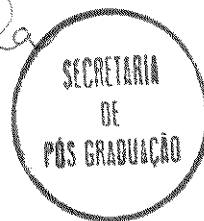


Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida pela Sra. Rosana de Souza
Alvares-Garcia e aprovada pela
Comissão Julgadora.



27/07/88

ROSANA DE SOUZA ALVARES-GARCIA

"EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE OS FENÓTIPOS NUCLEARES DE ALGUNS
TIPOS CELULARES DE Triatoma infestans KLUG (HEMIPTERA, REDUVIIDAE)"

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

Orientadora: Profa.Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Campinas, 1988

AL86e

9853/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meu companheiro, Celso Antônio,
pela sua dedicação e amor nas
horas difíceis e nos momentos
felizes, e a minha filha Ana
Carolina,

dedico.

Em memória de minha mãe, ao meu pai
e às minhas irmãs, pelo carinho e
incentivo,

ofereço

AGRADECIMENTOS

Profa.Dra. Maria Luiza S. Mello, pelo carinho com que me recebeu neste departamento, doando-se para transmitir e ensinar os conhecimentos científicos de maneira tão dedicada e segura.

Prof.Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelas críticas e sugestões desta tese, e pelo seu exemplo de seriedade científica.

Prof.Dr. Júlio Marcos Melges Walder, pelas sugestões e análises deste trabalho e pela confiança depositada em mim.

Profa.Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pelo incentivo constante, pela sua amizade e pelas críticas e sugestões deste trabalho.

Ao meu amigo Mauricio José Lopes Vaz do Amaral, pelo apoio e amizade dedicada durante estes anos de convivência e por sua ajuda no uso do microcomputador.

A Vera Lúcia Correia Feitosa e José Antonio N. da Silva, pelas palavras de incentivo e amizade.

Profas.Dras. Adelina Buzini da Costa Silva e Maria Astride Saad Corradi, Profa. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira e Prof.Dr. James Robert Coleman, pelos seus ensinamentos e incentivos no começo da minha carreira científica.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudo durante a vigência deste trabalho.

A Comissão de Pós-graduação do Instituto de Biologia da UNICAMP pela concessão da bolsa de Monitoria II.

Ao CENA, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (ESALQ), pela permissão do uso do reator atômico.

A SUCEN de Mogi-Guaçu (SP), pelo fornecimento dos espécimes usados neste trabalho.

Aos demais professores, funcionários e colegas de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Ao meu Deus, pela força, que acredito ter me dado nos momentos difíceis.

INDICE

INTRODUÇÃO	01
1- Alguns fundamentos da radiobiologia	01
A. Lei de Bergonié & Trebondeau	04
B. Efeitos diretos e indiretos da radiação	05
C. Relação entre volume de cromossomos e radiosensibilidade	06
D. Efeito do oxigênio	06
2- Radiosensibilidade	09
3- Efeitos das radiações sobre a cromatina e proteínas nucleares	17
OBJETIVOS DO TRABALHO.....	26
MATERIAL	27

MÉTODOS28

1- Irradiação28

2- Obtenção dos preparados citológicos

2.1- Túbulos de Malpighi, musculatura e traquéias29

2.2- Testículos29

3- Coloração

3.1- Reação de Feulgen30

3.2- Banda C31

4- Cariometria.....32

RESULTADOS33

1- Curvas de sobrevivência33

2- Fenótipos nucleares

2.1- Túbulos de Malpighi, musculatura e traquéias39

2.2- Testículos45

3- Áreas nucleares53

DISCUSSAO72

CONCLUSAO82

RESUMO85

SUMMARY87

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS89

INTRODUÇÃO

1- Alguns fundamentos de radiobiologia

O extenso uso da energia atômica em vários ramos da economia nacional, tecnologia, biologia e medicina, tem tornado o estudo das injúrias causadas pela radiação um importante tema. Por essa razão físicos, químicos e biólogos estão trabalhando nessa área de pesquisa para obter um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nos danos causados pela radiação.

O termo radiação indica um fenômeno físico no qual a energia atravessa o espaço. As radiações permitem a propagação da energia à distância, podendo transportá-la sem suporte material, como ocorre com as radiações eletromagnéticas, que carregam energia na forma de fótons, (raios-X, raios gama, infravermelho, luz visível, ultra violeta, etc.), ou sob a forma de partículas elementares ou sub-atômicas (partículas alfa, beta, elétrons, etc.).

Quando a radiação interage com a matéria, cedendo-lhe parte de sua energia, pode acarretar a ejeção de elétrons (ionização) ou a promoção de átomos e moléculas para um estado ativado (excitação). Uma vez que as radiações infravermelho, luz visível e parte das ultra-violeta não possuem energia fotônica suficiente para arrancar elétrons dos elementos quantitativamente mais importantes da matéria viva (carbono, hidrogênio, oxigênio e nitro-

gênio), elas são consideradas como não ionizantes. A absorção das radiações ionizantes depende da natureza dos átomos que constituem as moléculas do material irradiado, enquanto a das não ionizantes depende da forma de ligação química desses átomos nas moléculas. A divisão das radiações em ionizantes e não ionizantes, embora simplificada, encontra grande aceitação e permite adequada sistematização.

A radiação é dita ionizante quando, na interação com os átomos e as moléculas do meio, arranca alguns elétrons de seus orbitais. Em consequência, surgem pares iônicos, cada um formado por um íon positivo (átomo que perdeu um elétron) e um íon negativo (elétron removido do átomo). Todas as partículas carregadas produzem ionização diretamente, quando possuem energia para tal. Já as partículas neutras e os fótons de raios X e gama, embora eles próprios não ionizem, produzem na interação com o meio, partículas capazes de ionizar. A ionização específica (SI) é o número de pares de íons produzidos por unidade de comprimento no caminho da radiação incidente (Okuno, 1988). Para alguns tipos de radiação (neutrons, raios gama, raios-X, etc.), é usual empregar-se uma grandeza que caracteriza o fenômeno, a transferência linear de energia (LET= linear energy transference), definida como a quantidade de energia perdida por unidade de comprimento da trajetória da radiação incidente, a qual frequentemente é expressa em KeV/um. A LET depende da massa, carga e velocidade das partículas, por isso varia conforme o tipo de radiação. As radiações com alta LET (partículas alfa, beta, prótons, etc.) produzem danos maiores do que aquelas com baixa LET (raios-X, raios gama, etc.) (Freire-Maia, 1972; Grosch & Hopwood, 1979; Prasad, 1984).

Várias unidades já foram utilizadas no estudo das radiações, porém uma unidade ainda empregada, mas que deve ser abandonada, para expressar a dose de radiação absorvida pela matéria é o rad (da expressão inglesa "radiation absorbed dose"), correspondente à quantidade de radiação que provoca a liberação, em 1g de matéria, de 100 ergs - o erg, o joule (J) e o elétron-volt (eV) são unidades de energia. A unidade que substitui o rad é o Gray (Gy), definido como a quantidade de radiação absorvida que provoca a liberação, em 1 kg de matéria, de uma energia igual a 1 joule. Logo, 1 Gy é igual a 100 rads (Gomes, 1988).

As radiações podem ser de fontes naturais, como raios cósmicos, radiação terrestre e radiação atmosférica, e de fontes artificiais, como os tubos de raios-X, os reatores nucleares e os isótopos radioativos artificiais (Freire-Maia, 1972).

A larga soma de dados, obtidos através da observação e da experimentação, que vem se acumulando a partir dos trabalhos pioneiros de Muller e de Stadler (Apud Freire-Maia, 1972), possibilita afirmar sem contestações, que as radiações ionizantes funcionam em todos os seres analisados, do vírus ao homem, como potentes fatores mutagênicos.

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes são comumente classificados em genéticos e somáticos. Os primeiros se subdividem em duas grandes classes: mutações ao nível gênico e mutações ao nível cromossômico. Essa classificação deve ser aceita apenas como tentativa de ordenação de fenômenos muito complexos e interligados.

A mutação gênica é um acontecimento intramolecular podendo ser constatada em vírus, bactérias, plantas e animais superiores, através de métodos genéticos e por métodos bioquímicos.

A mutação cromossômica, ao contrário, pode, em geral, ser vista ao microscópio e, portanto ser estudada com base em técnicas de ordem citológica.

Quando as células são irradiadas, danos são primariamente produzidos por ionização e radicais livres. Um radical livre é um átomo, ou uma molécula que possui um ou mais elétrons não emparelhados, o que lhe assegura enorme reatividade química. Os danos podem ser divididos em três categorias: (1) dano subletal, (2) dano potencialmente letal e (3) dano letal. A diferença entre eles é de ordem quantitativa (Prasad, 1984).

Foram desenvolvidos durante os estudos sobre radiação biológica alguns conhecimentos essenciais como tentativa para explicar o mecanismo dos efeitos das radiações. São eles:

A- Lei de Bergonié & Tribondeau

No início de 1906, estes cientistas franceses, trabalhando com ratos, propuseram uma nova hipótese sobre a radiosensibilidade das células. e que é a seguinte: (1) quanto menos diferenciadas são as células, mais radiosensíveis, quando comparadas com as altamente diferenciadas, (2) tecidos em proliferação são mais radiosensíveis que aqueles que não estão proliferando. São exceção a esta lei os linfócitos (T e B), que são mais radio-

sensíveis, apesar de serem diferenciados e não estarem se dividindo (Freire-Maia, 1972; Grosch & Hopwood, 1979; Suciu, 1981, 1982; Prasad, 1984).

B-Efeitos diretos e indiretos das radiações

Os efeitos biológicos das radiações são consequências de eventos primários produzidos em uma ou mais espécies de macromoléculas, principalmente no DNA. A lesão pode surgir como consequência da interação da radiação com a macromolécula, o que caracteriza o **efeito direto**. Em outras situações, a radiação transfere sua energia para uma molécula intermediária (a da água, por exemplo), cuja radiólise acarreta a formação de produtos altamente reativos, os radicais livres, que lesam a molécula, por **efeito indireto**. Assim, o efeito global de um feixe de radiação em um organismo é a soma dos efeitos diretos e indiretos, cujas importâncias relativas variam em função de diversos fatores, tais como temperatura, teor em água, etc. (Lea, 1962; Prasad, 1984).

C- Relação entre volume de cromossomos e radiosensibilidade

Com base na teoria do alvo, Sparrow (1965) propôs uma hipótese para explicar algumas discrepâncias de radiosensibilidade para as várias espécies. Segundo essa hipótese, a radiosensibilidade das células é diretamente proporcional ao volume de cromossomos em interfase. Os dados obtidos para algumas espécies de plantas são consistentes com a hipótese de Sparrow. Contudo, a validade dessa hipótese para outras espécies necessita ainda comprovação.

D- Efeito do oxigênio

Tecidos oxigenados são mais sensíveis à radiação do que aqueles em condições de hipóxia.

O efeito do oxigênio desempenha um importante papel na radioterapia de tumores. Em tecido normais, a distância média entre capilares não ultrapassa $20\mu\text{m}^3$, ordem de grandeza do diâmetro celular e, desta forma, todas as células encontram-se adequadamente oxigenadas. Em massa tumorais, entretanto, a rápida proliferação celular pode fazer com que esta distância aumente substancialmente, chegando a ultrapassar $200\mu\text{m}^3$, de tal forma que uma parte das células fica em hipóxia, enquanto outras em anóxia, inativando as células e conduzindo-as à necrose. Quando uma determinada dose de radiação é aplicada à massa tumoral, ela inativa, preferencialmente, as células oxigenadas, produzindo efeitos reduzidos nas células em hipóxia, uma vez que estas são mais radioresistentes. A inativação das primeiras facilita a difusão do oxigênio (pois ele deixa de ser consumido nas proximidades do capilar) e, assim, as células em hipóxia sofrem reoxigenação. Com a aplicação de uma segunda dose de radiação, observa-se a repetição do ciclo, mas agora o número de células em hipóxia é reduzido, o que constitui uma das justificativas para o fracionamento de doses em radioterapia (Grosch & Hopwood, 1979).

A variação da pressão parcial do oxigênio nos tecidos também tem sido utilizada buscando aumentar a eficiência dos processos radioterápicos. Para tal, várias técnicas costumam ser empregadas, tais como injeção de vasodilatadores, o aumento da porcentagem de oxigênio no ar inspirado ou o emprego de câmaras hiperbáricas, técnicas estas que, em alguns casos, podem ser úteis na prática médica (Prasad, 1984).

2- Radiosensibilidade

Os insetos têm se constituído em modelo favorável para os estudos de radiação. Packard (1935) usou ovos de moscas de frutas (*Drosophila melanogaster*) para estudar os efeitos somáticos da radiação. A grande quantidade de ovos que esses insetos põem durante todo o ano e a ocorrência de mitoses simultâneas constituem algumas das vantagens de se estudar os efeitos das radiações nesses organismos.

É amplamente conhecido que os insetos são pouco sensíveis à radiação quando comparados aos vertebrados. O Esquema 1 demonstra as doses de radiação necessárias para matar insetos e outros organismos. Os insetos adultos são pelo menos 100 vezes menos sensíveis ao efeito letal da radiação que os vertebrados. Esse efeito é explicado pela (1) lei de Bergonié & Tribondeau e por (2) uma especial característica dos insetos, ou seja, muito pouca divisão celular ocorre durante a fase larval. Divisão celular e diferenciação dos tecidos ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, de maneira que, na vida larval, o crescimento ocorre pelo aumento do volume celular sem aumento do número de células. Há outra pequena entrada em atividade mitótica pouco antes da muda nos insetos com metamorfose completa.

<u>INSETOS</u>	<u>DOSE</u> (r)	<u>ORGANISMOS UNICELULARES</u>
Bracon	10 ⁵	Paramoecium
Abelhas	"	
Tribolium	"	Amoeba
Drosophila	"	B. mesentericus
	10 ⁴	
	"	Levedura
	"	
Barata	"	
	10 ³	E. coli
	"	
	"	
	"	<u>VERTEBRADOS</u>
	"	Macaco, sapo, galinha, etc.
	10 ²	homem
	"	cachorro, cabra, etc.
	"	

Esquema 1. LD₅₀ de vertebrados adultos, insetos e organismos unicelulares (r= roetgens, escala em log). Dados de O'Brien & Wolfe (1964).

Erdman (1961) observou que as células dos insetos que estão se dividindo são tão sensíveis quanto aquelas células em divisão dos vertebrados, mas a qualidade peculiar estática das células dos insetos adultos os torna insensíveis à radiação. No entanto, as células das gônadas são muito sensíveis à radiação, e com doses bastante baixas os insetos podem ser esterilizados ou terem seus gametas geneticamente desarranjados.

Desde que os insetos adultos devem a sua radioresistência à pouca divisão celular, seria de se esperar que nas formas juvenis a sensibilidade fosse maior. Isto foi comprovado através dos experimentos a seguir relatados. Henshaw & Henshaw (1933) examinaram a variação da idade de ovos de *Drosophila* com a sensibilidade aos raios-X. A sensibilidade é notadamente alterada em poucas horas; a LD₅₀ aumenta de 304r em uma hora para 1170r em três horas. A sensibilidade máxima ocorreu na fase de clivagem (divisões celulares que ocorrem logo após a fertilização do ovo) e blástula. Na gástrula a sensibilidade foi reduzida. Colombo (1959) mostrou que em ovos de *Locusta migratoria*, a LD₅₀ era de 136r para ovos de um dia, porém era de 6900r para ovos com seis dias. O índice mitótico para ovos de um dia era levemente maior do que para ovos de seis dias. Em ambos os casos, a variação na sensibilidade foi correlacionada com a atividade mitótica.

Quando os insetos passam de um instar para outro, através de múltiplos processos, há um breve período de atividade mitótica. Se o inseto é irradiado antes da muda, as alterações não podem ser vistas até que a muda ocorra. Esse efeito tem sido chamado de "danos por radiação latente" por Baldwin & Salthouse

(1959a), os quais examinaram esse efeito nos hemípteros hematófagos como o *Rhodnius prolixus*. Este inseto sofre muda após uma ingestão de sangue; a sequência de eventos é a seguinte: (1) a refeição de sangue conduz à distensão de seu abdômen, (2) um estímulo em cadeia irá atingir o cérebro, via sistema nervoso, (3) o cérebro produz o hormônio que ativa a glândula torácica, (4) a glândula torácica secreta o hormônio de muda e (5) a muda ocorre.

O primeiro aspecto observável de que a muda irá ocorrer, é a divisão celular da epiderme, que se inicia mais ou menos cinco dias após a refeição de sangue. Quando a muda ocorre em *Rhodnius* irradiado, na nova cutícula aparece uma "área queimada".

O primeiro estudo com *Rhodnius*, envolvendo 5.000r de raios-X demonstrou que mesmo após um período latente de dois meses a "área queimada" aparecia na nova cutícula (Baldwin & Salthouse, 1959a).

Baldwin (1961) irradiando *Rhodnius* antes da alimentação, observou que ocorria aumento do tamanho celular imediatamente após a refeição de sangue e que as oxidases não eram totalmente afetadas. No 5º dia após a alimentação de sangue, começavam as mitoses e nestas eram bem sucedidas prófase e metáfase, quando então ocorria um bloqueio da divisão, e as células irradiadas eram destruídas e exibiam grandes blocos de agregados cromatínicos.

Gómes-Nunez e colaboradores (1964) tentaram a erradicação de *Rhodnius prolixus*, vetor principal da doença de Chagas na Venezuela, por meio da introdução de machos estéreis na população, porém os resultados obtidos não foram favoráveis aos seus objetivos. A fertilidade foi reduzida de 74.4% com dose de

2.500r para 0.3% com dose de 20.000r com radiação gama. Os insetos expostos a 40.000r eram totalmente estéreis, porém inibidos de copular. Com isto, conseguiram introduzir na população apenas machos parcialmente estéreis.

Carcavallo e colaboradores (1971), usando ovos de *Triatoma infestans* e submetendo-os aos raios-X, demonstraram que as alterações no desenvolvimento eram mais profundas quanto maior era a dose e quanto mais jovens os embriões, sendo 100% letais aos embriões com dose de 10.000r (100 Gray). Com dose de 5.000r (50Gy) se observavam fenômenos mutagênicos, com aparição de anomalias nas extremidades e nos tergitos das ninfas de 1º instar e com dose de 2.000r (20Gy) provocavam consequências similares às demais doses, porém atenuadas. Com esta dose havia retardo metabólico que provocava a morte por incapacidade do inseto em se alimentar. Os estudos citológicos demonstraram haver alterações nucleares profundas como picrose, cariólise e vacuolizações protoplasmáticas. As doses experimentadas demonstraram a sensibilidade embrionária à radiação, porém não foram úteis para nenhum tipo de controle desses vetores.

Foi demonstrado também que a radiosensibilidade dos insetos varia em função (1) do ciclo celular, (2) da composição de bases nitrogenadas do DNA, (3) das interações do DNA com as proteínas nucleares e (4) da ploidia.

Para alguns autores como Conger & Johnston (1956), Natarajan (1963) e Sparrow (1965), que trabalharam com vegetais, há concordância que os poliplóides são mais radioresistentes que os diplóides. Contudo, as injúrias reportadas por Clark & Mitchell

(1952), com *Habrobracon*, mostram que quando se compara a radiosensibilidade dos haplóides e diplóides, o estágio de desenvolvimento em que eles se encontram é muito importante na determinação da mesma. Quando os embriões de *Habrobracon* foram irradiados durante a fase de clivagem, os haplóides foram mais radio-resistentes que os diplóides; quando irradiados após a clivagem (estágio de blástula), os haplóides e diplóides eram igualmente sensíveis. Sugeriram com esses dados que a radiosensibilidade não pode ser correlacionada com o número de genomas em todos os estágios do seu ciclo de vida, que outros fatores deveriam ser considerados, como o fato de que na fase de clivagem há o sincício, com núcleos se dividindo rápida e sincronicamente, porém há pouca diferenciação nessa fase. Outro fato é que os diplóides eram duas vezes mais atingidos pelos raios-X que os haplóides, tendo como consequência mais perdas e quebras cromossômicas que os haplóides.

Em 1961, Clark & Rubin trabalhando com *Habrobracon* haplóides e diplóides e, usando como critérios de determinação de radiosensibilidade para adultos a expectativa de vida ("life span"), e para larvas e pupas a capacidade de desenvolvimento até o estágio adulto e depois a expectativa de vida, mostraram que em grupos não irradiados a expectativa de vida de machos haplóides e diplóides alimentados com mel e água era a mesma, 62 dias. As fêmeas alimentadas com a mesma dieta dos machos tinham uma expectativa de vida de 92 dias, enquanto as alimentadas com a larva *Ephestia*, que é sua alimentação usual, era de apenas 40 dias. Quando irradiaram com doses crescentes de raios-X, a expectativa

de vida dos machos haplóides caiu mais acentuadamente que a dos diplóides. O mesmo aconteceu com as pupas e larvas irradiadas. As fêmeas alimentadas com mel e água tiveram decréscimo na expectativa de vida similar aos machos diplóides. No caso das fêmeas alimentadas com larvas de *Ephestia* o decréscimo foi mais acentuado. Isto sugeriu que a sensibilidade à radiação foi modificada mais pela ploidia do que pelo sexo. Os autores discutem que essas mudanças na sensibilidade diferencial entre haplóides e diplóides com o estágio de desenvolvimento indicam que os fatores de modificação da sensibilidade não tiveram a mesma importância em todos os estágios do desenvolvimento.

