatin nuclei.

The data collected for *Panstrongylus megistus* behaved differently from the data collected previously for *Triatoma infestans*. Therefore, it shows the importance of studies concerning different species taking into account their peculiar behavior.

8.- RESUMO

Ninfas de 3o., 4o. e 5o. estádios e adultos de ambos os sexos de *Panstrongylus megistus* de hábito domiciliar e silvestre, bem e pouco alimentados, foram submetidos a choques de temperatura de 0°C e 40°C por 1h e 12 h. Após o choque, os insetos retornavam a temperatura e umidade controle (28°C e 80% U.R), e foram acompanhados diariamente durante um período de 30 a 35 dias para se determinar os níveis de sobrevivência. Para a análise de fenótipos nucleares foram utilizadas ninfas de 5o. estágio de hábito domiciliar e pouco alimentadas as quais foram submetidas a choques de 40°C por 1h e 12h e a 0°C por 1h. A dissecação dos insetos para a retirada dos túbulos de Malpighi foi efetuada imediatamente após o choque, 10 e 30 dias após. O objetivo foi determinar alterações decorrentes do choque de temperatura, visando promover manutenção mais adequada em insetário e interpretar alterações em insetos provenientes do meio ambiente em esquemas experimentais.

Os resultados indicaram variabilidade de resposta aos choques térmicos com relação aos parâmetros estudados. A variabilidade foi dependente da temperatura a que os insetos foram mantidos, duração do tratamento, fase do desenvolvimento e sexo. Choques hipertérmicos de curta duração pouco afetaram a sobrevivência dos insetos, principalmente das ninfas, enquanto os de longa duração foram letais na maioria dos casos. Quanto à ocorrência de mudas, pouca alteração se verificou após choques hipertérmicos, ao contrário do verificado após choques hipotérmicos, os quais se mostraram mais eficazes em promover uma diminuição nessa frequência. Choques hipotérmicos, especialmente os de longa duração, promoveram uma queda drástica na taxa de sobrevivência dos espécimes.

Os fenótipos nucleares mais frequentes tanto nos insetos do grupo controle quanto nos submetidos a choques, foram os núcleos considerados normais, ou seja, com um pequeno e conspicuo corpo heterocromático (cromossomo Y). Os fenótipos alterados, presentes inclusive nos grupos controle, foram núcleos em degeneração, apoptóticos, com suspeita de apoptose, com heterocromatina aparentemente descompactada, gigantes, gigantes em degeneração, com suspeita de apoptose e gigantes com a heterocromatina aparentemente descompactada. Dentre os fenótipos alterados em maior frequência foram encontrados núcleos suspeitos de apoptose seguidos por núcleos em degeneração e núcleos com a heterocromatina aparentemente descompactada. Um aumento estatisticamente significativo nos núcleos em degeneração foi constatado com o decorrer dos dias para dissecação dos espécimes. Núcleos apoptóticos foram observados principalmente após choques hipertérmicos, independente da duração do choque e do tempo pós-choque, enquanto núcleos suspeitos de apoptose foram mais frequentes em insetos dissecados 30 dias após o choque. A maior frequência de núcleos com aparente descompactação da heterocromatina ocorreu em insetos submetidos a choques hipertérmicos, independente da duração do tratamento.

Houve uma elevação na frequência de núcleos gigantes após choques hipertérmicos, embora esta não tenha se intensificado com o aumento da duração do tratamento. Os poucos insetos sobreviventes aos choques de 40°C por 12 h, apresentaram uma diminuição significativa, quando dissecados 30 dias após o choque, constatando-se também uma interação entre os fatores dias pós-choque e temperatura de choque. Núcleos gigantes em degeneração foram observados com maior frequência após choques hipertérmicos, enquanto um aumento na frequência de núcleos gigantes com suspeita de apoptose foi observado após aumento na duração do tratamento. Com a elevação da temperatura, verificou-se um aumento na frequência de núcleos apoptóticos, gigantes com suspeita de apoptose e núcleos com aparente descompactação da heterocromatina.