Radford & Hodgson (1987) demonstraram que as células V79 (cultura de células de hamster) hexaplóides são mais radiosensíveis quando comparadas com as diplóides e tetraplóides, sendo essas diferenças devidas a alterações na capacidade de reparo do DNA ou alterações nos tipos de danos cromossômicos produzindo morte celular. Esses autores observaram que as quebras da dupla fita de DNA nas linhagens hexaplóides eram aumentadas, porém não apresentaram explicação para este fato.

Suci (1985, 1986) demonstrou que as dimensões nucleares em células de mamíferos parecem ser um fator determinante da organização cromatínica e radiosensibilidade celular. Células interfásicas radioresistentes (fígado, rim, cérebro e coração) têm um volume nuclear de 75 a $2.700\mu\text{m}^3$, e permitem (1) a organização topológica da cromatina em núcleos interfásicos, (2) replicação e transcrição do DNA, (3) recuperação dos danos causados pela radiação ao nível celular e (4) um aumento da radioresistência das

células em interfase. Em contraste, os linfócitos radiosensíveis com volume nuclear de 20 a $65\mu\text{m}^3$, compreendem (1) uma área nuclear insuficiente para organização topológica completa do DNA, (2) um volume nuclear insuficiente para o desdobramento da cromatina condensada, (3) inabilidade para realizar a replicação e transcrição do DNA, (4) incapacidade de recuperar os danos causados pela radiação ao nível celular, (5) um aumento da tendência de agregação cromatínica, conduzindo à picnose nuclear e (6) alta sensibilidade à radiação.

3- Efeitos das radiações sobre a cromatina e proteínas nucleares

A cromatina dos eucariotos está organizada em unidades repetidas, nucleossomos, os quais consistem de 140 pares de bases de DNA associados a um octâmero de histonas (2H2A, 2H2B, 2H3 e 2H4), uma histona H1 e aproximadamente 60 pares de bases de DNA espaçador (Kornberg, 1974, 1977).

Recentes investigações de Chui e colaboradores (1982a, b, c) indicam que a organização do nucleossomo na cromatina de eucariotos tem uma importante função na sensibilidade bem como no reparo de danos ao DNA causados pela radiação. Contudo, a influência precisa da estrutura cromatínica no reparo de danos causados ao DNA é ainda pouco conhecida. Segundo Smerdon & Lieberman (1978) e Bodell & Cleaver (1981), a cromatina pode sofrer algumas alterações conformacionais durante o reparo de danos ao DNA induzidos por radiação UV.

A cromatina transcricionalmente ativa mantém uma estrutura periódica (nucleossomos) e sua conformação parece ser diferente daquela da cromatina transcricionalmente inativa, como indica a alta sensibilidade da cromatina ativa à degradação pela DNase I (Garel & Axel, 1986; Mathis & Gorovsky, 1976; Weintraub & Groudine 1976).

Mee e colaboradores (1978) isolaram cromatina de fibroblastos de camundongos e examinaram a produção de quebras em um dos fios da dupla hélice do DNA (SSB= single strand break) quando

submetidos à radiação gama. Os resultados indicaram haver uma diferença considerável na eficiência de formação de SSB de DNA isolado de cromatina irradiada quando comparados à cromatina de células irradiadas. Os valores médios de quebras foram de 6eV para cromatina isolada contra 80eV de quebras em cromatina de células irradiadas. Isso sugere a grande contribuição da ação indireta da radiação nos radicais livres da cromatina isolada. As quebras parecem ocorrer nas regiões de DNA que ligam os nucleossomos, visto que são regiões mais susceptíveis à digestão por nucleases (Kornberg, 1977).

Chiu & Oleinik (1982a) compararam a sensibilidade do DNA nos estados transcricionalmente ativos e inativos com respeito à indução de quebras no DNA monocatenário pela radiação gama, em *Tetrahymena piriformes*. Os resultados desse trabalho demonstraram que a organização da cromatina é importante na determinação da sensibilidade do DNA à radiação, não somente com respeito à produção, mas também com relação à taxa de reparo a quebras no DNA monocatenário (SSB), que foram maiores nos genes transcricionalmente ativos. No entanto, o significado dessa sensibilidade diferencial não foi esclarecido.

Chiu & Oleinik (1982b) também investigaram a organização estrutural e a sensibilidade à radiação da cromatina de *Tetrahymena* sob algumas condições de atividade transcricional modificadas, usando nucleases específicas, nuclease microcócica e DNase I. Usando uma dose subletal de radiação gama, não houve reorganização da massa nuclear ou DNA ribossomal detectável nem por nuclease microcócica ou DNase I, mesmo quando a dose empregada

da (40krad) causou danos consideráveis e quebras ao DNA. Contudo, as regiões de cromatina transcricionalmente ativas são mais susceptíveis a quebras no fio único de DNA do que a cromatina não ativa. A estrutura da cromatina pode influenciar a sensibilidade à radiação e ao reparo do DNA, porém rearranjos locais dos nucleossomos ao longo do DNA podem alterar a conformação global da cromatina após irradiação, pois aparecendo uma nova região resistente à nuclease essa pode ser compensada pelo aparecimento concomitante de uma região sensível à nuclease. Portanto, a conclusão foi de que os danos ao DNA e à cromatina não produzem alterações ao nível dos nucleossomos da cromatina.

Chui e colaboradores (1982c) examinaram a distribuição dos fragmentos únicos de DNA total marcado com timidina H^3 e de DNA com sequências complementares a sondas ("probe") específicas para células L929 de ratos controle e submetidos à radiação gama. Aquelas sequências de DNA que hibridizam ao rDNA ou RNA (poli A+), têm peso molecular menor e comportam 5 a 6 vezes o número de quebras no fio único tanto de sequências do DNA satélite como de DNA de banda principal. Concluíram que as sequências de DNA transcricionalmente ativos são mais susceptíveis aos danos causados pela radiação ionizante do que as sequências inativas (a cromatina transcricionalmente ativa tem uma conformação mais relaxada, promovendo acesso preferencial de moléculas), e sugerem que essa sensibilidade diferencial seja uma provável consequência de diferenças na organização da cromatina. O conteúdo de proteínas parece ter uma função protetora importante na susceptibilidade dos danos às timinas do DNA, induzidos pela radiação. A adição de

histonas e outras proteínas ao DNA recentemente replicado reduz essa sensibilidade. A taxa de produção de danos à timina de DNA deproteínado em relação ao DNA proteínado está entre 5- 6, taxa que é similar àquela observada para SSB. Então, condições que permitem a perda ou rearranjo de proteínas da cromatina, resultando em conformação alterada e mais relaxada, tornam o DNA mais sensível à radiação ionizante.

A destruição da cromatina nuclear induzida pela radiação

foi tida como resultado de quebras internucleossômicas e subsequente acumulação desses fragmentos, os polideoxinucleotídeos (PDN) (Hanson, 1979). Por isso, Zhivotovsky e colaboradores (1981) se interessaram em investigar se os fragmentos de DNA eram formados ao acaso ou se a degradação cromatínica era um processo regular. Partindo do conceito de que a cromatina tem uma estrutura típica, nucleossomos, os resultados indicaram que a degradação cromatínica pós-radiação ocorre exatamente no espaços internucleossômicos, com formação de nucleossomos monoméricos e seus oligômeros. As quebras cromatínicas são causadas por nucleases que se tornam ativas nas células expostas à radiação. Contudo, a natureza e a sequência das reações envolvidas ainda não são elucidadas.

Tem sido proposto que a picnose nuclear pode ser correlacionada morfológicamente com a fragmentação dos polinucleotídeos (PDN) (Swingle & Cole, 1968). A relação quantitativa entre picnose nuclear e quantidade de PDN extraível de diferentes frações de timócitos de ratos submetidos a raios-X em gradiente de Percoll, foram investigados por Borisova e colaboradores (1987).

O fracionamento das células em gradiente de Percoll foi realizado para separar as células intactas das mortas. O grau de fragmentação da cromatina induzida pela radiação, avaliados por eletroforese, foi similar em todas as frações de células testadas. Seguindo-se a irradiação, 87.9% dos timócitos eram picnóticos e quase destituídos de células que formam rosetas (ARFC autorosetting-forming cells). A relação direta entre o conteúdo de PDN e a picnose nuclear foi notada em todo o gradiente. A perda da habilidade de formação de rosetas (ARFC) foi diretamente relacionada a outros índices de morte celular; a radiação induz a perda dos receptores específicos das ARFC que ocorre antes da picnose nuclear (Zerbin & Chukhlovin, 1984). Contudo, a conclusão foi de que as ARFC são importantes fontes de células picnóticas e que a origem dos PDN provém de núcleos picnóticos.

É evidente que os distúrbios induzidos pela radiação na interação entre o DNA e as proteínas não histônicas (NHP) causam uma série de alterações na estrutura e funções da cromatina. Umansky & Domanshenko (1977) induziram uma série de distúrbios nos complexos de DNA com NHP e com proteínas nucleares (NSP- nuclear sap protein), de timo de rato submetido à radiação gama. O DNA irradiado liga-se a uma quantidade ligeiramente maior dessas proteínas e está mais firmemente ligado do que o DNA nativo. O efeito é causado pelo aparecimento local de um sítio denaturado no DNA irradiado, e as ligações das proteínas NHP e NSP a este DNA contribui para estabilizar estes sítios. Os distúrbios sobre as proteínas não-histônicas, causadas pela radiação, e suas interações com o DNA são mais facilitadas do que as ligações não específicas.

A formação de ligações cruzadas entre DNA e proteínas em cromatina isolada e irradiada e em cromatina de células de camundongos irradiados foi demonstrada por Mee & Adelstein (1979). O radical mais eficiente na produção de ligações cruzadas em cromatina irradiada foi o radical hidroxil. Já os radicais superóxidos foram inefetivos. A maior quantidade de ligações cruzadas encontradas na cromatina de células irradiadas foi encontrada quando as células eram irradiadas sob atmosfera com óxido de nitrogênio, sugerindo que o radical hidroxil pode estar envolvido na formação de ligações cruzadas em células intactas. A eficiência de formação de ligações cruzadas em cromatina de células irradiadas foi considerada menor do que a de cromatina isolada e irradiada. A existência de processos de reparo para as ligações cruzadas é questionável.

Evidências apresentadas por Suciu & Bojan (1981) indicam que a cromatina tanto de células radiosensíveis como das radioreistentes contém uma protease alcalina ativa, com especificidade relativamente alta a histonas. E sugerem que a degradação de cromatina à PDN que ocorre em tecidos linfocitários é produzida por ação de uma endonuclease alcalina em associação com essa protease. Quando se inibiu a ação da protease com PMSF (fluoreto de fenimetilsulfonila) e especialmente NaHSO₃, houve (1) depressão da atividade da endonuclease alcalina, (2) autodigestão da cromatina à PDN e (3) liberação da cromatina solúvel. Os resultados sugerem que a liberação de histonas não pode ser considerada como uma etapa determinante na fragmentação da cromatina à PDN em linfócitos irradiados.

Suciu (1981, 1982) mostrou que as células, núcleos e cromatina de fígado, rim, pulmão e coração, contêm maior quantidade de proteínas não-histônicas que as células do timo e baço. Sugeriu que a grande radiosensibilidade das células linfocitárias de 1 a 6 horas após irradiação (0.5- 4Gy) está estritamente relacionada ao déficit de proteínas não-histônicas, ocasionando degradação de sua estrutura nuclear e fragmentação cromatínica. Essa hipótese está baseada nos seguintes conceitos: (1) alta compactação dos nucleossomos nos cromossomos ou cromatina; (2) a organização e estabilização das estruturas nucleares da cromatina; (3) partículas ribonucleoprotéicas; (4) grânulos pericromatínicos são controlados pelas NHP, (5) o efeito indireto da radiação sobre o DNA pode ser limitado pela presença de grande quantidade de proteínas que podem operar como radicais "scavengers".

Chui e colaboradores (1986) irradiaram células em cultura de hamster e observaram que havia um baixo nível (menor que 5%) de DNA firmemente ligado a proteínas, sendo que esse DNA possuía sequências que hibridizavam com RNA poli (A+) ou RNA ribossomal. Com dose de radiação de 60Gy, o DNA com sequências transcricionalmente ativas apresentava mais ligação cruzada que o DNA total. O DNA que permanece ligado a proteínas nesse período torna-se reduzido em sequências ativas. Isso é acompanhado por uma aparente restauração do complexo de proteínas enriquecidas com genes ativos nas células irradiadas. Esses dados são consistentes com as propriedades da matriz nuclear (o termo matriz nuclear engloba tanto as proteínas internas do núcleo como as da lâmina nuclear) e sugerem que a estrutura da cromatina exerça importante

função na formação e reparo de lesões ao DNA induzidas pela radiação gama.

Considerando-se que, conforme relato da literatura, alterações cromatínicas ao nível de quebras internucleossômicas (Hanson, 1979; Zhivotovsky e colaboradores, 1981; Zerbin & Chukhlovin, 1984; Borisova e colaboradores, 1987), de atividades de transcrição (Chiu & Oleinik, 1982a, b) e de interações protéicas (Umansky & Domashenko, 1977; Mee & Adelstein, 1979; Suciu, 1981, 1982; Chiu e colaboradores, 1986), podem ser induzidas pela radiação, é de se esperar que estas se expressem também na compactação cromatínica e em sua distribuição nos núcleos. Isto geraria fenótipos nucleares alterados, seja devido a modificações na própria fisiologia cromatínica e/ou refletindo etapas de um processo de necrose celular. Para tal as células de *Triatoma infestans* seriam um bom modelo, por apresentarem fenótipos nucleares já descritos, nos quais a heterocromatina acha-se bem caracterizada (Mello, 1971, 1978a,b, 1983, 1985; Azeredo-Oliveira & Mello, 1986; Mello & Recco-Pimentel, 1987; Amaral, 1988; Mello, 1988).

Além disso ocorrem nesse inseto variáveis graus de poliploidia conforme o órgão que se considere, o que possibilitaria também uma comparação dos efeitos da radiação a este nível. Nos túbulos de Malpighi em particular são encontradas células binucleadas altamente poliplóides, cuja heterocromatina constituindo cromocentros chega a representar de 5 a 11% da área nuclear em ninfas de 5º estadio (Mello, 1978a).

Por outro lado, diversos fenótipos nucleares já foram descritos na linhagem germinativa desse inseto (Schrader, 1950; Barth, 1956; Schreiber e colaboradores, 1968, 1972; Mello, 1978). Os trofócitos presentes no testículo também se caracterizam pela presença de núcleos altamente poliplóides (Randi & Mello, 1985). Já na musculatura e traquéias de *Triatoma infestans* são encontrados núcleos com baixo nível de ploidia apresentando um pequeno corpo heterocromático (Simoni & Mello, 1986).

OBJETIVOS DO TRABALHO

No presente trabalho foram, portanto, investigadas alterações induzidas por radiação gama nos fenótipos nucleares de *Triatoma infestans* definidos em termos de padrões de condensação cromatínica e de áreas nucleares de heterocromatina, bem como em células com diferentes níveis de poliploidização.

Buscou-se também nesta investigação encontrar alterações de fenótipos nucleares em condições de radiação que promovessem morte dos insetos a curto e a longo prazo.

MATERIAL

Foram utilizadas ninfas machos de 5º estadio de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) criadas e fornecidas pelo laboratório da SUCEN de Mogi-Guaçu (SP), num total de 320 espécimes. Os insetos usados haviam sido recém-alimentados com sangue de galo. Adultos provenientes de muda induzida por ação da radiação também foram analisados.

Os órgãos utilizados para a análise citológica foram túbulos de Malpighi, testículos, fibras musculares e traquéias, os quais foram analisados em fotomicroscópio Zeiss.

MÉTODOS

A_ IRRADIAÇÃO

Esta etapa experimental foi desenvolvida na Seção de Entomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) de Piracicaba (SP). Como fonte de radiação utilizou-se um irradiador de Cobalto-60 do tipo Gammabeam-650 da "Atomic Energy of Canada Ltd", com uma atividade de aproximada de 21×10^{15} Bq (~ 5.670 Ci). O equipamento contém doze fontes, cada uma com três pastilhas de Cobalto-60. A quantidade de fontes utilizada variou conforme a condição experimental.

Preliminarmente foram estabelecidas duas situações para os aumentos de doses de radiação: uma em progressão aritmética e outra em progressão geométrica, totalizando catorze experimentos que envolveram 150 espécimes. Esses experimentos serviram de base para a escolha de doze condições de radiação a partir das quais se estabeleceram as curvas de sobrevivência dos insetos apresentadas nos resultados, e que envolveram 130 espécimes. Finalmente pôde-se escolher, a partir das últimas, as condições de radiação utilizadas para a análise citológica dos insetos, tendo sido usados 40 espécimes nesta etapa.

B- Obtenção dos Preparados Citológicos

B.1- Túbulos de Malpighi, musculatura e traquéias

Os insetos foram eterizados por aproximadamente 2 minutos e com auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss se procedeu à dissecação dos mesmos, expondo ventralmente seus órgãos internos. Com uma pinça fina retiravam-se os túbulos de Malpighi, os quais foram estendidos em lâminas histológicas. Junto a estes eram também transferidos para as lâminas células musculares e traquéias do inseto. A fixação foi realizada em etanol-ácido acético (3:1) por 1 minuto. A seguir os preparados eram lavados em etanol a 70% por 1 minuto, deixados secar ao ar à temperatura ambiente e submetidos aos métodos de coloração.

B.2- Testículos

Imediatamente após sua remoção, os testículos foram esmagados entre lâmina e lamínula numa gota de etanol-ácido acético (3:1), por aproximadamente 2 minutos. A remoção da lamínula foi efetuada por congelamento do material em nitrogênio líquido. Em seguida os preparados eram deixados secar ao ar à temperatura ambiente e reservados para a coloração.

C- Coloração

C.1- Reação de Feulgen

Os preparados foram hidrolisados em HCl 4N por 1 hora e 5 minutos à temperatura ambiente de 25°C e em seguida lavados várias vezes em água destilada (Mello & Vidal, 1980).

O tratamento com reativo de Schiff foi efetuado à temperatura ambiente por 40 minutos, seguindo-se 3 banhos em água sulfurosa (metabissulfito de sódio: HCl 1N : água destilada, 1:1:18, recém-preparada) de 5 minutos cada. A seguir os preparados foram lavados várias vezes em água destilada, posteriormente desidratados em série etanólica a partir de etanol 70%. Em cada passagem o tempo foi de 3 minutos.

A diafanização foi realizada em etanol absoluto-xilol (1:1) e em xilol puro, 15 minutos cada banho. Os preparados foram montados em bálsamo do Canadá.

C.2- Banda C

Os preparados foram submetidos ao método de banda C, de Sumner (1972). Procedeu-se inicialmente uma lavagem rápida em água destilada. Em seguida, efetuou-se denaturação em uma solução à 5% de hidróxido de bário octahidratado, seguindo-se de lavagem em água destilada.

Os preparados foram a seguir incubados em banho-Maria à temperatura de 60°C por 4 horas e 30 minutos em uma solução de 2xSSC (cloreto de sódio a 0.3M e citrato trissódico a 0.03M, pH 7.0). Após a incubação os preparados foram lavados brevemente em água destilada.

A coloração foi efetuada com solução de Giemsa a pH 6.8- 7.0 (Schnedl, 1971) por 20 minutos. As lâminas foram a seguir lavadas rapidamente em água destilada e secadas ao ar à temperatura ambiente. A diafanização foi realizada em xilol por 15 minutos e a montagem em bálsamo do Canadá.

D- Cariometria

Os núcleos dos túbulos de Malpighi, musculatura e traquéias tiveram sua imagem obtida a partir de negativos fotográficos, projetada com auxílio de um ampliador fotográfico (em aumentos de 1100x e 688x) sobre papel milimetrado. Seus contornos bem como o de um padrão de área foram então desenhados. As áreas nucleares foram a seguir determinadas com base na área projetada (Mello & Vidal, 1980).

Quando possível, determinou-se em separado a área da heterocromatina e da eucromatina.

RESULTADOS

1- Curvas de sobrevivência

Nas Figuras 1 e 2 acham-se esquematizadas as curvas de sobrevivência para as várias condições experimentais. Com base nessas Figuras foi construída uma tabela em que se constata a variação em tempo para o qual se obtém 50% e 0% de sobrevivência dos insetos conforme a condição experimental (Tabela 1).

A partir desses dados (Figura 1 e 2, Tabela 1) pode-se concluir que foram provocadas mortes mais abruptamente quando a dose de radiação foi de 1200Gy (1220Gy/60min), onde 70% dos insetos morreram após 7 dias e 100% após 9 dias. Foi a única condição em que, dentro do intervalo de 24 dias, se constatou 0% de sobrevivência.

Os insetos controle apresentaram 50% de sobrevivência com 16 dias. O decaimento dessa curva pode ter como uma das causas uma ligeira queda de temperatura ou manuseio (Ferraz-Filho, A. Informação pessoal, 1988) que houve no período em que estava sendo realizado o experimento, visto que esses insetos requerem um ótimo de temperatura em torno de 30° a 35°C (Sherlock, 1979).

Dos insetos que receberam dose de radiação de 50Gy (460 Gy/7min) (Figura 1, curva E), 30% morreram 2 dias após irradiação e 50% após 7 dias. Foi a condição, além daquela de 1200Gy (1220 Gy/60min) que no intervalo de 24 dias causou 50% de mortes no menor tempo.