Os dados levantados para *Panstrongylus megistus* mostraram-se diferentes dos

previamente relatados para *Triatoma infestans*, salientando a importância de estudos para diferentes espécies, dado o seu comportamento particular.

9.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(segundo normas para publicação em Journal of Experimental Zoology)

- Álvares-Garcia, R.S. (1988) Efeitos da radiação gama sobre os fenótipos nucleares de alguns tipos celulares de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). Masters Thesis, UNICAMP, Campinas.
- Amaral, M.D., L. Galego, and C. Rodrigues-Pousada (1988) Stress response of *Tetrahymena pyriformis* to arsenite and heat shock. Differences and similarities. Eur. J. Biochem., 171: 463- 470.
- Ananthan, J., A.L. Goldberg, and R. Voellmy (1986) Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. Science., 232: 522-524.
- Andrade, C.G.T.J., and M.L.S. Mello (1987) Phenotypes and number of Malpighian tubule nuclei in *Triatoma infestans* Klug along development and starvation. Rev. Bras. Genet., 10: 449-457.
- Aragão, M.B. (1975) Sobre o comportamento de alguns insetos hematófagos. Arq. Biol. Tecnol. (Curitiba), 18: 3-23.
- Ashburner, M. (1972) Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila* VI. Induction by ecdysone in salivary glands of *D. melanogaster* cultured *in vitro*. Chromosoma, 38: 255-281.
- Ashburner, M., and J.J Bonner (1979) The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. Cell, 17: 241-254.
- Atkinson, B.G. (1981) Synthesis of heat shock proteins by cells undergoing myogenesis. J. Cell. Biol., 69: 666-673.
- Barnett, T., M. Altschuler, C.N. McDaniel, and J.P. Mascarenhas (1990) Heat shock induced proteins in plant cells. Dev. Genet. 1: 331-340.
- Barreto, M.P. (1979) Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Z. Brener and Z. Andrade, ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 89-151.
- Barry, M.A., C.A. Behnke, and A. Eastman (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. Biochem. Pharmacol., 40: 2353-2362.
- Beaumont, A.R., and K.S. Kelly (1989) Production and growth of triploid *Mytilus edulis* larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 132(1): 69-84.
- Berger, E.M., and M.P. Woodward (1983) Small heat shock proteins in *Drosophila* may confer thermal tolerance. Exp. Cell. Res., 147: 437-442.

- Bienz, M., and H.R.B Pelham (1987) Mechanisms of heat shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv. Genet.*, 24: 31-69.
- Bonato, M.C.M., and M.H. Juliani (1987) Choque térmico. *Ciênc. Hoje*, 6 (35): 55-60.
- Bond, U., and M.J. Schlesinger (1985) Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 5: 949-956.
- Bottela, L.M., G. Morcillo, D. Baretino, and J.L Diez (1991) Heat shock induction and cytoplasmic localization of transcripts from telomeric associated sequences in *Chironomus thummi*. *Exp. Cell. Res.*, 196 (2): 206-209.
- Burdon, R.H. (1986) Heat shock and the heat shock proteins. *J. Biochem.*, 240: 313-324.
- Burdon, R.H., A. Slater, M. McMahon, and A.C.B. Cato (1982) Hyperthermia and heat-shock proteins of Hela cells. *Br. J. Cancer*, 45: 953-963.
- Burton, V., H.K. Mitchell, P. Young, and N.S. Petersen (1988) Heat shock protein against cold stress of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 3550-3552.
- Chen, C-P., D.L. Denlinger, and R.E. Lee (1987) Cold shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Zool.*, 60: 297-304.
- Chen, C-P., R.E. Lee Jr., and D.L. Denlinger (1991) Cold shock and heat shock: a comparison of the protection generated by brief pretreatment at less severe temperatures. *Physiol. Entomol.*, 16: 19-26.
- Cheney, C.M., and A. Shearn (1983) Developmental regulation of *Drosophila* imaginal disc proteins: synthesis of a heat shock protein under non heat shock conditions. *Dev. Biol.*, 95: 325-330.
- Cherfas, N.B., B. Gomelsky, Y. Peretz, N. Ben Don, G. Hulata, and B. Moav (1993) Induced gynogenesis and polyploidy in the Israeli common carp line Dor-70. *Isr. J. Aquacult. Bamidgeh*, 5 (2): 59-72.
- Cherfas, N.B., Y. Peretz, N. Ben-Dom, B. Gomelsky, and G. Hulata (1994) Induced diploid gynogenesis and polyploidy in the ornament (koi) carp *Cyprinus carpio* L.3. Optimization of heat shock timing during the 2nd meiotic division and the 1st cleavage. *Theor. Appl. Genet.*, 89 (2-3): 281-286.
- Collier, N.C., M.P. Sheetz, and M.J. Schlesinger (1993) Concomitant changes in mitochondria and intermediate filaments during heat shock and recovery of chicken embryo fibroblasts. *J. Cell. Biochem.*, 52 (3): 297-307.
- Cotter, T.G., and M. Al-Rubeai (1995) Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *Tibtech*, 13: 150-155.