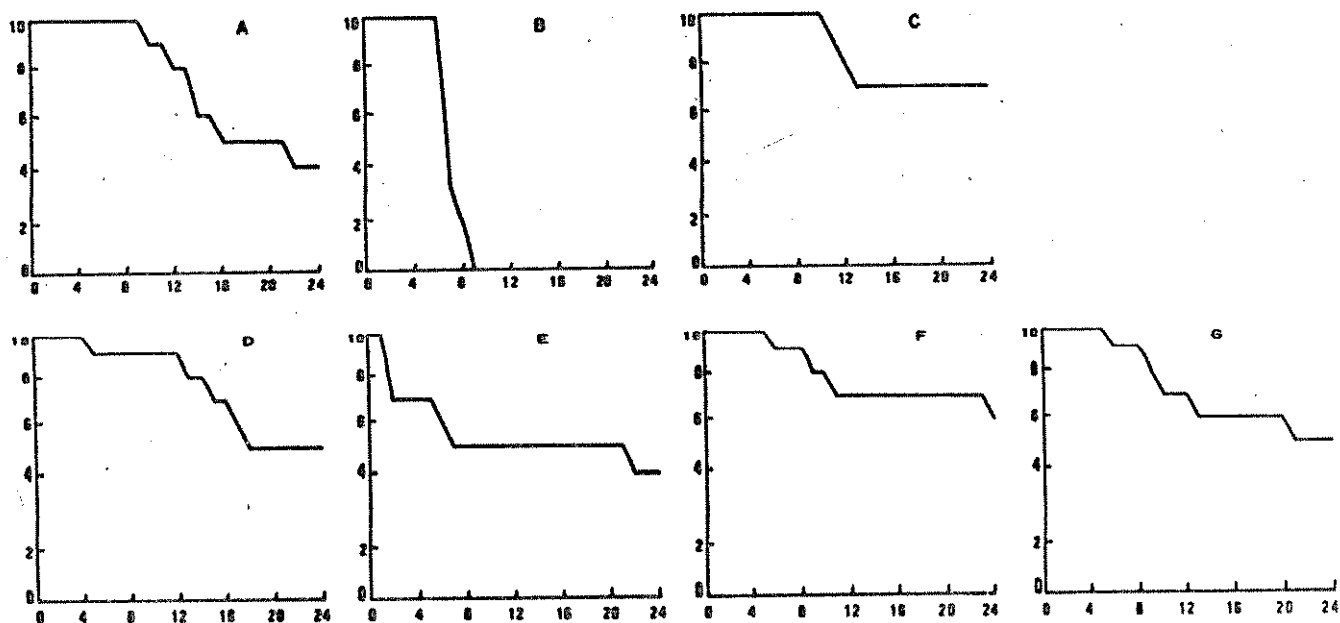


Figura 1. Curvas de sobrevivência de ninfas machos de 5º estadio de *Tristoma infestans*, sob efeito de radiação gama com as seguintes doses (taxas de doses): A- Controle; B- 1200 (1220/60); C- 31 (370/60); D- 42 (460/7); E- 50 (460/7); F- 100 (870/7); G- 200 (1670/7) Gy (Gy/min).

Ordenada. número de insetos.

Abscissa. dias pós-irradiação.

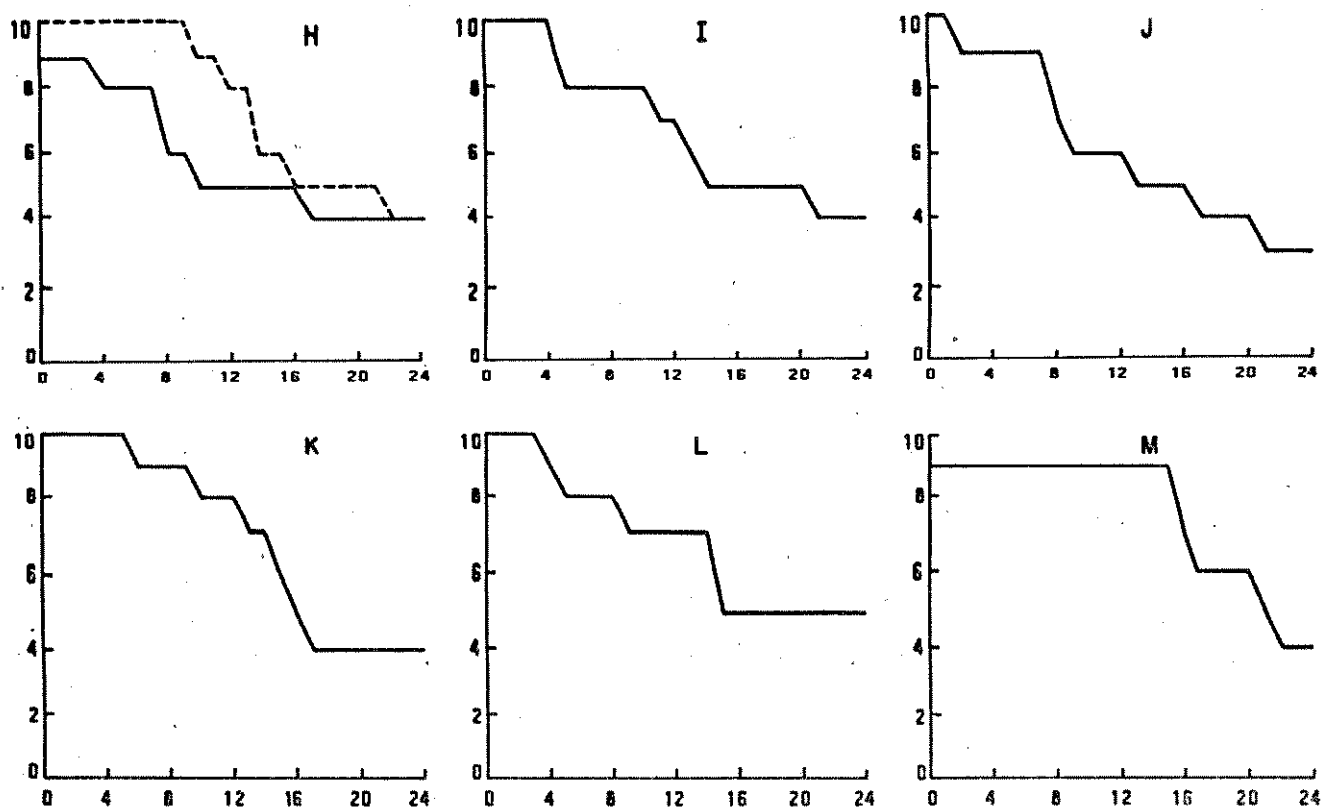


Figura 2. Curvas de sobrevivência de ninfas machos de 5º estadio de *Triatoma infestans*, sob efeito de uma mesma dose da radiação gama (150Cy) com as seguintes taxas de doses: H- 8650/1; I- 1770/5; J- 1340/7; K- 1010/9; L- 660/15; M-460/20 Cy/min.

----- Controle.

Ordenada: número de insetos.

Abcissa: dias pós radiação.

Tabela 1- Efeitos das diferentes condições de radiação gama em ninfas machos de 5º estadio de *Triatoma infestans*, em relação ao seu tempo de sobrevivência considerando-se um período de 24 dias.

Condições experimentais			Sobrevivência	
Dose	Taxa de dose		50%	0%
(Gray)	(Gray/min)	(Gray/1min)	(tempo em dias)	
A- Controle	-	-	16	>24
B- 1200	1220/60	20.3	7	9
C- 31	370/60	6.2	>24	>24
D- 42	460/7	67.1	18	>24
E- 50	460/7	67.1	7	>24
F- 100	870/7	124.3	>24	>24
G- 200	1670/7	238.6	21	>24
H- 150	8650/1	8650	10	>24
I- 150	1770/5	354	14	>24
J- 150	1340/7	191	13	>24
K- 150	1010/9	112	16	>24
L- 150	660/15	44	15	>24
M- 150	460/20	23	22	>24

Os insetos submetidos à dose de radiação de 31Gy (370 Gy/60min) (Figura 1, curva C), sobreviveram em sua totalidade até 10 dias após a irradiação, e apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência até 24 dias, ou seja 70%.

A condição de 150Gy (460/20min) (Figura 2, curva M), foi a que ocasionou o maior intervalo de tempo, 15 dias, entre o dia da irradiação e a primeira morte no grupo, havendo até o décimo sétimo dia 33% de mortes e até o vigésimo segundo dia 56% de mortes.

A condição de 150Gy (1340Gy/7min) (Figura 2, curva J), juntamente com a condição de 50Gy (460Gy/7min) (Figura 1, curva E), foram as primeiras a causarem mortes nos insetos no tempo mais curto, ou seja 2 dias.

Os grupos de insetos submetidos às condições de 50Gy (460Gy/7min) (Figura 1, curva E), 150Gy (8650/1, 1770/5, 1010/9 e 460/20 Gy/min, respectivamente) (Figura 2, curvas H, I, K e M, respectivamente), tiveram após o intervalo de 24 dias a mesma porcentagem de sobrevivência do grupo controle, 40%. Já os insetos sob as condições de 42Gy (460Gy/7min), 200Gy (1670Gy/7min) (Figura 1, curvas D, G, respectivamente) e 150Gy (660Gy/15min) (Figura 2, curva L), apresentaram 50% de sobrevivência até o final de 24 dias. Somente as condições de 31Gy (370Gy/60min) e 100Gy (870 Gy/7min) (Figura 1, curvas C e F), apresentaram 70% e 60% de sobrevivência, respectivamente, até o final do intervalo de 24 dias.

Observou-se também que 10% dos insetos que receberam dose de radiação de 150Gy (660Gy/15min) (Figura 2, curva L), so-

freram muda para o estágio adulto dois dias após serem irradiados. Com 100Gy (870Gy/7min) (Figura 1, curva F), 10% dos insetos sofreram muda com três dias e outros 10% com quatro dias após irradiação. Com 200Gy (1670Gy/7min) (Figura 1, curva G) e 150Gy (1010Gy/9min) (Figura 2, curva K), 10% dos insetos, em cada condição, iniciavam a muda com seis dias após irradiação e morreram no mesmo dia sem completarem a muda. Na condição de 42Gy (460Gy/7min) (Figura 1, curva D), 10% dos insetos iniciavam a muda com quatorze dias após terem sido irradiados e morriam no décimo sétimo dia com a muda incompleta.

No grupo controle, 10% dos insetos sofreram muda para o estágio adulto, o que não era inesperado, visto que já haviam se passado 27 dias a partir do último dia de ingestão de sangue (Baldwin & Salthouse, 1959a, b).

Com base nas Figs. 1 e 2, escolheram-se os tempos para se efetuar o sacrifício dos insetos, que foram:

dose (Gray)	taxa de dose (Gray/min)	tempo (dias após a irradiação)
1200	1220/60	2, 3 e 6
31	370/60	12
42	460/7	12
50	460/7	12
100	870/7	3, 8 e 12
150	8650/1	6
150	1010/9	11
150	660/15	7 e 11

2- Fenótipos nucleares

2.1- Túbulos de malpighi, musculatura e traquéias

Em todas as condições em que se efetuou a análise citológica 1200Gy (1220Gy/60min), 31Gy (370Gy/60min), 150Gy (8650/1, 1010/9 e 660/15 Gy/min, respectivamente), 42Gy (460Gy/7min), 50Gy (460Gy/7min) e 100Gy (870Gy/7min) foi verificada nos túbulos de Malpighi a presença de núcleos com fenótipos nucleares encontrados nos insetos não irradiados e já descritos em diversos trabalhos por Mello (1971, 1975, 1978a, 1983). Estes são: núcleos com um cromocentro e eucromatina homogênea e clara (Figura 3), e núcleos com dois ou mais cromocentros (Figura 4).

Nos insetos irradiados foram encontrados mais os seguintes fenótipos nucleares: núcleos com heterocromatina pouco corada, aparentemente descompactada, núcleos vacuolizados, núcleos gigantes e núcleos picnóticos.

As Figuras 5 e 6 mostram o fenótipo nuclear caracterizado pela presença de "heterocromatina descompactada". Este apresenta a forma elipsoidal, o cromocentro sensivelmente expandido e a eucromatina mais difusa. Este fenótipo só não foi detectado na condição de 150Gy (1010Gy/9min).

O fenótipo nuclear denominado "vacuolizado" (Figuras 7 a 11), está associado a uma desorganização do material cromatínico, que gera evidentes alterações de forma e tamanhos nucleares. A eucromatina pode apresentar-se fibrosa, com vacúolos e irregu-

larmente distribuída. Já os cromocentros, quando evidentes, podem estar dilatados, fragmentados ou com aspectos diversos (forma estrelada), não havendo portanto, definição nítida de limite dos dois compartimentos da cromatina. Este fenótipo ocorreu com grande frequência nas condições de 1200Gy (1220Gy/60min), 150Gy (8650Gy/1min), 150Gy (660Gy/15min) e 100Gy (870Gy/7min), sendo sugestivo de degeneração e necrose.

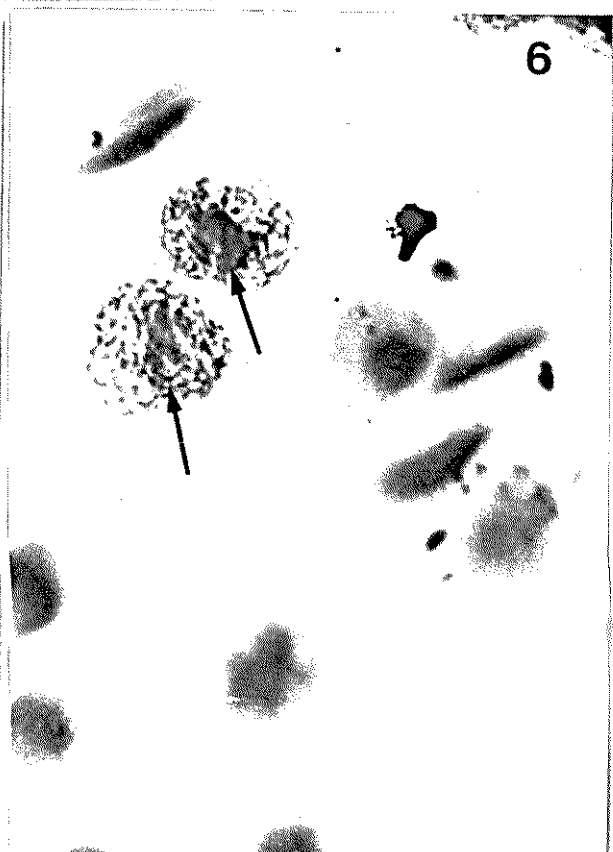
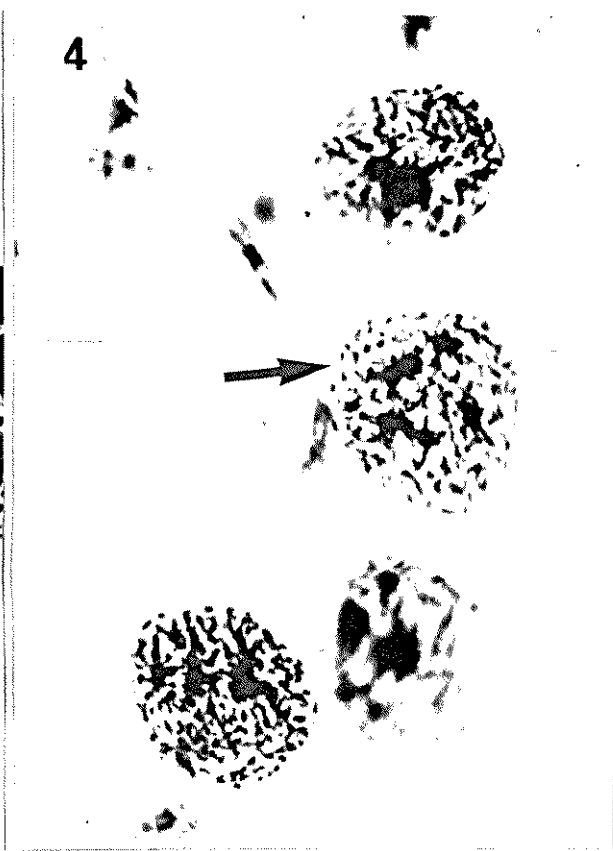
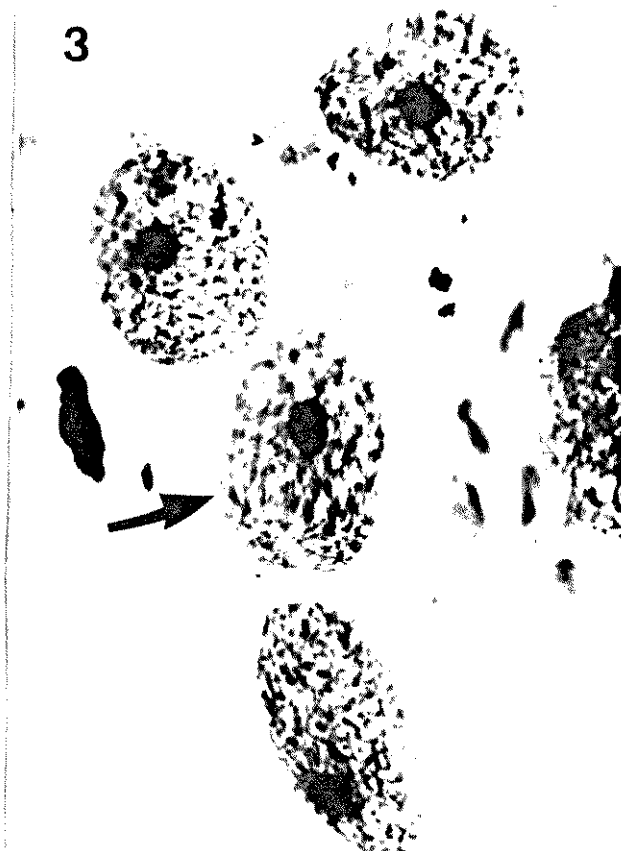
O fenótipo nuclear denominado "gigante", como o nome indica, descreve um núcleo de tamanho considerável, podendo apresentar um ou mais corpos heterocromáticos (Figuras 12 e 13). Ocorreu nas condições de 1200Gy (1220Gy/60min), 150Gy (8650Gy/1min) e 100Gy (870Gy/7min).

A Figura 14 apresenta o fenótipo nuclear denominado "picnótico". Nele o material cromatínico contrai-se ocasionando diminuição do tamanho nuclear associado ao aparecimento de um formato irregular. Apresenta-se intensamente corado. A frequência desse fenótipo foi muito baixa, ocorrendo apenas na condição de 150Gy (660Gy/15min).

Quanto aos núcleos de traquéias e musculatura, cuja ploidia foi constatada como 2C ou 4C (Mello, informação pessoal, 1987) e cujo fenótipo mais frequente mostra um pequeno corpo heterocromático (Simoni & Mello, 1986) (Figuras 15 e 16), foram detectadas alterações ao nível de heterocromatina descompactada (Figuras 17 a 22) e evidentes anomalias de forma (Figuras 17, 21 e 22) nas condições de 1200Gy (1220Gy/60min), 31Gy (370Gy/60min), 150Gy (8650Gy/1min), 150Gy (1010Gy/9min), 100Gy (870Gy/7min), 50Gy (460Gy/7min) e 42Gy (460Gy/7min).

Figuras 3- 6 Fénótipos nucleares de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* do grupo controle (3, um cromocentro; 4, vários cromocentros (setas)) e de espécimes submetidos às doses de radiação de 31Gy (370Gy/60min) (5) e 50 Gy (460Gy/7min) (6), estes últimos apresentando a heterocromatina em processo de descompactação (setas).

Reação de Feulgen. x 900



Figuras 7- 11 Fenótipo nuclear classificado como "vacuolizado" em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* submetidos às doses de radiação de 150Gy (8650Gy/1min) (7, 9 e 11), 1200Gy (1220Gy/60min) (8) e 42Gy (460Gy/7 min) (10) e submetidos à reação de Feulgen.

Vacuolizações levando a níveis crescentes de degeneração podem ser acompanhadas através das Figuras 9 a 11. u= esferitos de urato. x 900.

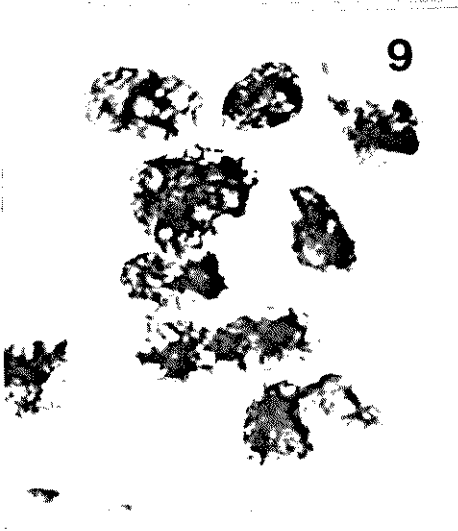
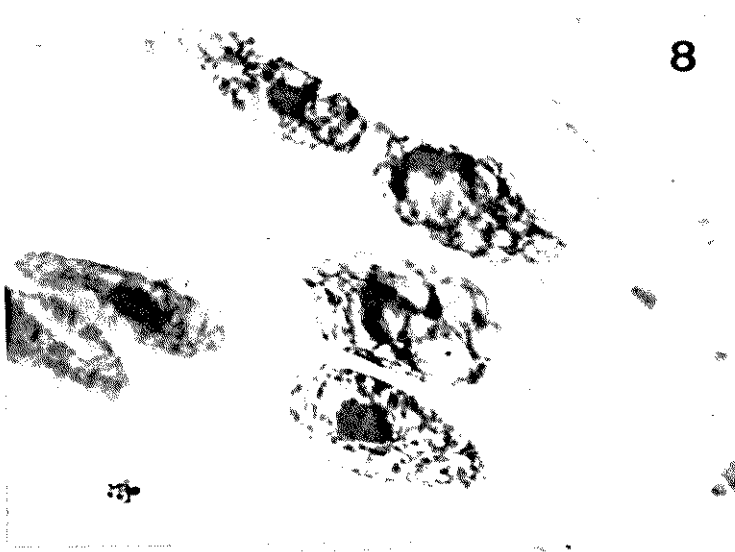
Figuras 12- 14 Fenótipos nucleares gigante (12 e 13, setas) e picnótico (14, setas) em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, submetidos às doses de radiação de 150Gy (8650 Gy/1min) (12 e 14) e 1200Gy (1220Gy/60min) (13).

Os preparados foram submetidos à reação de Feulgen. x 900.

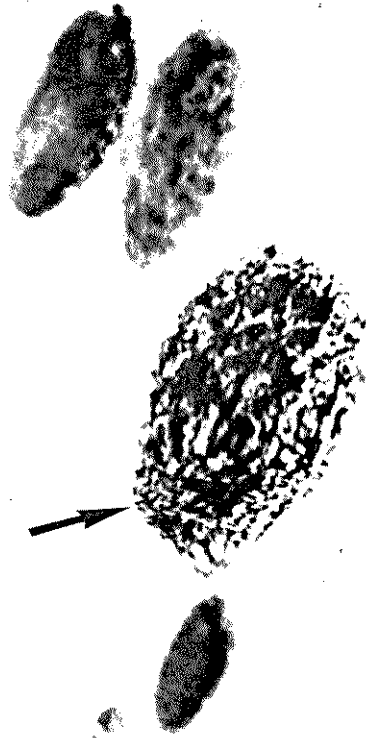
Figuras 15- 22 Fenótipos nucleares de musculatura e traquéias de *Triatoma infestans* do grupo controle (15 e 16) com um pequeno corpo heterocromático (seta) e fenótipos nucleares caracterizados por "heterocromatina descompactada" após serem irradiados com doses de: 1200Gy (1220Gy/60min) (18), 150Gy (8650Gy/1min) (17 e 19); 100Gy (870Gy/7min) (20); 50Gy (460Gy/7min) (21) e 42Gy (460Gy/7min) (22).

As Figs. 17, 21 e 22, apresentam evidentes anomalias de formas nucleares (setas).

Os preparados foram submetidos à reação de Feulgen (Figs. 15, 17 e 22) e banda C (Fig. 16). x 900.



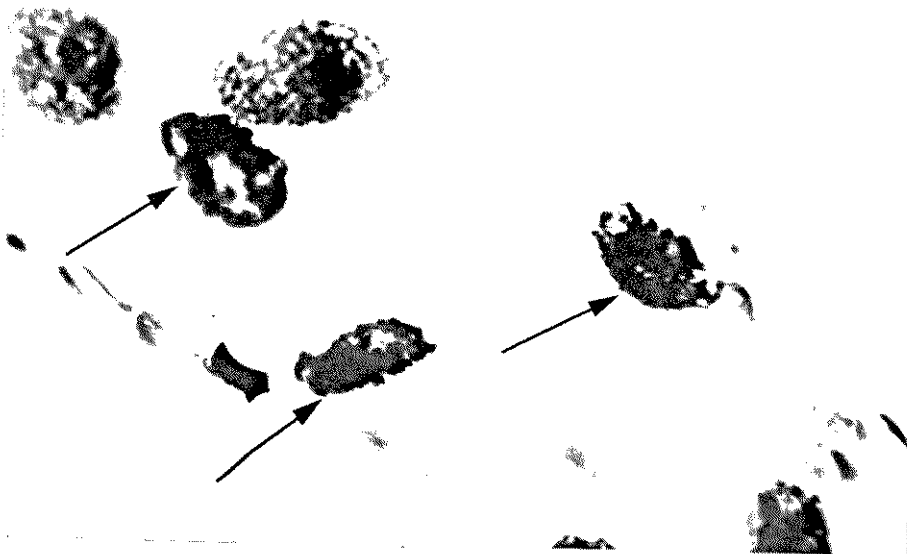
12



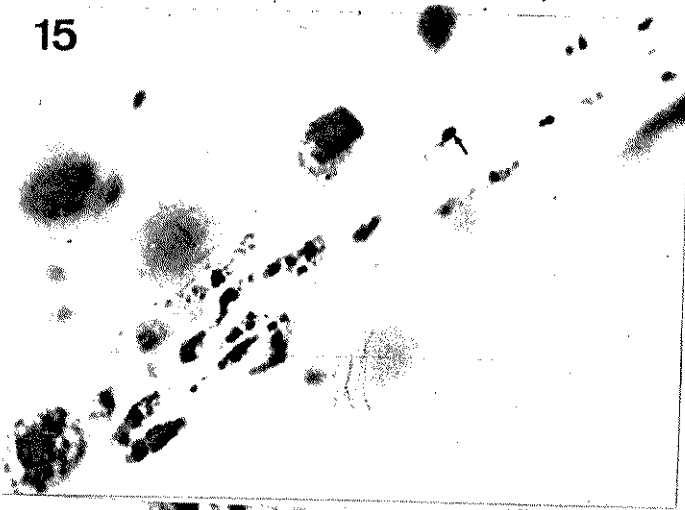
13



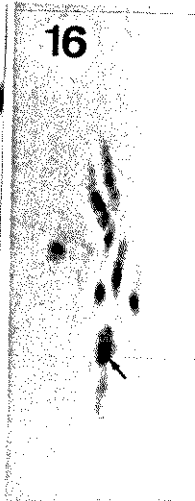
14



15



16



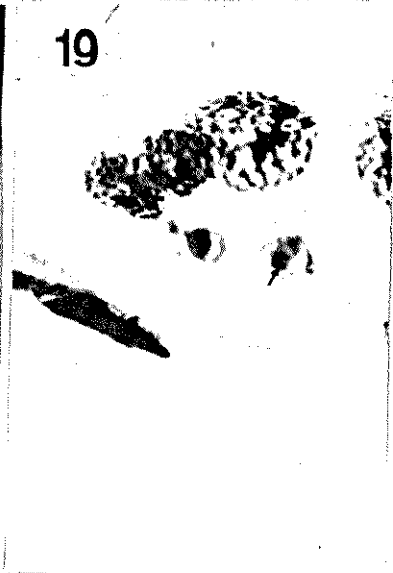
17



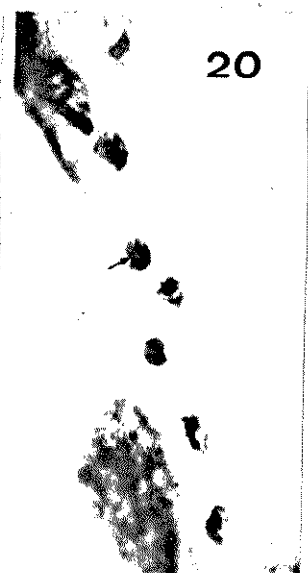
18



19



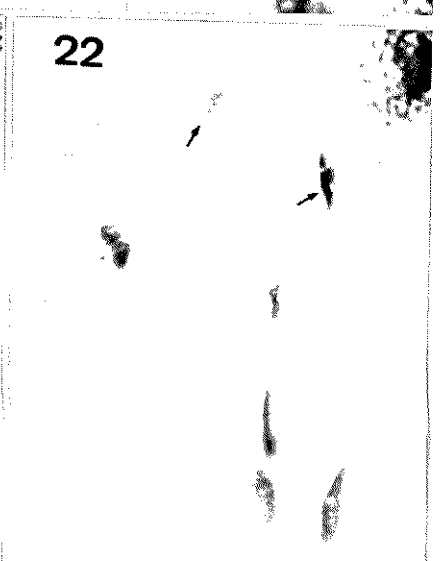
20



21



22



2.2- Testículos

Foram detectadas alterações nucleares nas seguintes condições experimentais: 1200 (1220/60), 31 (370/60), 42 (460/7), 50 (460/7), 100 (870/7) e 150 (8650/1 e 1010/9, respectivamente) Gy (Gy/min), alterações essas que envolvem a linhagem germinativa propriamente dita e as células tróficas ou de nutrição.

Quanto à linhagem germinativa, foram encontrados núcleos no "estágio confuso" (Schrader, 1950), nos quais a heterocromatina apareceu bastante dilatada e/ou fracamente corada nos insetos que receberam doses de radiação de 1200 (1220/60), 31 (370/60) e 50 (460/7) Gy (Gy/min), em comparação à condição controle (Figuras 23 a 25). Sob a condição de 1200Gy (1220Gy/60min) tal observação ocorreu com maior frequência.

Os espermátócitos de 2a. ordem de testículos de insetos irradiados com dose de radiação de 1200Gy (1220Gy/60min) apresentaram algumas vezes núcleos com distribuição cromatínica de aspecto vesiculado e picnóticos (Figuras 26 e 27). Na condição de 150Gy (8650Gy/1min) alguns espermátócitos de 2a. ordem apareceram com núcleo aparentemente maior e a heterocromatina descompactada (Figura 28).

Foram observadas alterações de forma nas espermátides dos insetos submetidos às doses de radiação de 100 (870/7) e 50 (460/7) Gy (Gy/min). Com frequência foram encontradas espermátides de aparência entumescida e pouco alongada (Figuras 29 a 32). Nas condições de 150 (8650/1), 150 (1010/9) e 42 (460/7) Gy

min), não se apresentaram alterações detectáveis a nível de fenótipo nuclear nas espermatídes. Nas condições de 1200 (1220/60) e 31 (370/60) Gy (Gy/min) não se encontraram espermatídes.

Espermatozóides não se achavam presentes em todos os preparados analisados. Isso sugere que ou os testículos se achavam imaturos nos insetos utilizados ou a radiação causou um retardo no desenvolvimento espermatogênico. No entanto, nos preparados em que estes foram detectados (50 e 42 Gy (460Gy/7min)), aparentemente não ocorreram alterações em sua disposição e organização bem como na orientação macromolecular de seus componentes (Figura 33).

Nas placas metafásicas meióticas de *Triatoma infestans* foram evidenciados os três maiores pares de cromossomos considerados heteropicnóticos (Schreiber & Pellegrino, 1950; Barth, 1956 (Figura 34). Em algumas placas metafásicas dos insetos que receberam dose de radiação de 31Gy (370Gy/60min), os cromossomos se apresentaram entumescidos e palidamente corados. Somente na condição de 100Gy (870Gy/7min) observou-se migração cromossômica com atraso (Figura 35), possivelmente levando a perdas cromossômicas.

Sob as condições de 1200 (1220/60), 31 (370/60), 50 (460/7) e 100 (870/7) Gy (Gy/min) foram encontrados núcleos picnóticos, que não puderam ter sua fase espermatogenética determinada (Figuras 36 e 37). Destes observou-se a eliminação de micronúcleos também picnóticos (Figura 37), o que segundo dados de Heddle & Carrano (1977) indicaria necrose. Micronúcleos palidamente corados, sugestivo de quebras cromossômicas (Heddle & Carrano, 1977), apareceram na condição de 1200Gy (1206y/60min).

Quanto às células tróficas do testículo, altamente poliplóides, apresentaram fenótipos nucleares variados marcados por alterações nos insetos irradiados. Nas condições de 1200 (1220/60), 31 (370/60) e 100 (870/7) Gy (Gy/min) muitas células de nutrição apareceram menos coradas do que no controle (Figura 38). Nas condições de 50 (460/7) , 150 (1010/9) e 1200 (1220/60) Gy (Gy/min) muitos núcleos apresentaram contorno irregular, possivelmente uma etapa de degeneração (Figuras 39 a 41). Na condição de 1200Gy (1220Gy/60min), a heterocromatina apresentou-se menos corada no centro de um cromocentro e mais escura no seu limite com a eucromatina.

Figuras 23- 28 Fenótipos nucleares de células da linhagem germinativa de espécimes de *Triatoma infestans* controle e submetidos à radiação. Os preparados foram submetidos à reação de Feulgen.

Fenótipo nuclear da fase de "estágio confuso" (23, seta dupla) e de espermátócitos de 2º ordem (23, seta) de espécimes do grupo controle.

Heterocromatina dilatada (24) e pouco corada (25, seta) em núcleos do "estágio confuso" de espécimes submetidos às doses de radiação de 31Gy (370Gy/60min) (24) e 1200Gy (1220Gy/60min) (25).

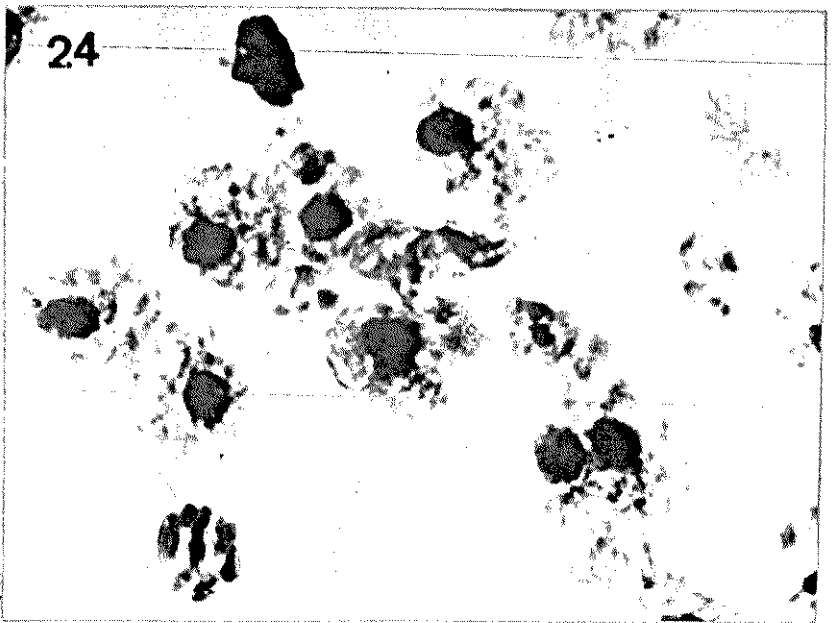
Núcleos de espermátócitos de 2º ordem com aspecto vesiculoso (26, seta) ou picnóticos (27, setas) após dose de radiação de 1200Gy (120Gy/60min). Com dose de radiação de 150Gy (8650Gy/1min) o volume nuclear aparece aumentado (28, setas) e a heterocromatina parcialmente descompactada. espermátides.

Figs. 23 e 28, x 900; Fig. 24, x 1800; Figs. 25 a 27, x 2240.

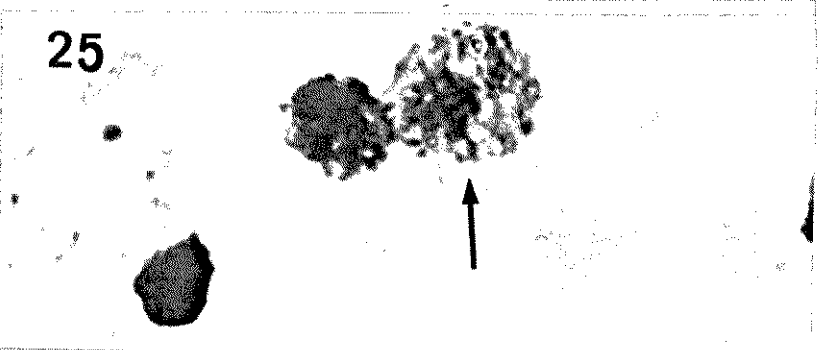
23



24



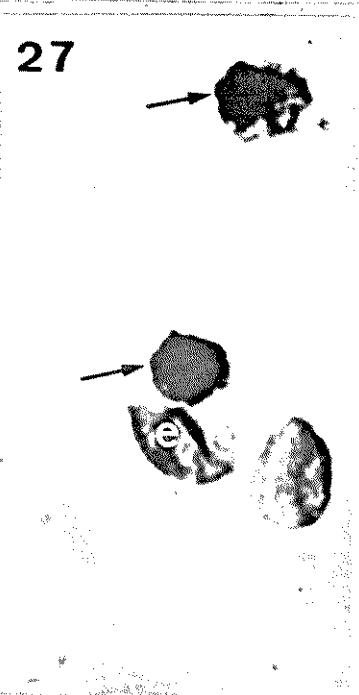
25



26



27



28



Figuras 29- 32 Fenótipo nuclear de espermatídes em espécimes de *Triatoma infestans* submetidos à radiação. Os preparados foram submetidos à reação de Feulgen.
Controle (29), x 900.

Formas anormais e dilatadas, em espécimes submetidos às doses de radiação de 50Gy (460Gy/7min) (30 e 31, setas) e 100Gy (870 Gy/7min) (32, setas).

Figs. 29 e 30, x 1800; 31 e 32, x 2240.

29



30



32



31

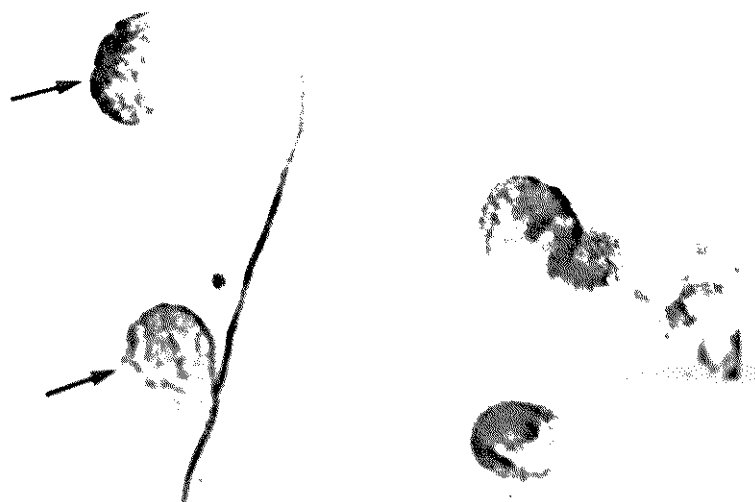
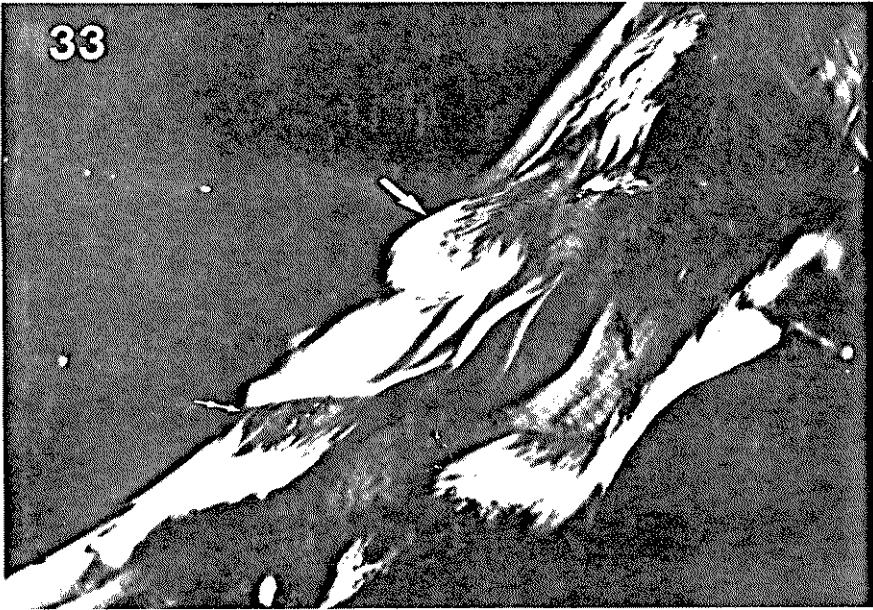


Figura 33- Observação ao microscópio de polarização de espermatozóides de um espécime de *Triatoma infestans*, submetido à dose de radiação de 50Gy (460Gy/7min), apresentando disposição, organização e orientação de suas macromoléculas sem alterações. O brilho observado corresponde ao fenômeno anisotrópico de birrefringência do DNA nos núcleos (seta) e de seus constituintes macromolecularmente orientados das caudas (seta dupla) (Mello, 1987). Preparados submetidos ao método de banda C. x 350.

33



Figuras 34- 35 Placa metafásica meiótica do grupo controle. São evidenciados os três maiores pares de autossomos (34, seta). Reação de Feulgen. x 1800.

Anáfase meiótica de um espécime submetido à dose de radiação de 100Gy (870Gy/7min). Constata-se migração com atraso para alguns cromossomos (35, seta). Reação de Feulgen.
x 2240.

Figuras 36- 37 Núcleos picnóticos foram detectados nos preparados de testículos de *Triatoma infestans* submetidos à dose de radiação de 50Gy (460Gy/7min) (36) e 31Gy (370Gy/60 min) (37). No último caso são vistos também micronúcleos picnóticos (seta).

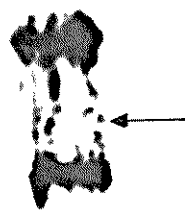
Reação de Feulgen.

Fig. 36, x 2240; Fig. 37, 1800.

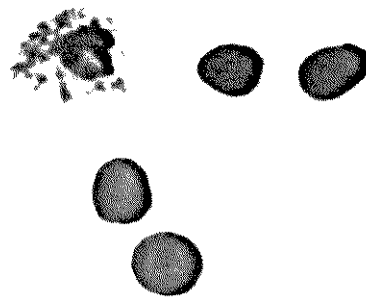
34



35



36



37



Figuras 38- 41. Fenótipos nucleares de células tróficas de testículos de *Triatoma infestans* submetidos à radiação. Os preparados foram corados com reação de Feulgen. Controle (38, seta).