- Craig, N. (1975) Effect of reduced temperature on protein synthesis in mouse. *Cell*, 4: 329-335.
- Dantas, M. M. (1990) Efeitos de choques de temperatura sobre fenótipos nucleares de *Triatoma infestans* Klug, em condições de insetário da SUCEN de Mogi-Guaçu-SP. Masters Thesis, UNICAMP, Campinas.
- Dantas, M.M., and M.L.S. Mello (1992) Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. *Rev. Bras. Genet.*, 15 (3): 509-519.
- Diaz, M., C. Pavan, and R. Basite (1969) Effect of a virus and microsporidian infections in chromosomes of various tissues of *Rhynchosciara angelae*. *Rev. Bras. Biol.*, 29: 191-206.
- Dolder, H., and Mello, M.L.S. (1978) Virus-like particles in the Malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. *Cell. Mol. Biol.*, 23: 299-310.
- Duvall, E., and A.H. Wyllie (1986) Death and the cell. *Immunol. Today*, 7: 115-119.
- Ellis, R.J. (1991) Molecular chaperons. *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 321-347.
- Fadok, V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton, and P.M. Herson (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, 148: 2207-2216.
- Farbman, A.I. (1968) Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Dev. Biol.*, 18: 93-116.
- Fink, K., and E. Zeuthen (1980) Heat shock proteins in *Tetrahymena* studied under growth conditions. *Exp. Cell Res.*, 128: 23-30.
- Forattini, O.P. (1980) Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev. Saúde pública*, 14: 265-299.
- Francis, D., and L. Lin (1980) Heat shock response in a cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*. *Dev. Biol.*, 79: 238-242.
- Gerschenson, L.E., and R.J. Rotello (1992) Apoptosis: a different type of a cell death. *Faseb J.*, 6: 2450-2455.
- Guttman, S.D., and M.A. Gorovsky (1979) Cilia regeneration in starved *Tetrahymena*: an inducible system for studying gene expression and organelle biogenesis. *Cell*, 17: 307-317.
- Hammar, S.P., and N.K. Mottet (1971) Tetrazolium salt and electron-microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. *J. Cell. Sci.*, 8: 229-251.
- Handler, A. M. (1982) Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 93: 73-82.