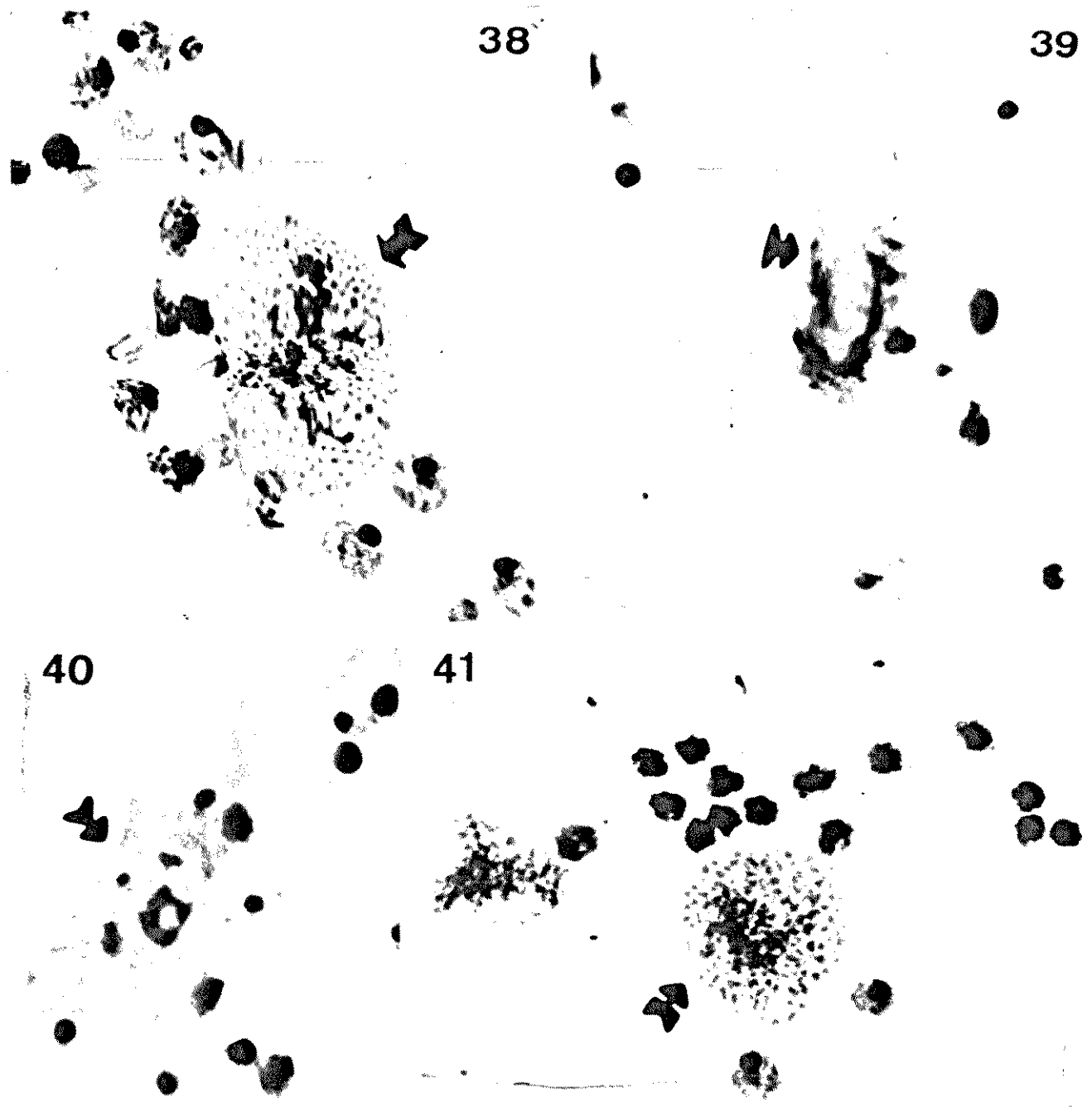
Contorno irregular e alterações na distribuição da heterocromatina em núcleos de células tróficas de espécimes submetidos às doses de radiação de 1200Gy (1220Gy/60 min) (39 e 40, setas) e 150Gy (8650Gy/1 min) (41, seta). x 900.

38

39

40

41



3- Áreas nucleares

Os valores de área nuclear total e as áreas cobertas por heterocromatina e eucromatina em túbulos de Malpighi, traquéias e musculatura dos espécimes controle e dos irradiados foram distribuídos segundo histogramas de frequência, numa escala de valores em progressão geométrica (Figuras 42 a 51).

As classes I a IX das Figuras 42 a 45 representam intervalos que guardam entre si a relação $\sqrt[3]{4}$, o que corresponderia a duplicações em valores de volume nuclear (Palkóvits & Fischer, 1968; Mello & Vidal, 1980).

A análise da Figura 42 permite concluir que dependendo da dose de radiação, há alterações no padrão de distribuição dos valores de área nuclear, em núcleos em que o fenótipo aparentemente não se encontra alterado. As modificações dizem respeito a deslocamentos de valores para o lado esquerdo das distribuições, ou seja, decréscimo em áreas para parte da população nuclear, o que aconteceu com predominância nas células poliplóides dos túbulos de Malpighi (Tabela 2). Nas células consideradas diplóides esse decréscimo ocorreu nas condições de 100Cy (870Cy/7min), 150Cy (1010Cy/9min) e 50Cy (460Cy/7min). Por outro lado, um ligeiro aumento de área foi somente observado em células consideradas diplóides, nas condições de 150Cy (660Cy/15min) e 100Cy (870Cy/7min) (Figura 42). Estatisticamente, porém, apenas o decréscimo na condição de 150Cy (1010Cy/9min) e aumento na condição de 660Cy/15min foram significativos (Tabela 3).

Figura 42- Histogramas de frequência dos valores de área nuclear de células epiteliais dos túbulos de Malpighi, traquéias e musculatura dos insetos controle e dos irradiados, com fenótipo nuclear aparentemente normal. As classes I a IX representam intervalos que guardam entre si a relação de $\sqrt[3]{4}$, o que corresponderia a duplicações em valores de volume nuclear (Palkóvits & Fischer, 1968; Mello & Vidal, 1980). (f= frequência, ■ = núcleos considerados diplóides a tetraplóides, □ = núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi com um cromocentro e ▣ = núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi com vários cromocentros).

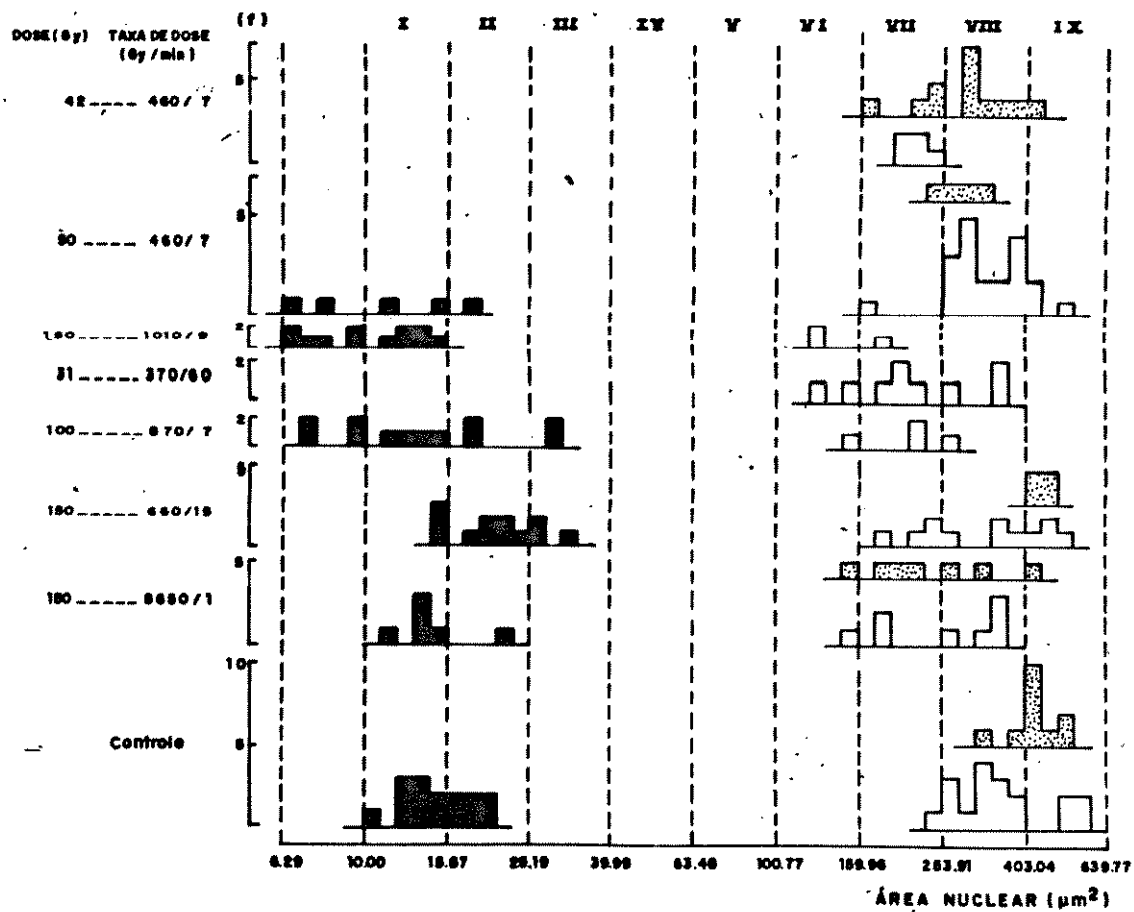


Tabela 2- Distribuição de valores relativos de área de núcleos poliploides, com um cromocentro (x) e com vários cromocentros (**), nas diferentes classes, dos insetos controle vs irradiados, com "fenótipo nuclear aparentemente normal" (dados em porcentagem).

Condições experimentais	Classes				nTotal
	VI	VII	VIII	IX	
Controle					
*	-	5.56	72.22	22.22	100
**	-	-	20	80	100
150Gy (8650Gy/1min)					
*	12.5	25	62.5	-	100
**	14.29	42.85	28.57	14.29	100
150Gy (660Gy/15min)					
*	-	33.33	33.33	33.33	100
**	-	-	-	100	100
100Gy (870Gy/7min)					
*	25	50	25	-	100
31Gy (370Gy/60min)					
*	22.22	44.45	33.33	-	100
150Gy (1010Gy/9min)					
*	66.67	33.33	-	-	100
50Gy (460Gy/7min)					
*	-	5	80	15	100
**	-	25	75	-	100
42Gy (460Gy/7min)					
*	-	100	-	-	100
**	-	33.33	58.34	8.33	100

Tabela 3- Teste t de Student para comparação dos valores de área nuclear de células diploides de *Triatoma infestans* do grupo controle vs irradiados, "com fenótipo nuclear aparentemente normal".

Controle/Dose(Gy) (Taxa de dose (Gy/min))	GL (n-2)	t	p	Decisão
Controle/150 (8650/1)	19	.38	2.861	NS
Controle/150 (660/15)	25	3.67	2.787	S
Controle/100 (870/7)	26	.32	2.779	NS
Controle/150 (1010/9)	25	4.32	2.787	S
Controle/50 (460/7)	18	1.70	2.878	NS

Decisão: (NS)= Não Significante e (S)= Significante ($p > 0.01$).

A Figura 43 apresenta histogramas de frequência dos valores de área nuclear total dos insetos controle com fenótipo nuclear normal e dos irradiados com fenótipo exibindo "heterocromatina descompactada". Esta figura salienta para os núcleos poliplóides um mais drástico decréscimo nos valores de área sob a condição de 1200Gy (1220Gy/60min), o que aparece bem realçado quando se analisa a distribuição relativa dos valores nas várias classes de área (Tabela 4). Nas condições de 42Gy (460Gy/7min) e 31Gy (370Gy/60min) também houve decréscimo nas áreas nucleares, porém o reduzido número da amostra não o torna comparável ao resultado obtido com 1200Gy (1220Gy/60min).

As áreas dos núcleos considerados diplóides em insetos irradiados com as doses de 1200Gy (1220Gy/60min), 150Gy (8650Gy/1min), 100Gy (870Gy/7min) e 31Gy (370Gy/60min), apresentaram um deslocamento para valores inferiores (Figura 43). Na condição de 150Gy (8650Gy/1min) uma parte dos valores se deslocou para as classes superiores; nas condições de 100Gy (870Gy/7min) e 42Gy (460Gy/7min) alguns poucos valores mostraram um ligeiro deslocamento para áreas mais altas (Figura 43).

Os histogramas de frequência apresentados na Figura 44 representam as áreas de núcleos poliplóides dos insetos irradiados, com fenótipo nuclear caracterizado como "vacuolizado". Em todas as condições analisadas houve para estes núcleos deslocamentos de parte da população de áreas nucleares para valores inferiores. Pela Tabela 5 podemos concluir que geralmente a maior porcentagem das áreas se concentrou nas classes VII e VIII, enquanto o controle, apresentava áreas localizadas nas classes VIII e IX.

Figura 43- Histogramas de frequência dos valores de área nuclear de células epiteliais dos túbulos de Malpighi, traquéias e musculatura dos insetos controle e dos irradiados com fenótipo nuclear caracterizado por "heterocromatina descompactada". As classes I a IX representam intervalos que guardam entre si a relação $\sqrt[3]{1}$, o que corresponderia a duplicações em valores de volume nuclear (Palkóvits & Fischer, 1968; Mello & Vidal, 1980). (f= frequência, ■ = núcleos considerados diplóides a tetraplóides, □ = núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi com um cromocentro, ⊞ = núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi com vários cromocentros).

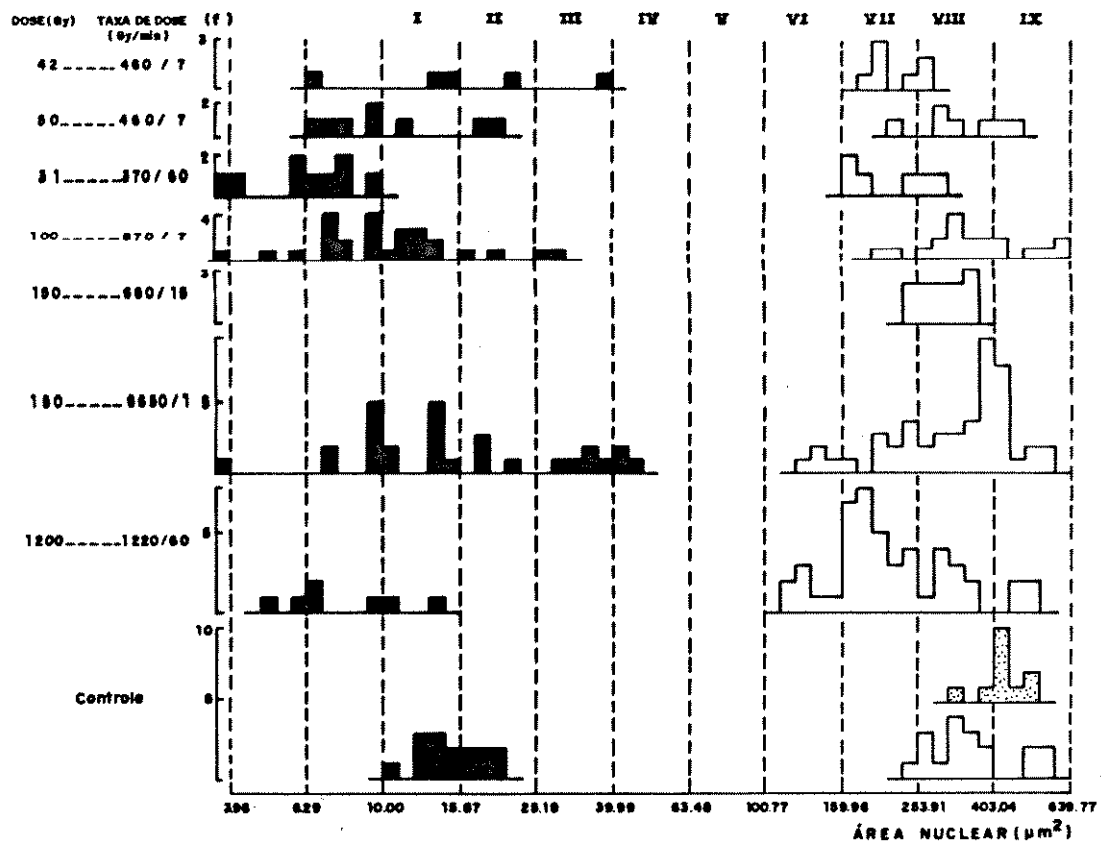


Tabela 4- Distribuição dos valores relativos de área de núcleos poliploides com um único cromocentro, nas diferentes classes, dos insetos controle vs irradiados, com fe nótipo nuclear caracterizado por "heterocromatina descompactada".

Condições experimentais	Classes				n total
	VI	VII	VIII	IX	
Controle	-	5.56	72.22	22.22	100
1200Gy (1220Gy/60min)	14.19	56.25	20.83	8.33	100
150Gy (8650Gy/1min)	8.51	21.27	44.68	25.53	100
31Gy (370Gy/60min)	-	66.66	33.34	-	100
42Gy (460Gy/7min)	-	72	28	-	100

Figura 44- Histogramas de frequência dos valores de área para núcleos de células epiteliais dos túbulos de Malpighi, musculatura e traquéias dos insetos controle e para núcleos com fenótipo "vacuolizado", de células epiteliais de túbulos de Malpighi de insetos. As classes I a IX representam intervalos que guardam entre si a relação $\sqrt[3]{4}$, o que corresponderia a duplicações em valores de volume nuclear (Palkóvits & Fischer, 1968; Mello & Vidal, 1980). (f= frequência, ■ = núcleos considerados diplóides a tetraplóides, □ = núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi com um cromocentro e ▣ = núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi com vários cromocentros.

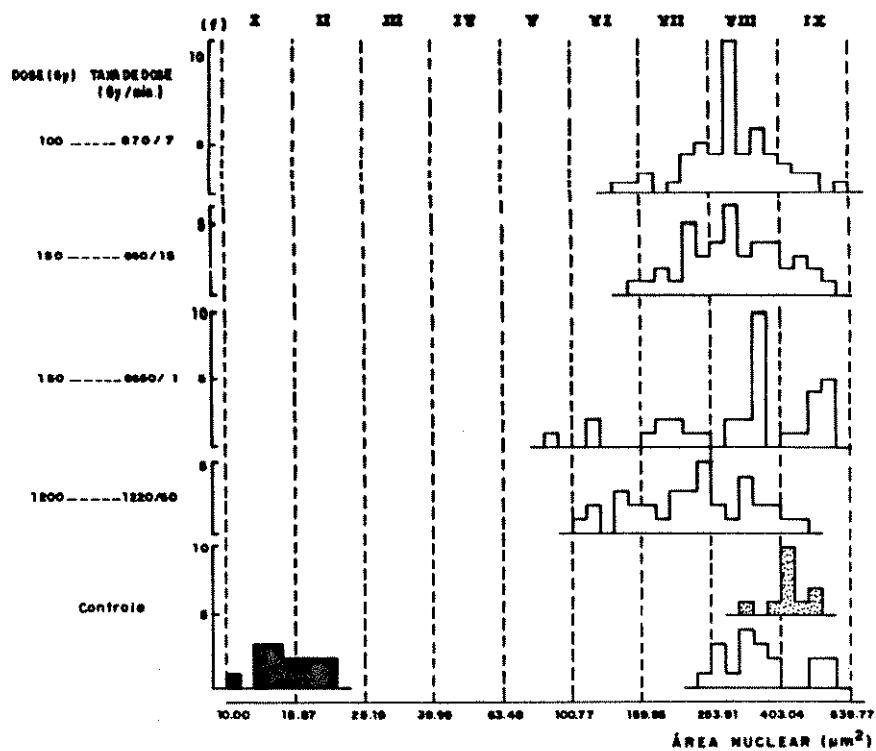


Tabela 5 Distribuição dos valores relativos de núcleos poliploides, nas diferentes classes, dos insetos controle vs irradiados com fenótipo nuclear caracterizado como "vacuolizado".

Condições experimentais	Classes					n total
	V	VI	VII	VIII	IX	
Controle	-	-	5.56	72.22	22.22	100
1200Gy (1220Gy/60min)	-	22.22	38.89	30.5	5.55	100
150Gy (8650Gy/1min)	2.85	5.72	20	40	31.43	100
150Gy (660Gy/15min)	-	2.38	28.57	50	19.05	100
100Gy (870Gy/7min)	-	3.92	23.52	56.87	15.19	100

A Figura 45 apresenta os histogramas de frequência de área de núcleos com fenótipo "gigante" dos túbulos de Malpighi em espécimes irradiados. Como o próprio fenótipo o indicava, estas áreas excederam as do controle.

Os histogramas de frequência apresentados nas Figuras 46 a 51, contêm os valores de área nuclear da heterocromatina e eucromatina em separado, para núcleos diplóides e para os poliplóides dos insetos do grupo controle com fenótipo normal e para os irradiados com fenótipos nucleares alterados.

Pela análise da Figura 46 pode-se concluir que nos núcleos dos insetos controle a área dos corpos heterocromáticos com vários cromocentros praticamente corresponde à de núcleos com um cromocentro (células epiteliais poliplóides). Em todas as condições em que foi detectado o fenótipo aparentemente normal, as áreas eucromáticas dos núcleos com um cromocentro sofreram uma ligeira diminuição, sendo que nas condições de 150Gy (1010Gy/9 min) e 31Gy (370Gy/60min) essa diminuição foi maior. Os núcleos com vários cromocentros também sofreram uma diminuição das áreas eucromáticas, especialmente sob a condição de 150Gy (8650Gy/1min). As áreas heterocromáticas no geral não diminuíram; permaneceram distribuídas no mesmo intervalo de valores, com poucas exceções. Há sugestão de relativa descompactação da heterocromatina em alguns núcleos de insetos submetidos à condição de 150Gy (660Gy/15min).

A Figura 47 mostra que as áreas heterocromáticas e eucromáticas dos núcleos diplóides de insetos irradiados em que o fenótipo nuclear era aparentemente normal, são semelhantes às do

Figura 45- Histogramas de frequência dos valores de área nuclear de células epiteliais dos túbulos de Malpighi, musculatura e traquéias dos insetos controle e dos núcleos com fenótipo caracterizado como "gigante", de insetos irradiados. As classes I a IX representam intervalos que guardam entre si a relação $\sqrt[3]{4}$, o que corresponderia a duplicações em valores de volume nuclear (Palkóvits & Fischesr, 1968; Mello & Vidal, 1980). (f= frequência, ■ = núcleos considerados diplóides a tetraplóides, □ = núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi com um cromocentro e ▣ = núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi com vários cromocentros).

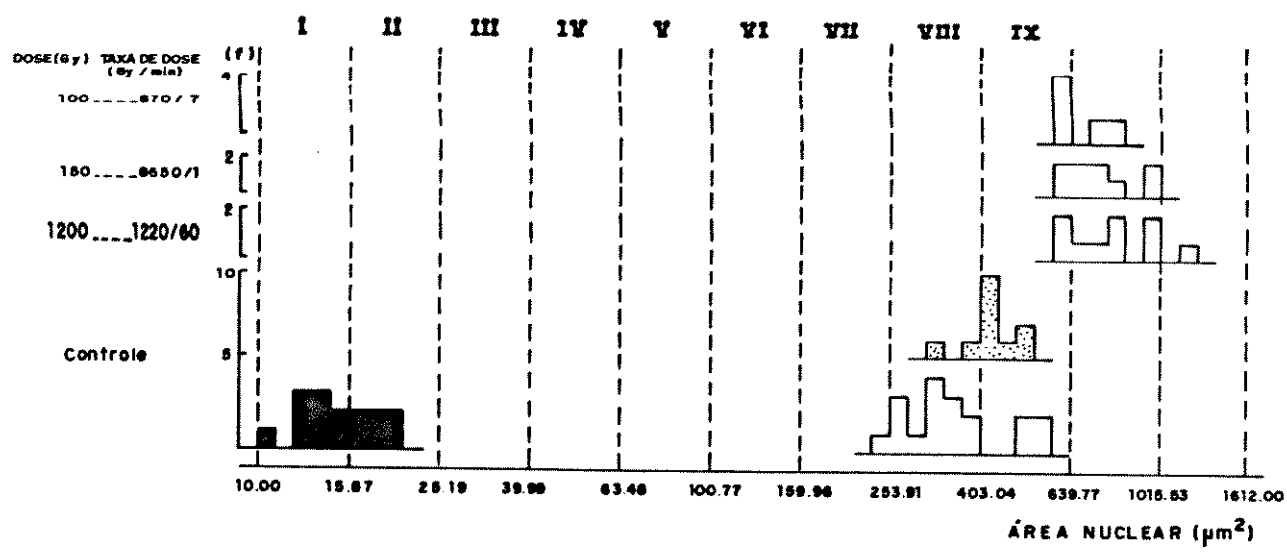


Figura 46- Histogramas de frequência dos valores de hetero e eucromatina em separado, de núcleos de células poliploides dos túbulos de malpighi dos insetos controle e dos irradiados, com fenótipo nuclear aparentemente normal. (f= frequência, ■ H= heterocromatina, □ E= eucromatina de núcleos com um cromocentro e ▣ E= eucromatina de núcleos com vários cromocentros).

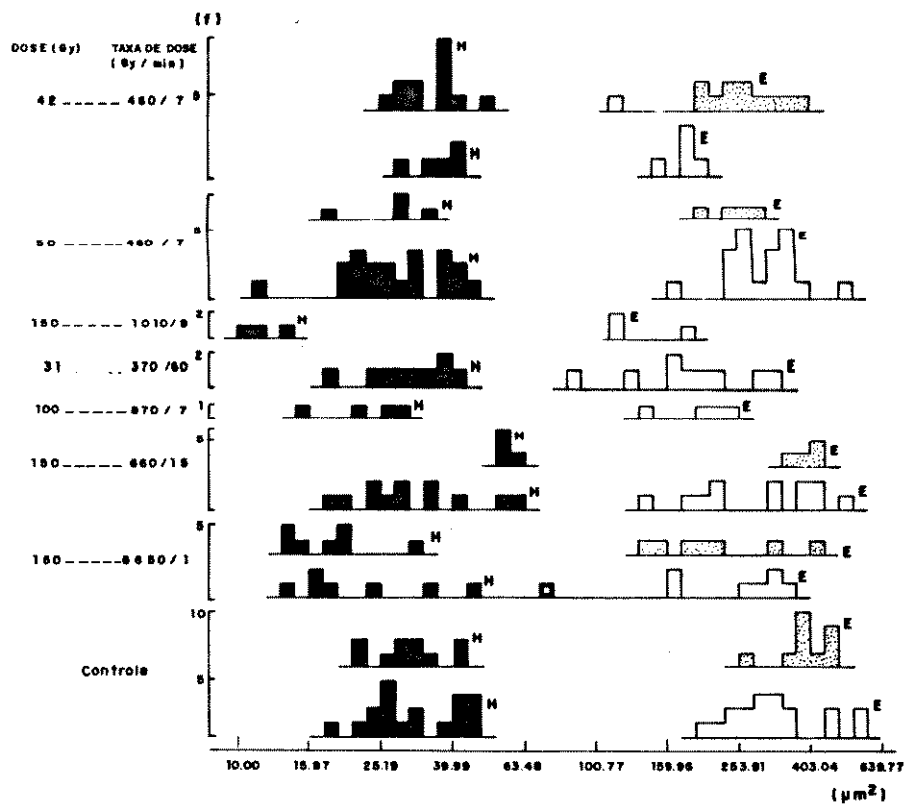
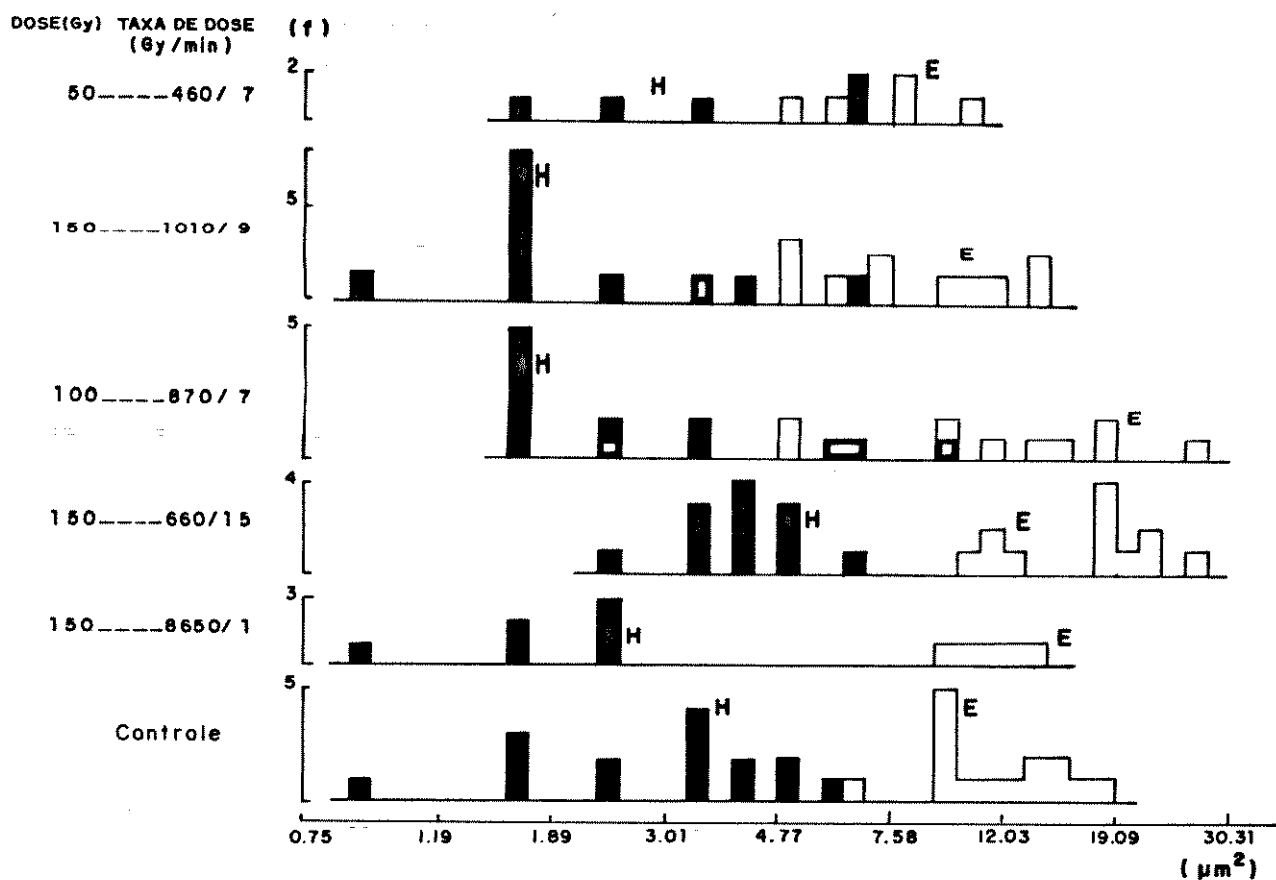


Figura 47- Histogramas de frequência dos valores de hetero e eucromatina em separado de núcleos considerados diplóides a tetraplóides, de fibras musculares e traquéias dos insetos controle e dos irradiados, com fenótipo nuclear aparentemente normal. (f= frequência, ■ H= heterocromatina e □ E= eucromatina.



controle. Apenas nas condições experimentais de 150Gy (660Gy/15min) e 100Gy (870Gy/7min) houve um ligeiro aumento das áreas de eucromatina. Alguns poucos núcleos, nas condições de 50 Gy (460Gy/7min), 150Gy (1010Gy/9min) e 100Gy (870Gy/7min) apresentaram diminuição na área eucromática.

A distribuição das áreas eucromáticas sofreu um decréscimo, enquanto as áreas heterocromáticas apresentaram um aumento, ambos drásticos, em todas as condições nas quais se analisou o fenótipo "vacuolizado" dos núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi (Figura 48). Apenas na condição de 150Gy (8650Gy/1min) houve diminuição de áreas heterocromáticas de uma pequena parte da população nuclear, nesta condição a distribuição dos valores de área da heterocromatina apresentou grande amplitude de variação.

Nos núcleos portadores de "heterocromatina descompactada", nas células poliplóides, a dispersão dos valores de área heterocromática aumentou nos insetos irradiados (Figura 49). Como era esperado da própria definição do fenótipo, nas várias condições experimentais as áreas de parte da população nuclear apareceram sensivelmente aumentadas. por outro lado, embora o fenótipo seja definido como "heterocromatina descompactada", por esta se apresentar menos corada que a usual, parte da população nuclear apresentou decréscimo da área heterocromática, nas várias condições experimentais, mas especialmente na condição de 1200Gy (1220 Gy/60min), onde chega a afetar mais de 50% dos núcleos.

Os histogramas de frequência das áreas eucromáticas e heterocromáticas dos núcleos considerados diplóides e apresentam-

Figura 48- Histogramas de frequência dos valores de hetero e eucromatina em separado de núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi dos insetos controle e dos irradiados com fenótipo nuclear caracterizado por "vacuolizado". (f= frequência, ■ H= heterocromatina, □ E= eucromatina de núcleos com um cromocentro e ▣ E= eucromatina de núcleos com vários cromocentros).

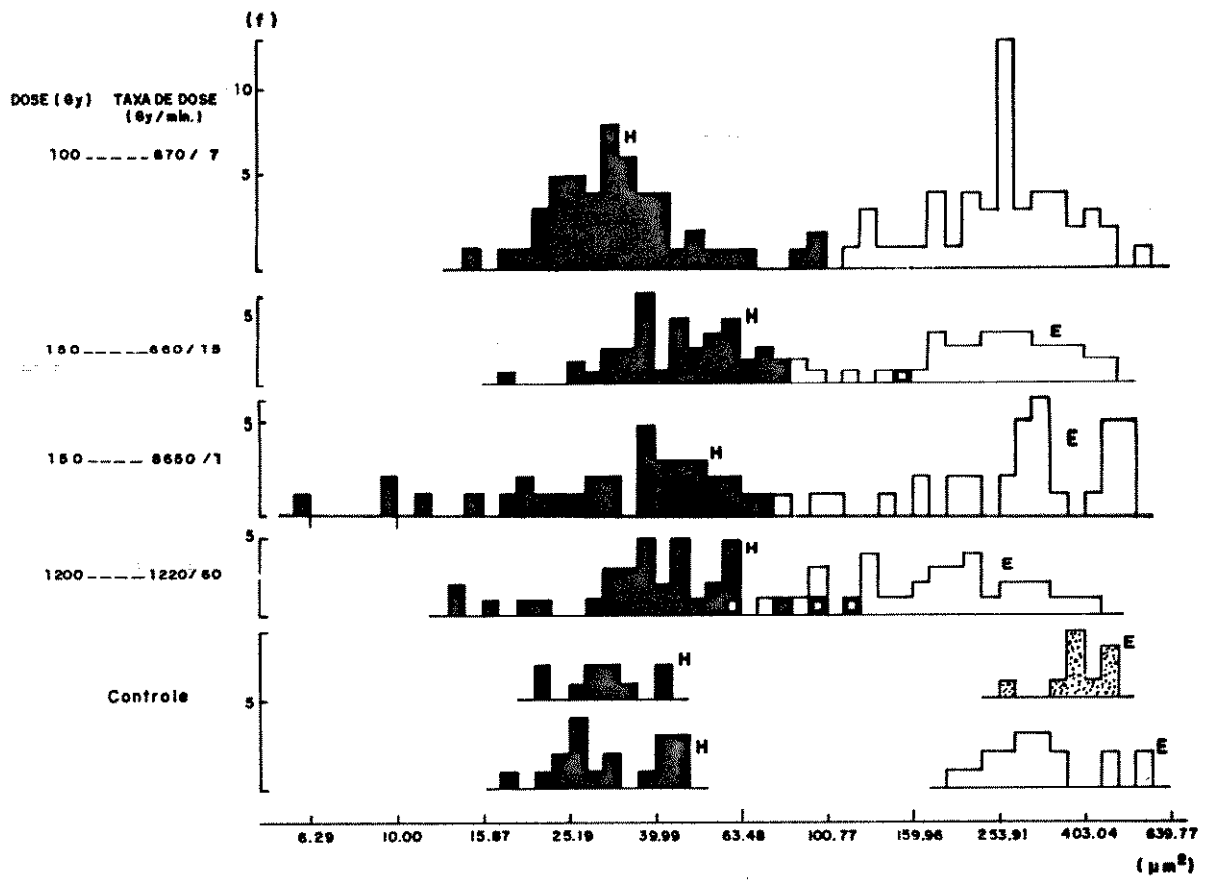
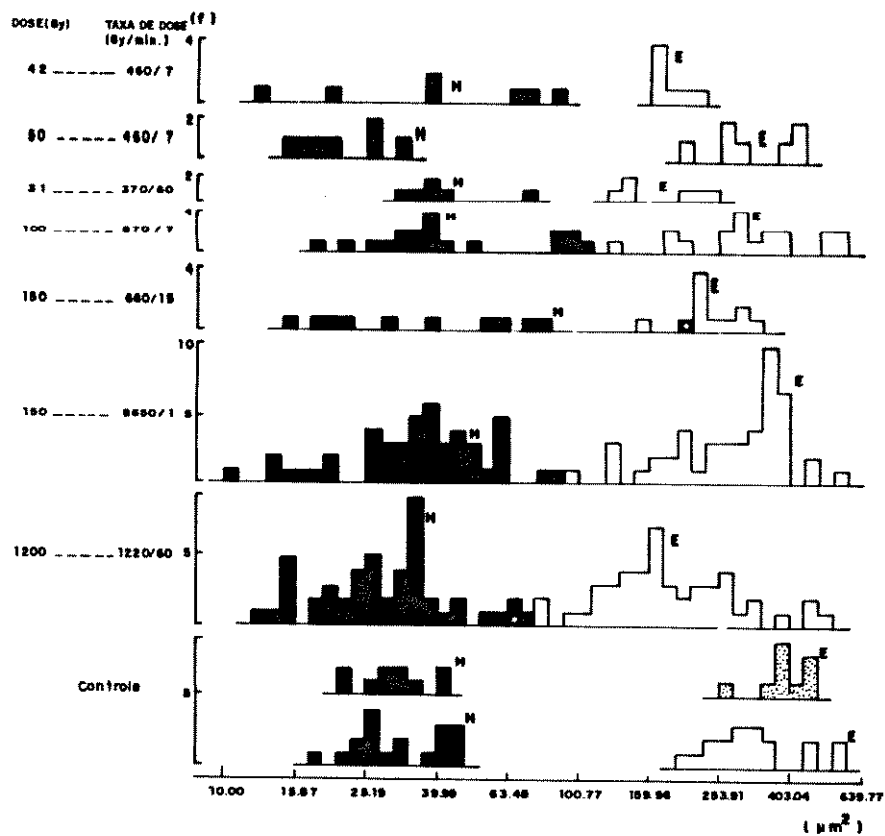


Figura 49- Histogramas de frequência dos valores de hetero- e eucromatina em separado de núcleos poliplóides de túbulos de Malpighi dos insetos controle e dos irradiados, com fenótipo nuclear caracterizado como exibindo "heterocromatina descompactada". (f= frequência, ■ H= heterocromatina, □ E= eucromatina de núcleos com um cromocentro e ▣ E= eucromatina de núcleos com vários cromocentros).



do fenótipo com "heterocromatina descompactada", acham-se plotados na Figura 50. Com relação à eucromatina evidenciou-se geralmente um aumento de dispersão da distribuição dos valores. Assim, na condição de 100Gy (870Gy/7min) foram encontrados núcleos com aumento de área da eucromatina, embora ocorresse com predominância para outros núcleos decréscimo dessa área. Na condição de 150 Gy (8650Gy/1min), embora predominasse aumento de área eucromática, detectou-se para alguns núcleos sensível decréscimo de área para essa cromatina. Nas condições de 1200Gy (1220Gy/60min) e 31Gy (370Gy/60min) detectou-se decréscimo na área eucromática. Já com relação às áreas heterocromáticas, houve um ligeiro decréscimo para alguns núcleos na condição de 150Gy (8650Gy/1min) e mais significativo na condição de 31Gy (370Gy/60min), sendo justificado pela definição do fenótipo em termos de menor coloração. Poucos núcleos exibiram área heterocromática acima dos valores encontrados na condição controle.

Com relação ao fenótipo nuclear "gigante" dos núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi constatou-se não só um aumento na área eucromática de quase todos os núcleos, mas também um aumento na área heterocromática em ao redor de 50% dos núcleos, considerando-se os insetos irradiados comparados ao controle (Figura 51).

Figura 50- Histogramas de frequência dos valores de hetero- e eucromatina em separado de núcleos considerados diplóides a tetraplóides, fibras musculares e traquéias, do insetos controle e dos irradiados, com fenótipo nuclear caracterizado por "heterocromatina descompactada". (f= frequência, ■ H= heterocromatina e □ E= eucromatina).