- Harmon, B.V., A.M. Corder, R.J. Collins, G.C. Gobé, and D.J. Allan (1990) 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: 854-858.
- Heine, U, L. Sverak, J. Kondratick, and R.A. Bonar (1971) The behavior of HeLa-S₃ cells under the influence of supranormal temperatures. *J. Ultrastruct. Res.*, 34: 375-396.
- Heitzmann-Fontenelle, T.J. (1976) Bionomia comparada de triatomíneos I. *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) (Hemiptera: Reduviidae). *Studia Ent.*, 19 (1/4): 201-210 apud Lima M.M., P. Jurberg, and J.R. Almeida (1987) Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chaga's disease. IV. Fecundity, fertility and longevity of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) pairs and virgin females starved under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 82 (4): 501-509.
- Hightower, L.E., and F.P. White (1981) 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: 261-275.
- Ingolia, T.D., E.A. Craig, and B.J. McCarthy (1980) Sequence of three copies of the gene for the major *Drosophila* heat shock induced protein and their flanking regions. *Cell*, 21: 669-679.
- Ireland, R.C., E.M. Berger (1982) Ecdysterone induces the transcription of 4 heat shock genes in *Drosophila* S₃ and imaginal discs. *Dev. Biol.*, 93: 498-507.
- Johnston, D., H. Oppermann, J. Jackson, and W. Levinson (1980) Induction of four proteins in chick embryo cells by sodium arsenite. *J. Bioch. Chem.*, 255: 6975-6980.
- Kalbfleish, J.D., and R.L. Prentice (1980) *The Statistical Analysis of Failure Time Data*, ed. John Wiley & Sons, New York.
- Kaul, S.C., and G.R. Sapra (1991) Heat shock induced ultrastructural alterations in *Stylomychia mytilus* cells. *Cell Struct. Function*, 16 (1): 95-104.
- Kavumpurath, S., and T.J. Pandian (1992) Effects of induced triploidy on aggressive display in the fighting fish, *Betta splendens* Regan. *Aquacult. Fish Manage.*, 23 (3): 281-290.
- Kelley, P.M., and M.J. Schlesinger (1978) The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression on chicken embryo fibroblasts. *Cell*, 15: 1277-1286.
- Kerr, J.F.R. (1971) Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.*, 105: 13-20.
- Kerr, J.F.R., and J. Searle (1973) Delection of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch. B.*, 13: 87-102 apud Gerschenson L.E., and R.J. Rotello (1992) Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.*, 6: 2450-2455.
- Kerr, J.F.R., and C.M Winterford (1994) Apoptosis : its significance in cancer and cancer

- Kerr, J.F.R., and C.M Winterford (1994) Apoptosis : its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73 (8): 2013-2026.
- Kerr, J.F.R., A.H. Wyllie, and A.R. Currie (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.
- Kerr, J.F.R., B. Harmon, and J. Searle (1974) 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: 571-585.
- Kim, D.S., C.A.Jeong, and I.B. Kim (1993) Induction of all female triploid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Korean J. Genet.*, 15 (3): 213-218.
- Komatsu, Y., O. Kodama, and K. Fujita (1996) Heat shock treatment reduces *in situ* temperature in yeast at sub-lethal high temperature. *Cell. Mol. Biol.*, 42 (6): 839-845.
- Kubrusly, F.S. (1984) Ação de cobre e mercúrio sobre estrutura nuclear e atividade de alguns sistemas enzimáticos em *Triatoma infestans* Klug. Masters Thesis, UNICAMP, Campinas.
- Lage, C.L.S., and H. Rocha (1993) Teratogenic effects of mild heat treatment on *Drosophila melanogaster*. *Arq. Biol. Tecnol. (Curitiba)*, 36 (2): 283-295.
- Lemaux, P.G., S.L. Herendeen., P.L. Bloch, and F.C. Neidhardt (1978) Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts. *Cell*, 13: 427-434.
- Lennon, S.V., S.J. Martin, and T.G. Cotter (1990) Induction of apoptosis (programmed cell death) in tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Biochem. Soc. Trans.*, 18: 343-345.
- Li, G.C., and D.C. Shrieve (1982) Thermal tolerance and specific protein synthesis in chinese hamster fibroblasts exposed to prolonged hypoxia. *Exp. Cell Res.*, 142: 464-468.
- Lima, M.M., P. Jurberg, and J.R. Almeida (1987) Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chaga's disease. IV. Fecundity, fertility and longevity of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) pairs and virgin females starved under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 82 (4): 501-509.
- Lindquist, S. (1980). Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: Implications for regulation. *Dev. Biol.*, 77: 463-479.
- Lindquist, S. (1986) The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 1151-1191.
- Lindquist, S., and E.A. Craig (1988) The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, 22: 631-677.
- Loomis F., and S. Wheeler (1980) Heat shock response of *Dictyostelium*. *Dev. Biol.*, 79: 399-408.