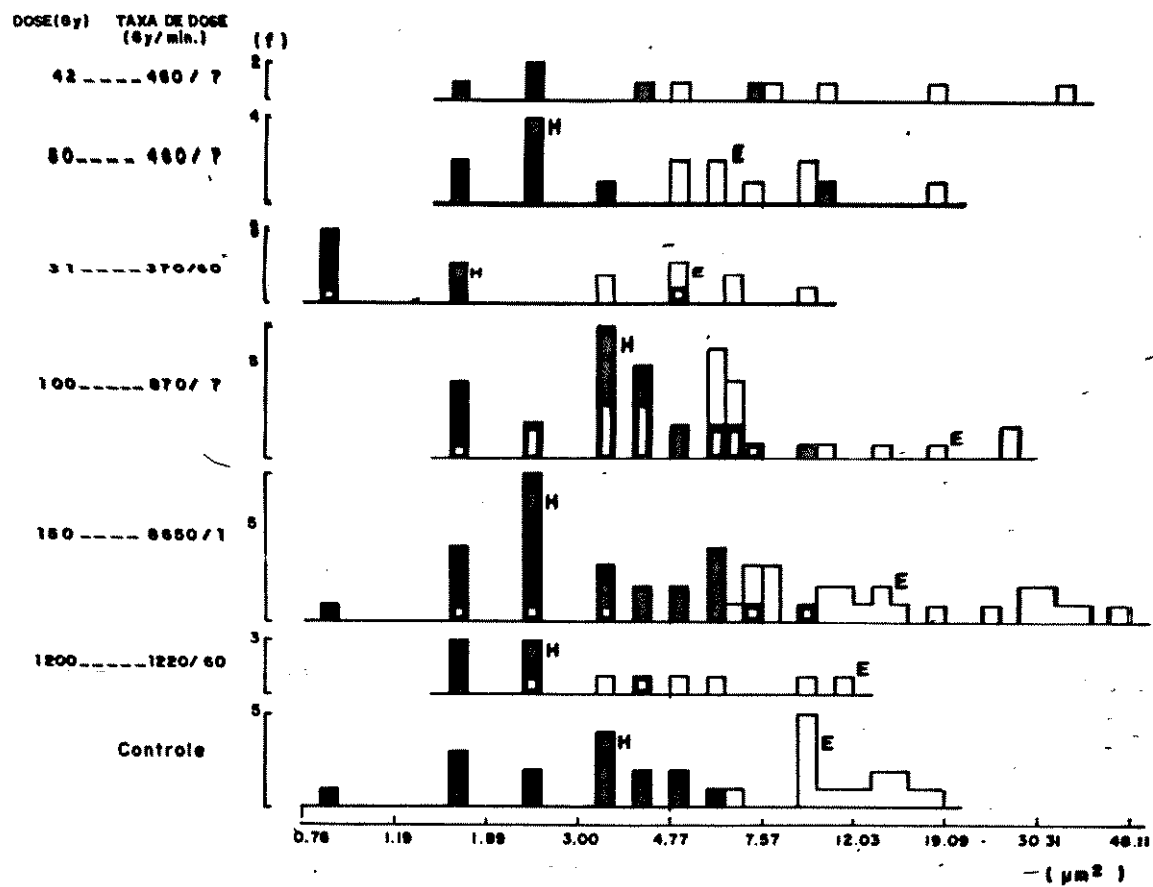
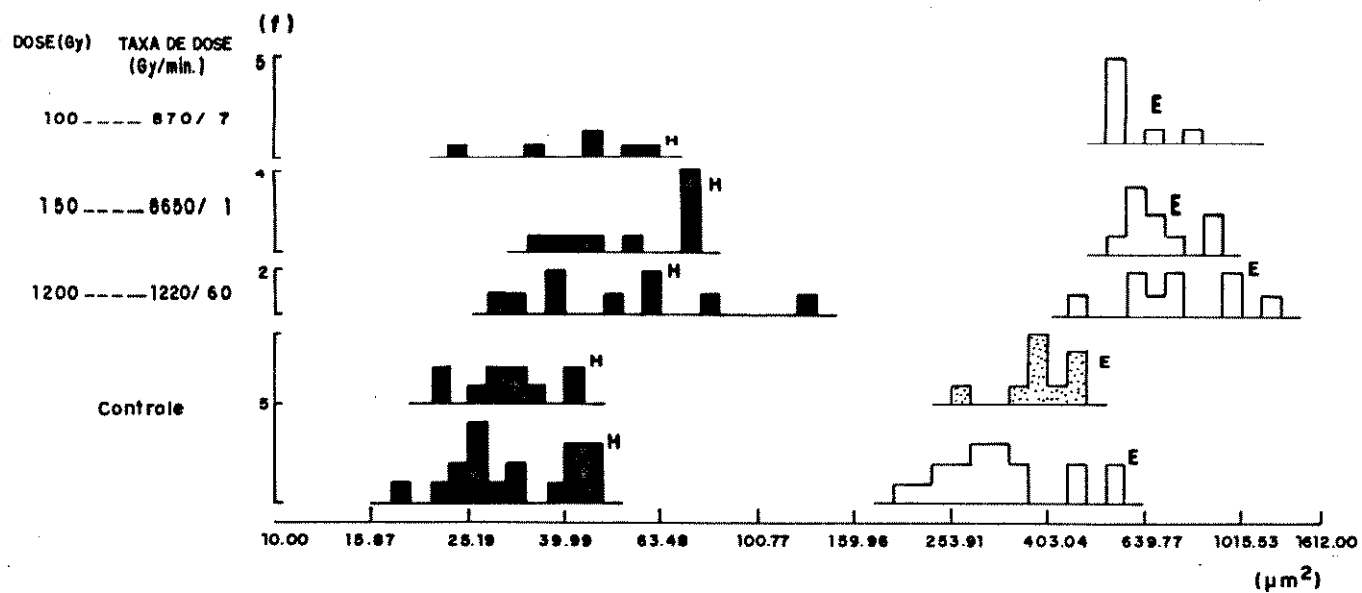


Figura 51- Histogramas de frequência dos valores de hetero- e eucromatina em separado de núcleos poliplóides dos túbulos de malpighi dos insetos controle e dos irradiados, com fenótipo nuclear caracterizado como "gigante". (f= frequência, ■ H= heterocromatina, □ E= eucromatina de núcleos com um cromocentro e ▣ E= eucromatina de núcleos com vários cromocentros).



Discussão

Curvas de sobrevivência

A irradiação do corpo todo com doses subletais como as que foram usadas nas ninfas de *Triatoma infestans* Klug, induziu a redução da expectativa de vida desses insetos, que em geral morrem mais precocemente quando comparados aos insetos controle.

Pelos resultados apresentados pelas curvas de sobrevivência podemos concluir que a dose de radiação que mais afetou a sobrevivência foi 1200Gy (1220Gy/60min), sendo essa a maior dose que os triatomíneos foram submetidos. Com as doses de 150Gy (taxas de doses de: 8650/1, 1770/5, 1340/7 e 1010/9 Gy/min, respectivamente) o decaimento das curvas foi semelhante nas várias condições, embora tenha havido uma condição em que se usou uma alta taxa de dose (8650Gy/1min) em relação às demais. Uma hipótese para explicar isso, baseia-se no fato de haver uma taxa de dose ótima na qual a maior quantidade de danos são produzidos. Se isso é verdade, taxas substancialmente maiores ou menores do que a ótima podem não exibir diferenças significativas (Yanders, 1959). Com as doses de 31Gy e 100Gy os insetos apresentaram porcentagem de sobrevivência maior que os insetos controle, supondo-se uma variação individual da população, embora a dose de 31 Gy tenha tido a mais baixa taxa de dose (370Gy/60 min). Resultados semelhantes foram obtidos por Domarco (1977) que, trabalhando com *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais* e *Rhyzopertha dominicana*, concluiu que taxas de doses de radiação gama muito baixas ou elevadas aumentavam a esperança de vida desses insetos.

A diminuição dos efeitos radiológicos com baixas taxas de doses pode ter como causa um reparo dos efeitos a nível molecular eliminando os radicais livres, que são produzidos pela radiação gama, quer seja por vias de aniquilamento fisiológico, combinando-os com outras substâncias, quer seja por sua expulsão através da membrana celular, por serem substâncias estranhas às células. Para Bond e colaboradores (1965), essas relações empiricamente observadas entre efeito e taxa de irradiação resultam de muitos mecanismos que, operando em todos os níveis da organização celular nos tecidos, não possibilitaram uma análise detalhada até o momento.

Um fator físico causado pela radiação ionizante que poderia interferir nos seus efeitos, seria a LET (transferência linear de energia). Como neste trabalho foi usado apenas um tipo de radiação, a gama, o efeito esperado da LET foi o mesmo para todos os insetos irradiados, salvo o fato das variações individuais nas respostas às diferentes doses de radiação. Variações individuais na resposta a outras condições de "stress" foram ressaltadas para *Triatoma infestans* nos trabalhos de Kubrusly (1984) sobre a ação tóxica de metais pesados e também por Andrade & Mello (1987), Amaral (1988) e Mello (1988), quando esses insetos foram submetidos ao jejum.

O decréscimo na expectativa de vida produzida pela radiação não é devido à indução de doenças específicas, mas é ela a responsável pela mortandade, visto que apressa o começo de certas doenças associadas com a senescência (Clark & Rubin, 1961; Lindop & Rotblat, 1961; Sato e colaboradores, 1981). Sob esse ponto de vista, a radiação pode ser considerada como um fator de envelhecimento, embora não idêntico ao envelhecimento natural, pois a idade relativa na qual essas doenças ocorreriam não é a mesma na população controle e nas irradiadas.

O fato de algumas das ninfas de 5º estadio, quando irradiadas, terem mudado para o estágio adulto não foi de todo inesperado, pois também ocorreu nos insetos controle, embora o tempo requerido para realizar essas mudas tenha sido diferente para os insetos controle (20 dias) e para os irradiados (2 a 17 dias). Baldwin (1961) realizando alguns experimentos com *Rhodnius*, observou que quando esses insetos eram irradiados e alimentados imediatamente, uma e quatro semanas após a irradiação, o tempo requerido pelos insetos alimentados quatro semanas após a irradiação para realizarem as mudas foi mais próximo do controle que nos demais intervalos. Atribuiu o processo de reparo como causa desse fenômeno, já que as células da epiderme podem ser mantidas em condição interfásica por longos períodos após a irradiação, quando os insetos não são alimentados.

Fenótipos nucleares/Áreas nucleares

Os dados do presente trabalho indicam a ocorrência de alterações na estrutura nuclear das células dos túbulos de Malpighi, traquéias, musculatura e testículos de ninfas de 5º estadio de *Triatoma infestans* Klug, após exposição das mesmas à radiação ionizante.

Foram observados nas diferentes condições experimentais fenótipos nucleares distintos dos já descritos para insetos controle (Mello, 1971, 1975, 1978a, b, 1983), e por serem alterados foram atribuídos como sendo induzidos pela radiação. Ao lado dos fenótipos alterados, os fenótipos nucleares normais também se fizeram presentes em todas as condições experimentais.

Núcleos em que, a despeito do fenótipo nuclear normal, observou-se ligeira redução de área, foram detectados na condição que menos afetou a sobrevivência dos insetos (370Gy/60min).

O fenótipo nuclear caracterizado por vacuolização que leva à degeneração foi observado quase que exclusivamente na condição mais drástica de radiação (1220Gy/60min). Isto tanto para os núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi e de células de nutrição dos testículos, como para os espermatócitos de 2ª ordem. Não foi observado nas traquéias e musculatura.

Das condições experimentais testadas, tanto aquelas que promovem para o *Triatoma infestans* a morte a mais curto prazo (1220Gy/60 min), como aquelas em que a sobrevivência é menos afetada (870Gy/7min, 370Gy/60 min), mostram aparecimento do fenótipo caracterizado por aumento da área ocupada pela heterocromatina (ou pelo menos redu-

ção da intensidade de sua resposta à reação de Feulgen). Isto foi demonstrado para os núcleos poliplóides dos túbulos de Malpighi, núcleos diplóides de traquéias e musculatura e em células no "estágio confuso" (testículos).

A descompactação da heterocromatina encontrada neste trabalho, sugere a interferência da radiação no grau de empacotamento da cromatina, que é um dos fatores de diferenciação dos dois tipos cromatínicos (Mello, 1983). Esse fenótipo sugere uma tentativa de colocar em ação um genoma silente, como já aventado para o próprio *Triatoma infestans*, sob condições de jejum (Mello, 1983) e em outros sistemas, como em *Rhynchosciara americana* submetidas a choques de temperatura ou infectadas por microsporídeos ou ainda sob certas condições de cultura das glândulas salivares (Dias e colaboradores, 1969; Simões e colaboradores, 1975; Simões & Cestari, 1982) e em células tumorais de mama (Sandritter e colaboradores, 1974).

Picnose nuclear foi detectada nos testículos nas condições em que a sobrevivência do inseto foi mais e menos afetada, porém nos túbulos de Malpighi apenas na condição 660Gy/15min, nas células diplóides não foi constatada. Este fenótipo é uma consequência da ação deletéria da radiação ionizante, conduzindo à necrose nuclear simultânea ou causadora de morte celular. A radiação ionizante induz quebras internucleossômicas e subsequente acumulação desses fragmentos, o que tem sido correlacionado morfológicamente com a picnose nuclear. Com isso as células perdem a habilidade para executarem suas funções específicas e como consequência ocorre necrose ou morte celular (Swingle & Cole, 1968; Hanson, 1979; Borisova e colaboradores, 1987).

Nas condições em que a radiação parece menos afetar a sobrevivência dos espécimes de *Triatoma infestans* testados, não se detectou o fenótipo nuclear gigante nos túbulos de Malpighi. Este, por outro lado, foi razoavelmente frequente quando a condição experimental era a que mais reduzia a sobrevivência do inseto. Este fenótipo já foi encontrado em situações de "stress fisiológico" como o jejum prolongado (Mello, 1983; Andrade & Mello, 1987; Amaral, 1988) e com a administração de metais pesados (Kubrusly, 1984). Neste fenótipo, o alto nível de plóidia estaria relacionado com endomitoses mais o fenômeno de fusão nuclear (Mello & Raimundo, 1980; Mello, 1983; Andrade & Mello, 1987). Admite-se que o fenômeno de fusão nuclear nesses insetos seja em muito facilitado pelo fato da maioria de suas células serem binucleadas (Mello, 1978a; Mello & Recco-Pimentel, 1987), pela baixa taxa de seu metabolismo, representando um mecanismo de sobrevivência para os insetos em condições de "stress" (Wigglesworth, 1967; Mello & Vidal, 1979; Mello, 1988) e a presença muito frequente de vírus nos seus vários tecidos (Dolder & Mello, 1978; Mello & Dias, 1981; Mello & Pudney, 1987).

Com relação à ocorrência de micronúcleos picnóticos e micronúcleos palidamente corados nos testículos de *Triatoma infestans*, deve-se mencionar que o seu aparecimento foi condicionado pela condição de radiação que mais afetou a sobrevivência dos insetos (1220Gy/60 min). Os micronúcleos picnóticos indicam alta lise e os palidamente corados derivam de fragmentos produzidos por aberrações cromossômicas induzidas pela radiação ionizante (Heddle & Carrano, 1977). Micronúcleos induzidos por radiação tem sido encontrados mesmo em vegetais. Rizzoni e colaboradores (1987) verificaram uma alta frequência de mi-

cronúcleos em *Vicia faba* com baixas doses de raios-X. Soran e colaboradores (1981) fizeram um estudo da ultraestrutura dos dois tipos de micronúcleos encontrados em *Vicia faba*: micronúcleos heterocromatínicos e eucromatínicos. No primeiro tipo havia grande quantidade de heterocromatina e sua ultraestrutura corrobora a hipótese de Heddle & Carrano (1977), de que os micronúcleos pouco corados seriam fragmentos acêntricos dos cromossomos com muita heterocromatina descompactada. Já os micronúcleos eucromatínicos, tem muita eucromatina, contudo sua origem não foi esclarecida por esses autores.

É interessante lembrar que nas placas metafásicas meióticas analisadas se detectou migração cromossômica com atraso, possivelmente levando a perdas cromossômicas, provavelmente promovidas por quebras de microtúbulos, o que facilitaria o aparecimento de um dos tipos de micronúcleos.

A radiação causa esterilidade nos machos, porém essa nunca é observada imediatamente após a exposição, porque as espermatídes e espermatozóides são altamente radioresistentes quando comparados com as espermatogônias. Os espermatozóides de *Triatoma infestans* não foram afetados pela radiação gama, uma vez que o fenômeno anisotrópico de birrefringência do DNA nos núcleos e dos constituintes macromolecularmente orientados das caudas se apresentaram sem alterações.

Com base na análise de alterações nos fenótipos nucleares e dados cariométricos, pôde-se constatar que, para uma condição de radiação mais drástica, os danos a nível nuclear mais expressivos se verificam em núcleos poliplóides. No caso dos testículos, no entanto, são também originados micronúcleos e os espermatócitos de 2a. ordem podem aparecer degenerados. Ainda no que se refere às gônadas mascu-

linas, mesmo em condições menos deletérias são provocadas picnoses nucleares, um dano celular sério, aparentemente também frequente em núcleos de ploidia baixa. No geral, no entanto, pode-se afirmar que os núcleos poliplóides são mais radiosensíveis do que os núcleos diplóides, podendo ser essa sensibilidade diferencial atribuída à (1) maior capacidade de reparo do DNA nos núcleos de ploidia menor ou (2) a alteração nos tipos de danos cromossômicos produzindo morte celular nos núcleos poliplóides somáticos e mesmo em parte da população celular germinativa. Esses dados estão de acordo com as pesquisas de Radford & Hodgson (1987), os quais demonstraram essa sensibilidade diferencial em cultura de células V79 de hamster. Trabalhos de Suciu (1985, 1986) no entanto, sugerem que as células mais radiosensíveis são aquelas que apresentam um volume nuclear menor, enquanto as radioresistentes ao contrário, têm um volume nuclear maior. Esse autor sugere que a radiosensibilidade teria como causa a marginalização da cromatina e picnose nuclear, sendo essa dificultada pela dispersão do DNA em volumes nucleares maiores. Talvez este evento explicasse os achados para os núcleos da linhagem germinativa de *Triatoma infestans*, mas de qualquer forma não seria válido para os resultados referentes às células somáticas.

Fenômenos de descompactação (heterocromatina) ou de compactação cromatínica (eucromatina) ou nuclear ocorreram na maioria das condições de radiação testadas, para núcleos com diferentes graus de ploidia em *Triatoma infestans*.

Partindo de conhecimentos anteriores de Smerdon & Lieberman (1978) e de Bodell & Cleaver (1981) de que a cromatina pode sofrer alterações conformacionais durante o reparo de danos ao DNA induzidos

pela radiação UV, podemos afirmar que a radiação gama atuou na cromatina das células de *Triatoma infestans* fazendo com que esta sofresse alterações conformacionais. As alterações conformacionais foram então diferentes nos dois tipos cromatínicos, isto é, houve compactação e descompactação das áreas eucromáticas e heterocromáticas, respectivamente.

Quando se compara a distribuição das áreas eucromáticas e heterocromáticas nos diferentes tipos de fenótipos nucleares dos insetos irradiados, observamos que as áreas eucromáticas foram mais susceptíveis em praticamente todas as condições experimentais do que as áreas heterocromáticas. Portanto, esses dados estão de acordo com os trabalhos de Chiu e colaboradores (1982b, c), o qual preconizam que as regiões de cromatina transcricionalmente ativas são mais susceptíveis à ação da radiação graças a sua conformação mais relaxada.

O conteúdo de proteínas tem uma função protetora importante na susceptibilidade aos danos no DNA induzidos pela radiação. Segundo dados de Mello (1976) sabemos que a cinética de hidrólise das hetero- e eucromatinas de células epiteliais dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* (tanto daquelas com um cromocentro quanto daquelas com vários cromocentros) diferem em função dos tipos e/ou conteúdo de proteínas não histônicas presentes nas mesmas, o que pode ser uma evidência indireta de diferentes atividades transcricionais dessas cromatinas. Uma provável explicação para a descompactação da heterocromatina é de que para reparar os danos causados pela radiação gama genes que normalmente não são expressos sejam colocados em ação. Esta hipótese já foi levantada por Mello (1983) para o *Triatoma infestans* quando submetido ao jejum. Além disso, o conteúdo de proteínas não histônicas

para a heterocromatina não só desempenhariam papel estrutural, mas poderiam estar também relacionadas com a possível atividade de transcrição de algumas regiões codificadoras de seu DNA (Mello, 1979).

Finalmente, se os fenômenos de ligeira alteração no estado de empacotamento da cromatina (eucromatina ou heterocromatina) a longo prazo provocarão efeitos deletérios, somente experimentos futuros, usando condições moderadas de radiação e examinando os insetos após intervalos mais longos de tempo poderão responder.

Conclusões

1- As curvas de sobrevivência estabelecidas para ninfas de *Triatoma infestans* indicaram que as doses de radiação gama usadas contribuíram para o decréscimo da expectativa de vida dos triatomíneos, com exceção dos indivíduos sob as doses de radiação de 31 e 100Gy (370/60 e 870/7Gy/min, respectivamente) que apresentaram sobrevivência até maior que os controles. A dose de radiação de 1200Gy (1220Gy/60 min) foi a que mais drasticamente afetou a sobrevivência dos insetos.

2- O efeito da taxa de dose foi muito importante na determinação da radiosensibilidade das ninfas de *Triatoma infestans*. Com taxas de doses muito altas 150Gy (8650Gy/1min) ou muito baixas 31Gy (370Gy/60min), os insetos irradiados tendem a apresentarem uma sobrevivência semelhante ou superior a dos insetos controle, respectivamente.

3- Foram detectadas alterações fenotípicas nucleares nas células poliplóides dos túbulos de Malpighi e em células de nutrição, em células diplóides da musculatura e traquéias, e em diferentes etapas da diferenciação das células germinativas masculinas de *Triatoma infestans* após serem submetidos a diferentes condições de radiação gama. Tais alterações refletem degeneração nuclear e/ou celular ou etapas moderadas de desorganização da estrutura cromatínica.

4- A aparente variação das frequências dos vários tipos de fenótipos nucleares em túbulos de Malpighi, numa mesma condição experimental, sugere a existência de discrepâncias individuais nítidas.

Isso indica que há indivíduos mais e menos sensíveis aos efeitos da radiação.

5- Os fenótipos nucleares alterados foram os seguintes: vacuolizado, picnótico, com heterocromatina descompactada, com compactação da área eucromática simultânea ou não à descompactação da heterocromatina, gigante e micronúcleo.

6- O fenótipo vacuolizado ocorreu sobremaneira nos núcleos poliplóides, sendo promovido na condição de radiação mais drástica (1220Gy/60min).

7- Picrose nuclear não foi constatada nas células somáticas diplóides, mas sim na linhagem germinativa masculina, em condições de radiação em que a sobrevivência do inseto foi mais e menos afetada. Células poliplóides só mais raramente apresentaram este fenótipo. Provavelmente, então, a degeneração de células poliplóides aconteça mais por vacuolização.

8- Os fenótipos que envolvem alteração no estado de empacotamento cromatínico foram detectados nos vários tipos celulares estudados e em condições de radiação seja mais drásticas ou menos deletérias. A descompactação das áreas heterocromáticas quando presente nestes tipos nucleares estaria possivelmente envolvida com a tentativa de expressão gênica de áreas cromatínicas usualmente inativas. As áreas eucromáticas são mais susceptíveis aos efeitos da radiação gama do que as áreas heterocromáticas por serem regiões de cromatina transcricionalmente ativas.