- Macklis, R.M., J.Y. Lin, B. Beresfold, R.W. Atcher, J.J. Hines, and J.L. Humm (1992) Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of α -particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat. Res.*, 130: 220-226.
- Mailhos, C., M.K. Howard and D.S. Latchman (1993) Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience*, 55 (3): 621-627.
- Maresca, B., and L. Carratu (1992) The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol. Today*, 8 (8): 260-266.
- Mason, P.J., L.M.C. Hall, and J. Gausz (1984). The expression of heat shock genes during normal development in *Drosophila melanogaster*. *Mol & Gen. Genet.*, 194: 73-78.
- Mello, M.L.S. (1971) Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv. Hemiptera). *Cytologia*, 36: 42-49.
- Mello, M.L.S. (1975) Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol.*, 8: 101-107.
- Mello, M.L.S. (1978a) Computer analysis of stained chromatin on Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). *Mikroskopie*, 34: 285-299.
- Mello, M.L.S. (1978b) Mechanism of polyploidization in the Malpighian tubes of blood-sucking reduviid hemipterans. *Rev. Brasil. Genet.*, 1: 97-102.
- Mello, M.L.S. (1979) Patterns of lability towards acid hydrolysis in heterochromatins and euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. *Cell. Mol. Biol.*, 24: 1-16.
- Mello, M.L.S. (1983) Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *J. Histochem.*, 15: 739-751.
- Mello, M.L.S. (1987) Cromatina e cromossomos. In: *Biologia Celular*. B.C. Vidal and M.L.S. Mello, ed. Atheneu, Rio de Janeiro, São Paulo, pp. 207-230.
- Mello, M.L.S. (1989) Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. Bras. Genet.*, 12: 485-498.
- Mello, M.L.S., and S.R.P. Miranda (1992) Interference image analysis of heat-shocked HeLa cells. *Acta Histochem.*, 93: 249-255.
- Mello, M.L.S., and H.H. Raymundo (1980) Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a blood-sucking hemipteran. *Cytologia*, 45: 203-209.
- Mello, M.L.S., and S.M. Recco-Pimentel (1987) Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the Malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. *Cytobios*, 52: 175-184.

- Mello, M.L.S., and B.C. Vidal (1978) A reação de Feulgen. *Ciênc. Cult. (São Paulo)*, 32(6): 665-676.
- Mello, M.L.S., V.L.C.C. Rodrigues, and H. Dolder (1980) Viral infection in blood-sucking hemipterans. *J. Submicrosc. Cytol.*, 12: 85-93.
- Mello, M.L.S., M.A. Randi, S. Giorgio, A.N. Ferraz-Filho, V.C.C Rodrigues, E.O. Rocha-E-Silva, and J.A. Cordeiro (1986) Number of chromosomes, Feulgen-DNA content and nuclear phenotypes in domestic and wild specimens of *Panstrongylus megistus*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 80 (6): 641-648.
- Mello, M.L.S., F.S. Kubrusly, M.A. Randi, V.L.C.C. Rodrigues, and A.N. Ferraz Filho (1995) Effects of heavy metals on chromatin supraorganization nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. *Entomol. Exp. Appl.*, 74: 209-218.
- Milkman, R. (1963). On the mechanism of some temperature effects on *Drosophila*. *J. Genet. Physiol.*, 46: 1151-1170.
- Miller, W.R., W.N. Scott, and R. Morris (1985) Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature*, 313: 231-233.
- Miranda, S.R.P., M.L.S. Mello, and A.E. Piedrabuena (1993) A karyometric study of heat-shocked HeLa cells. *Rev. Bras. Genet.*, 16: 161-173.
- Mitchell, H.K., and L.S. Lipps (1978) Heat shock and phenocopy induction in *Drosophila*. *Cell*, 15: 907-918.
- Mitchell, H.K., and N.S. Petersen (1985) The recessive phenotype of forked can be uncovered by heat shock in *Drosophila*. *Dev. Genet.*, 6 (2): 93-100.
- Moreira, M.E.C., H.A. Del Portillo, R.V. Milder, J.M.F. Balanco, and M.A. Barcinski (1996) Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J. Cell. Physiol.*, 167: 305-313.
- Morris, G.J., and P.F. Watson (1984) Cold shock injury - a comprehensive bibliography . *Cryo-Letters*, 5: 352-372 apud Chen, C.P., D.L. Delinger, and R.E.Lee Jr. (1987) Cold shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Zool.*, 60 (3): 297-304.
- Mosser, D.D., and L.H. Martin (1992) Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line. *J. Cell. Physiol.*, 151: 561-570.
- Munro, S., and H.R.B. Pelham (1985) What turns on heat shock genes ? *Nature (London)*, 317:477-478.
- Myers, J.M., D.J. Penman., Y. Basavaraju, S.F. Powel, P. Baoprassertkul, K.J. Rana, N. Bromage, B.M. McAndrew (1995) Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic

- Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Theor. Appl. Genet., 90 (2): 205-210.
- Nevins, J. (1981) Induction of the synthesis of a 70.000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E 1A product. Cell, 29: 913-919.
- O'Shea, J.D., M.F. Hay and D.G. Cran (1978) Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. J. Reprod. Fertil., 54: 183-187.
- Palter, K.B., M. Watanabe, L. Stinson, A.P. Mahowald, and E.A Craig (1986) Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp 70 cognate proteins. Mol. Cell. Biol., 6: 1187-1203.
- Pelham. H. (1985) Activation of heat shock genes in eukaryotes. Trends-Genet., 1: 31-35.
- Perotti, M, T. Filippo, F. Mirabelli, M. Vairetti, G. Bellomo, D.J. McConckey, and S. Orrenius (1990) Calcium-dependent DNA fragmentation in human synovial cells exposed to cold shock. FEBS Lett., 259 (2): 331-334.
- Pessoa, S.B. (1962) Domiciliação dos triatomíneos e epidemiologia da doença de Chagas. Arq. Hig. Saúde pública (São Paulo), 27: 161-171.
- Potten C.S. (1977) Extreme sensivity of some intestinal crypt cells to X and Y irradiation. Nature, 269: 518-521.
- Quinn, P.J. (1985) A lipid-phase separation model of low temperature damage to biological membranes. Cryobiology, 22: 128-146 apud Chen, C.P., D.L. Delinger, and R.E. Lee Jr.(1987) Cold shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. Physiol. Zool., 60 (3): 297-304.
- Randi, M.A.F. (1990) Efeito do choque térmico sobre mioblastos de galinha "in vitro". Masters Thesis, UNICAMP, Campinas.
- Richards, G. (1981) The radioimmune assay of ecdysteroid titres in *Drosophila melanogaster*. Mol. Cell. Endocrinol., 21: 181-197.
- Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia, 18: 571-573.
- Rodrigues, V.L.C.C., M.L.S. Mello, A.N. Ferraz Filho, and M.M. Dantas (1991) Sobrevivência e ocorrência de muda em *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) após choque de temperatura. Rev. Saúde publica (São Paulo), 25 (6): 461-467.
- Rodrigues, V.L.C.C., A.N. Ferraz Filho, E.O. Rocha e Silva, and V.L. Castor de Lima (1992) Prevalência, índices de infecção e hábitos alimentares de triatomíneos capturados em uma área de vigilância epidemiológica. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 25: 183-190.
- Rosa, J.A., J.M.S. Barata, N. Barelli, J.L.F. Santos, and F.M.B. Netto (1992) Sexual distinction

- between 5th instar nymphs of six species of triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 87 (2): 257-264.
- Sass, H. (1995) Transcription of heat shock gene loci versus non-heat shock loci in *Chironomus* polytene chromosomes: evidence for heat- induced formation of novel putative ribonucleoprotein particles (hsRNPs) in the major heat shock puffs. Chromosoma, 103: 528-538.
- Sakaguchi, Y., L.C. Stephens, M. Makino, T. Kaneko, F.R. Strebel, L.L. Danhauser, G.N. Jenkins, and J.M.C. Bull (1995) Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia. Cancer Res., 55: 5459-5464.
- Samali, A., and T.G. Cotter (1996) Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. Exp. Cell. Res., 223: 163-170.
- Sanchez, Y., and S.L. Lindquist (1990) HSP 104 required for induced thermotolerance. Science, 248: 1112-1115.
- Sanchez, E.H., D.O Toft, M.J. Schlesinger, and W.B. Pratt (1985) Evidence that the 90 kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. J. Biol. Chem., 260: 12398-12401.
- Sandritter, W., G. Kiefer, R. Salm, G.W. Moore, H. Grimm, and R. Kiefer (1974) DNA in heterochromatin cytophotometric pattern recognition image analysis among cell nuclei in duct epithelium and in carcinoma of the human breast. Beitr. Path., 151: 87-96.
- Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg, and C. Haslett (1990) Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Nature, 343: 170-173.
- Schlesinger, M.J. (1986). Heat shock proteins: The search for functions. J. Cell. Biol., 103: 321-325.
- Schreiber, G., and J. Pellegrino (1950) Eteropiconosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione. Scientia Genet., 3: 215-226.
- Schuh, S., W. Yonemoto, J. Brugge, V.J. Bauer, R.M Richl, W.F Sullivan, and D.O Toft (1985) A 90.000 dalton binding protein common to both steroid receptors and the Rous sarcoma virus transforming protein, pp 60 v-sarc. J. Biol. Chem., 260: 14292-14296.
- Sciandra, J.J., and J.R. Subjeck (1983) The effects of glucose on protein synthesis and thermosensitivity on chinese hamster ovary cells. J. Biochem. Chem., 258: 12091-12093.
- Searle, J. T.A. Lawson, P.J. Abbott, B. Harmon, and J.F.R. Kerr (1975) An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. J. Pathol., 116: 129-138.
- Sherlock, I.A. (1979) Vectores. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Z. Brener and Z.

- Andrade, ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 42-88.
- Shi, Y., B.M. Sahai, and D.R. Green (1989) Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature (London)*, 339: 625-626.
- Silva, I.G., and H.H.G. Silva (1993) Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. III. *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Bras. Entomol.*, 37 (3): 489-496.
- Silveira, A.C., and D.F. Rezende (1994) Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da Doença de Chagas no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 27 (supl III): 11-12.
- Silveira, A.C., V.R. Feitosa., R. Borges (1984) Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar no Brasil, 1975/ 1983. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, 36: 15-19.
- Simões, L.C.G., and A.N. Cestari (1982) Cromossomos politênicos: sistemas experimentais *in vivo* e *in vitro*. *Ciênc. Cult. (São Paulo)*, 34: 480-485.
- Simões, L.C.G., J.M. Amabis, and A.N. Cestari (1975) Puffs in the heterochromatin in chromosomes of *Rhynchosciara*. *Ciênc. Cult. (São Paulo)*, 27: 159-161.
- Sirotkin, K., and N. Davidson (1982). Developmentally regulated transcription from *Drosophila melanogaster* chromosomal site 67 B. *Dev. Biol.*, 89: 196-210.
- Southgate, R., M.E. Mirault, A. Ayme, and A. Tissières (1985) Organization, sequences, and induction of heat shock genes. In: *Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress*. Academic Press, Orlando, pp.183-195 apud Dantas, M.M., and M.L.S. Mello (1992) Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. *Rev. Bras. Genet.*, 15 (3): 509-519.
- Szende, B., G. Srkalovic, K. Groot, K. Lapis, and A.V. Schally (1990) Growth inhibition of mouse MXT mammary tumor by the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *J. Natl. Cancer Inst. Cell. Res.*, 82: 513-517.
- Takano, Y.S., B.V. Harmon, and J.F.R. Kerr (1991) Apoptosis induced by mild hypertermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J. Pathol.*, 163: 329-336.
- Tarelho, Z.V.S. (1981) Effects of low and high temperature on the spermatogenesis of *Apis mellifera* Linné, 1754. II. Effects of temperature on anaphase, telophase and spermiogenesis. *Rev. Bras. Genet.*, 4 (3): 387-397.
- Thomas, G.P., and M.B. Mathews (1984) Alterations of transcription and translation in Hela cells exposed to amino acid analogs. *Mol. Cell. Biol.*, 4 (6): 1063-1072.
- Thomas, S.R., and J.A. Lengyel (1986). Ecdysteroid regulated heat shock gene expression during *D. melanogaster* development. *Dev. Biol.*, 115: 434-438.

- Tissières, A., H.K. Mitchell, and U.M. Tracy (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 84: 389-398.
- Toro, J.E., and H.D. Sastre (1995) Induced triploidy in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Upe, 1854), and performance of triploid larvae. *J. Shellfish Res.*, 14 (1): 161-164.
- Umansky, S.R. (1996) Apoptosis: Molecular and cellular mechanisms (A Review). *Mol. Biol.*, 30 (3): 285-295.
- Varadaray, K. (1990) Production of diploid *Oerochromis mossambicus* gynogens using heterologous sperm *Ciprinus carpio*. *Indian J. Exp. Biol.*, 28 (8): 701-705.
- Vercosa, P., P.H.D.B. Falcão, and A.F. Furtado (1993) Effects of gamma irradiation on the reproductive capacity and the longevity of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 88 (2): 195-201.
- Vidair, C.A., S.J. Doxsey, and W.C., Dewey (1993) Heat shock alters centrosome organization leading to mitotic dysfunction and cell death. *J. Cell. Physiol.*, 154 (3): 443-445.
- Vidal, B.C., M.L.S. Mello, L.F. Barbisan, S.S. Maria, J. Russo, and M.C.H. Tavares (1996) *In situ* evaluation of apoptosis characteristics by a critical eletrolyte concentration assay and Feulgen reaction. In: IV Congresso da Associação Latino-Americana de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (ALAMCTA), Viña del mar, Chile, pp. 104.
- Vincent, M., and R.M. Tanguay (1979) Heat shock induced proteins present in the cell nucleus of *Chrironomus tentans* salivary gland. *Nature (London)*, 281: 501-503.
- Walker, N.I., R.E. Bennett, and J.F.R. Rotello (1989) Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am. J. Anat.*, 185: 19-32.
- Walter, M.F., N.S. Petersen, H. Biessmann (1990) Heat shock causes the collapse of the intermediate filament cytoskeleton in *Drosophila* embryos. *Dev. Genet.*, 11 (4): 270-279.
- Wanderley, D.M.V. (1991) Vigilância entomológica da doença de Chagas no Estado de São Paulo. *Rev. Saúde pública.*, 25 (1): 28-32.
- Webster, D.L., and K. Watson (1993) Ultrastructural changes in yeast following heat shock and recovery. *Yeast*, 9 (11): 1165-1175.
- Welch, W.J. (1993) How cells respond to stress. *Scientific American*, 5: 56-64.
- Welch, W.J., and J.P. Suhan (1985) Morfolological study of the mammalian stress response characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoeskeleton and nucleoli and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat shock treatment. *J. Cell. Biol.*, 101: 1198-1211.
- Welte, M.A., I. Duncan, and S. Lindquist (1995) The basis for a heat-induced developmental

- defect: Defining crucial lesions. *Genes & Dev.*, 9 (18): 2240-2250.
- Wigglesworth, V.B. (1967) Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of *Rhodnius* (Hemiptera). *J. Cell Sci.*, 2: 603-616.
- Wigglesworth, V.B. (1984) *Insect Physiology*, ed. Chapman and Hall, London, 8th Ed.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284: 555-556.
- Wyllie, A.H., J.F.R. Kerr, and A.R. Currie (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251-306.
- Yamamori, T.K., I. Y. Nakamura, and T. Yura (1978) Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift up of growth temperature. *J. Bacteriol.*, 134: 1133-1140.
- Zachariassen, K.E. (1985) Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.*, 65 (4): 799-832.
- Zimmerman, J.L., W. Petri, and M. Meselson (1983) Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNAs in normal development without heat shock. *Cell*, 32 (4): 1161-1170.