9- Núcleos gigantes foram vistos unicamente nos túbulos de Malpighi e em condições de radiação que mais reduziram a sobrevivência dos insetos.

10- Micronúcleos apareceram somente na linhagem germinativa e sob condições de radiação de 1200Gy (1220Gy/60min), 31Gy (370Gy/min) e 100Gy (870Gy/min), formados por degeneração ou quebra de cromossomos.

11- Dentre as situações analisadas em que se constatou a presença de espermatozóides, estes não parecem terem sido afetados pela radiação gama, visto que exibiam o fenômeno anisotrópico da birrefringência..

12- Para se determinar se as alterações aparentemente mais ligeiras no estado de empacotamento cromatínico provocarão efeitos deletérios a longo prazo são necessários mais experimentos em condições moderadas de radiação e tempo mais longo para se proceder o exame citológico dos espécimes. No caso de aí se constatar efeitos sérios, talvez fosse até uma condição recomendada para propósitos de controle do inseto.

13- As áreas eucromáticas são mais susceptíveis aos efeitos da radiação gama do que as áreas heterocromáticas, visto que são regiões de cromatina transcricionalmente ativas.

Resumo

Alterações induzidas por radiação gama em fenótipos nucleares definidos em termos de padrões de organização cromatínicos e de áreas nucleares e de heterocromatina foram estudadas em ninfas machos de 5º estadio de *Triatoma infestans*. Os órgãos escolhidos para análise citológica foram túbulos de Malpighi, musculatura, traquéias e testículos. As doses de radiação gama empregadas para se realizar as análises citológicas foram escolhidas com base na construção de curvas de sobrevivência para as ninfas. Os preparados foram submetidos à reação de Feulgen e banda C e as áreas nucleares foram determinadas por cariometria.

As curvas de sobrevivência dos insetos irradiados indicaram que a radiação induz redução na expectativa de vida desses insetos; a dose de radiação que mais drasticamente afetou a sobrevivência dos insetos foi 1220Gy (1220/60min). Este decréscimo na expectativa de vida pode ter tido como causa um envelhecimento precoce e o fator físico da radiação, que é a taxa de dose.

Os resultados mostraram alterações nos fenótipos nucleares das células analisadas, sendo caracterizado como: vacuolizado, picnótico, de heterocromatina descompactada, com compactação da área eucromática simultânea ou não à descompactação da heterocromatina, gigante e micronúcleos. Além disso, foram também constatados os fenótipos normais usuais.

Com relação as alterações nos fenótipos nucleares encontrados nos insetos irradiados, seriam decorrentes de modificações na própria fisiologia cromatínica e/ou corresponderiam a etapas de um processo necrótico celular associado aos efeitos da radiação. A ação mais drástica observada a nível somático, correspondeu ao aparecimento do fenótipo vacuolizado, que afetou os núcleos poliplóides e foi produzido em condições de radiação que mais reduziram a sobrevivência dos inseto. Na linhagem germinativa, por outro lado, alterações sérias apareceram sob a forma de picrose e micronúcleos, a primeira em condições drásticas ou brandas de radiação e a segunda apenas em condições mais drásticas.

As áreas eucromáticas mostraram-se mais susceptíveis aos efeitos da radiação que as áreas heterocromáticas, já que são regiões mais ativas da cromatina.

Não se descarta a hipótese de que as alterações aparentemente mais brandas em compactação cromatínica nos vários tipos celulares possam induzir a prazo mais longo, alterações severas na sobrevivência dos insetos.

SUMMARY

Alterations induced by gamma radiation in nuclear phenotypes as defined in terms of chromatin organization patterns and nuclear and heterochromatin areas, were studied in 5th instar male nymphs of *Triatoma infestans*. Malpighian tubules, muscles, tracheae and testes were the organs chosen for cytological analyses. The choice of the gamma radiation doses used to carry out the cytological analyses was based on the survival curves constructed for the nymphs. The preparations were submitted to the C-banding technique and to the Feulgen reaction. The nuclear areas were determined by karyometry.

The survival curves for the irradiated insects indicated that the radiation induced a decrease in the insect life expectancy. The radiation dose which most severely affected the insect survival was that of 1220Cy (1220Cy/60min). The decrease in life expectancy could have been caused by premature ageing and the physical factor of the radiation, which is the rate of dosage.

The results showed alterations in the nuclear phenotypes of the cells analysed. New phenotypes appeared showing being characterized as: vacuolization, picknosis, unravelling of the heterochromatin, condensation of the euchromatin area either simultaneously with the unravelling of the heterochromatin. Giant nuclei and micronuclei were also detected. In addition, the usual normal phenotypes were also found.

With respect to the alterations of the nuclear phenotypes found in the irradiated insects, these would be a result of modifications in the actual chromatin physiology and/or would correspond to stages in a cellular necrotic process associated with the effects of irradiation. At the somatic level, the most drastic action observed was the appearance of nuclear vacuolization, which affected the polyploid nuclei and was produced under those conditions of radiation which most reduced insect survival. On the other hand, in the male germinative cell line, serious alterations appeared in the form of pycknosis and micronuclei, the former under both drastic and mild conditions of radiation and the latter under only the most drastic conditions.

The euchromatic areas were shown to be more susceptible to the effects of radiation than the heterochromatin areas, since the former are the more active chromatin regions.

The hypothesis that the apparently milder alterations in chromatin condensation of the various cellular types could induce severe alterations in insect survival on a long term basis, cannot be neglected.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, M.J.L.V. Concentração eletrolítica crítica da cromatina em animais submetidos ao jejum. Campinas, 1988. 75p. Tese (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

ANDRADE, C.G.T.J. & MELLO, M.L.S. Phenotypes and number of Malpighian tubule nuclei in *Triatoma infestans* Klug along development and starvation. Rev. Bras. Genet. 10, (3): 449- 457, 1987.

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. & MELLO, M.L.S. Mg^{2+} dependent ATPase activity investigated in heterochromatin and euchromatin and nucleoli of *Triatoma infestans*. Rev. Brasil. Genet., IX, (2): 223- 229, 1986.

BALDWIN, W.F. & SALTHOUSE, T.N. Latent radiation damage and synchronous cell division in the epidermis of an insect. I. Non-reversible effects leading to local radiation burns. Radiat. Res., 10: 387- 396, 1959a.

BALDWIN, W.F. & SALTHOUSE, T.N. Latent radiation damage and synchronous cell division in the epidermis of an insect. II. Reversible effects in burns repair. Radiat. Res. 10: 397- 399, 1959b.

BALDWIN, W.F. Latent radiation damage and synchronous cell division in the epidermis of an insect. III. Spontaneous reversal of effects leading to delay during mitosis. Radiat. Res., 14: 426- 431, 1961.

BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a sub-família Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). V. Anatomia do testículo e espermiocitogênese do *Triatoma infestans*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 54: 135-175, 1956.

BERGONIE, J. & TREBONDEAU, L. Interpretation de quelques resultats de la radiotherapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. Compt Rend., 143: 983, 1906.

BODELL, W.J. & CLEAVER, J.E. Transient conformation in chromatin during excision repair of ultraviolet to DNA. Nuclei Acids Res., 9 (1): 203- 213, 1981.

BOND, V.P.; FLIEDNER, T.M. & ARCHAMBEAU, J.O. Mammalian radiation lethality: a disturbance in cellular kinetics. A.I.B.S. New York and London, Academic Press. 340p. 1965.

BORISOVA, E.A.; CHUKHLOVIN, A.B.; SEILIEV, A.A.; ZHERBIN, E.A.; ZHIVOTOVSKY, B.D. & HANSON, K.P. Degree of chromatin fragmentation and frequency of nuclear pyknosis in Percoll-fractionated thymocytes of irradiated rats. Int. J. Radiat. Biol., 51 (3): 421- 428, 1987.

CARCAVALLO, R.V.; REWALD, E. & CARABAJAL, C.A. Alteraciones embriologicas en huevos irradiados de *Triatoma infestans* y su posterior evolucion. Proceedings of a Symposium on the Sterility Principle for Insect Control or Eradication. IAEA: 503- 512, 1971.

CHIU, S.M. & OLEINIK, N.L. The sensitivity of active and inactive chromatin to ionizing radiation-induced DNA strand brekage. Int. J. Radiat. Biol., 41 (1): 71- 77, 1982a.

CHIU, S.M. & OLEINIK, N.L. Resistance of the nucleossomal organization of eucaryotic chromatin to ionizing radiation. Radiat. Res., 91: 516- 532, 1982b.

CHIU, S.M.; OLEINIK, N.L.; FRIEDMAN, L.R. & STAMBROOK, P.J.

Hypersensitivity of DNA in transcriptionally active chromatin to ionizing radiation. Biochim.Biophys. Acta, 699: 15- 21, 1982c.

CHIU, S.M.; FRIEDMAN, L.R.; SONAKY, N.M.; XUE, L.Y. & OLEINIK, N.L. Nuclear matrix proteins are crosslinked to

transcriptionally active gene sequences by ionizing radiation. Radiat. Res., 107: 24- 38, 1986.

CLARK, A.M. & MITCHELL, C.J. Effect of X-rays upon haploid and diploid embryos of *Habrobracon*. Biol. Bull., 103: 170- 177, 1952.

CLARK, A.M. & RUBIN, M.A. The modification by X-irradiation of the life span of haploids and diploids of the wasp, *Habrobracon* sp. Radiat. Res., 15: 244- 253, 1961.

COLOMBO, G. Different sensitivities to X-irradiation with respect to stage of development of the embryos of *Locusta migratoria*. Att. Acad. Nazl. Lincei, Rend., Classe Sci. Fis., Mat. Nat., 26: 583, 1959.

CONGER, A.D. & JOHNSTON, A.H. Polyploidy and radiosensitivity. Nature, 178: 271, 1956.

DIAS, M.; PAVAN, C. & BASILE, R. Effects of a virus and microsporidian infections in chromosomes of various tissues of *Rhynchosciara angela* (NONATO & PAVAN, 1951). Rev. Bras. Biol., 29: 191- 206, 1969.

DOLDER, H. & MELLO, M.L.S. Virus like particles in the malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. Cell mol. Biol., 23: 299- 310, 1978.

DOMARCO, R.E. Influência da taxa de dose de radiação gama sobre a radiosensibilidade de cinco espécies de insetos. Piracicaba, 1977, 68 p. Tese (Mestrado). ESALQ- USP.

ERDMAN, J.E. Analyses of the differential radiosensitivity of developing reproductive tissues in *Habrobracon juglandis* to ionizing radiation. Int. J. Radiat. Biol., 3: 183, 1961.

FREIRE-MAIA, N. Radiogenética humana. São Paulo, Edgard Blucher Ltda, 1972.

GAREL, A. & AXEL, R. Selective digestion of transcriptionally active ovalbumin gene from oviduct nuclei. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 3966- 3970, 1976.

COMES, R.A. Unidades utilizadas no estudo das radiações. Ciência Hoje, 7(20): 6, 1988.

GÓMEZ-NÚÑEZ, J.C.; GROSS, A. & MACHADO, C. Las radiaciones gamma y el comportamiento reproductivo del Rhodnius prolixus macho. Acta Científ. Venezolana, 15 (3): 97-104, 1964.

GROSCH, D.S. & HOPWOOD, L.E. Biological effects of radiations. 2 ed. London, Academic Press, 1979.

HANSON, K.P. Molecular mechanisms of the interphase death of lymphoid cells. Radiobiologia, 19: 814- 820, 1979.

HEDDLE, J.A. & CARRANO, A.V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. Mutat. Res., 44: 63- 69, 1977.

HENSHAW, P.S. & HENSHAW, C.T. Changes in susceptibility of Drosophila eggs to X-rays. 1- A correlation of changes in

radiosensitivity with stages in development. Radiology,
21: 239, 1933.

KORNBERG, R.D. Chromatin structure: a repeating unit of
 histones and DNA. Science, 184: 868- 871, 1974.

KORNBERG, R.D. Structure of chromatin. Ann. Rev. Biochem.,
46: 931- 954, 1977.

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

LEA, D.E. Actions of radiation on living cells. 1 Ed. New
 York, Cambridge University Press, 1962.

LINDOP, P.J. & ROTBLAT, J. Shortening of life and causes of
 death in mice exposed to a single whole-body dose of
 radiation. Nature, 189 (4765): 645- 648, 1961.

MATHIS, D.J. & GOROVSKY, M.A. Subunit structure of rDNA-
 containing chromatin. Biochemistry, 15: 750- 755, 1976.

MEE, L.K.; ADELSTEIN, S.J. & STEIN, G. Radiolysis of
 chromatin extracted from cultured mammalian cells:

production of alkali-labile strand damage in DNA. Int. J. Radiat. Biol., 33 (5): 443- 455, 1978.

MEE, L.K. & ADELSTEIN, S.J. Radiolysis of chromatin extracted from cultured mammalian cells: formation of DNA-protein cross links. Int. J. Radiat. Biol., 36 (4): 359- 366, 1979.

MELLO, M.L.S. Nuclear behavior in the malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv. Hemiptera). Cytologia, 36: 422- 49, 1971.

MELLO, M.L.S. Feulgen- DNA values and ploidy degrees in the malpighian tubes of some triatomids. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol., 8 (2): 101- 107, 1975.

MELLO, M.L.S. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero e eucromatinas. Campinas, 1976. 206p. Tese (Livre Docência). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

MELLO, M.L.S. Dados citoquímicos sobre histonas de heterocromatinas e eucromatinas do *Triatoma infestans* Klug. Rev. bras. Pesq. med. Biol., 10 (5): 305- 309, 1977.

MELLO, M.L.S. Computer analysis of stained chromatin on malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) Mikroskopie, 34 (9/10): 285- 299, 1978a.

MELLO, M.L.S. Computer assessment of chromatin patterns on some germ line cells of the hemipteran, *Triatoma infestans* Klug. Acta Histochem., 62: 254- 262, 1978b.

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

MELLO, M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. Histochem. J., 15: 739- 751, 1983.

MELLO, M.L.S. Different affinity for clupein in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. Rev.Brasíl.Genet., 8 (4): 755-758, 1985.

MELLO, M.L.S. Nuclear cytochemistry and polarization microscopy of the spermatozoa of *Triatoma infestans* Klug. Z. mikrosk. anat. Forsch., 101 : 245-250, 1987.

MELLO, M.L.S. Nuclear fusion and heterochromatin unravelling in response to starvation in *Triatoma infestans*. Submetido à publicação, 1988.

- MELLO, M.L.S. & DIAS, C.A. Detection of viral particles in the salivary glands of the hemipteran *Triatoma infestans* Klug. Cell_molec._Biol., 22 (5): 459- 466, 1981.
- MELLO, M.L.S. & PUDNEY, M. Polyploidization of the BTC.32 cell line from *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). Genetica, 74: 131-136, 1987.
- MELLO, M.L.S. & RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in the malpighian tubes of a blood-sucking hemipteran. Cytologia, 45: 203- 209, 1980.
- MELLO, M.L.S. & RECCO-PIMENTEL, S.M. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. Cytobios, 52: 175- 184, 1987.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Fusão nuclear e padrões cromatínicos em tubos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug. In: Encontro de Geneticistas Paulistas, 2. São José do Rio Preto, 1979. Resumos p. 26- 27.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular. São Paulo, Edgard Blucher, 1980.
- NATARAJAN, A.T. Poliploidy and radiosensitivity. J.Indian Bot.Soc., 43 (2): 283- 293, 1963.

O'BRIEN, R.D. & WOLFE, L.S. Nongenetic effects of radiation. In: ----- & -----, Radiation, Radioactivity, and Insects. London Academic, 1964. cap. 2, p. 23- 54.

OKUNO, E. Radiação ionizante. Ciência Hoje, 7 (40): 20-21, 1988.

PACKARD, C. The relationship between age and radiosensitivity of *Drosophila* eggs. Radiology, 25: 223, 1935.

PALKOVITS, M. & FISCHER, J. Karyometric investigations: Budapest, Akad. Kiadó, 1968.

PINCU, M.; CALLISEN, H. & NORMAN, A. DNA content of micronuclei in human lymphocytes. Int. J. Radiat. Biol., 47 (4): 423- 432, 1985.

PRASAD, K.N. Handbook of radiobiology. Florida, CRE Press Inc., 1984.

RADFORD, I.R. & HODGSON, G.S. Effect of ploidy on the response of V79 cells to ionizing radiation. Int. J. Radiat. Res., 51 (5): 765- 778, 1987.

RANDI, M.A.F. & MELLO, M.L.S. Dados preliminares sobre a ação de cobre a nível celular em testículo de *Triatoma infestans* Klug. XII Congr. Brasil. Zool., Campinas, UNICAMP 1985, p.77-78.

RIZZONI, M.; VITAGLIANO, E.; MARCONI, M.C.; SOTTILI, A. & GUSTAVINO, B. Micronucleus induction by low doses of X-rays in *Vicia faba* roots tips. Mutat. Res., 176: 205-209, 1987.

SANDRITTER, W.; KIEFER, G.; SALM, R.; MOORE, G.W.; GRIMM, H. & KIEFER, R. DNA in heterochromatin: cytophotometry pattern recognition image analysis among cell nuclei in duct epithelium and in carcinoma of the human breast. Beitr. Pathol., 151: 87- 96, 1974.

SATO, F.; SASAKI, S.; KAWASHIMA, N. & CHINO, F. Late effects of whole or partial body X-irradiation on mice: life shortening. Int. J. Radiat. Biol., 39 (6): 607-615, 1981.

SCHNEDL, W. Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. Chromosoma, 34: 448- 454, 1971.

SCHRADER, F. & LEUCHTENBERGER, C. A cytochemical analysis of the functional interrelation of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). Exptl. Cell Res., 1: 421- 452, 1950.

SCHREIBER, G. & PELLEGRINO, J. Eteropícnosi di autossomi come possibile meccanismo di speciazione. Sci. Genet., 3: 215- 226, 1950.

SCHREIBER, G.; SILVA, F.P.; RESENDE, E.S.; CAVENAGHI, T.M. & CARVALHO, H.F. DNA synthesis in the spermatogenesis of Triatomida. Rev. bras. Pesq. med. Biol., 1: 245- 256, 1968.

SCHREIBER, G.; BOGLIOLO, A.R. & DE PINHO, A.C. Cytogenetics of Triatominae: caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes. Rev. Brasil. Biol., 32: 255- 263, 1972.

SHERLOCK, I.A. Vetores. In: Brener, Z & Andrade, Z. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, 1979. cap.2, p.42-88.

SIMÕES, L.C.G.; AMABIS, J.M. & CESTARI, A.N. Puffs in the heterochromatin in chromosomes of Rhynchosciara americana. Ciênc. Cult. São Paulo, 27: 159- 161, 1975.

SIMÕES, L.C.G. & CESTARI, A.N. Cromossomos politênicos: sistemas experimentais "in vivo" e "in vitro". Ciênc. Cult. São Paulo, 34: 480- 488, 1982.

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

SMERDON, M.J. & LIEBERMAN, M.W. Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA repair synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75: 4238- 4241, 1978.

SORAN, V.; SPÂRCHEZ, C.; CRACIUM, C. & URAY, Z. Observations on micronuclei ultrastructure within broad bean (*Vicia faba*) meristem after gamma ray radiation. Cytologia, 46: 381-386, 1981.

SPARROW, A.H. Relationship between chromosome volume and radiation sensitivity in plant cells. In: Williams & Wilkins, ed. Cell.Radiat.Biol. Baltimore, 1965. p.199.

SUCIU, D. Protein composition of cells, nuclei and chromatin from some radiosensitive and radioresistant mouse tissues. Int. J. Radiat. Biol., 39 (6): 641- 647, 1981.

SUCIU, D. Tightly-bound proteins from cells nuclei of some radiosensitive and radioresistant mouse tissues. Int. J.

SUCIU, D. Morphometric study of the interphase nucleus in some radiosensitive and radioresistant mammalian cells. J. Theor. Biol., 113: 599- 609, 1985.

SUCIU, D. Nuclear volume and chromatin organization in some radiosensitive and radioresistant mammalian cells. J. Theor. Biol., 117: 587- 596, 1986.

SUCIU, D. & BOJAN, O. Autodigestion of chromatin in some radiosensitive and radioresistant mouse cells. Role of proteolysis and endonucleolysis. Int. J. Radiat. Biol., 39 (3): 273- 279, 1981.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exptl. Cell Res., 75: 304- 306, 1972.

SWINGLE, K.F. & COLE, L.J. Early effects of ionizing radiations on nucleic acids. In: Ebert, M & Howard, A. Current Topics in Radiation Research. Amsterdam, 1968. v.4, p.189- 250.

UMANSKY, S.R. & DOMASHENKO, A.D. The effect of gamma-radiation on the interaction of DNA with nuclear non-histone proteins. Int. J. Radiat. Biol., 32 (4): 361-

WEINTRAUB, H. & GROUDINE, M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. Science, 193: 848-856, 1976.

WIGGLESWORTH, V.B. The principles of insect physiology. London, Mathuen and Co., 6 ed., 1965, p.741.

WIGGLESWORTH, V.B. Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of Rhodnius (Hemiptera). J. Cell Sci., 2: 603-612, 1967.

YANDERS, A.F. The effect of dose-rate on genetic damage from fast electrons in Drosophila sperm.. Radiat. Res., 10: 30- 36, 1959.

ZERBIN, .A. & CHUKHLOVIN, A.B. Possible association of membrane and nuclear changes in gamma-irradiated rat thymocytes. Int. J. Radiat. Biol., 45 (2): 179- 183, 1984.

ZHIVOTOVSKY, B.D.; ZVONAREVA, N.B. & HANSON, K.P. Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole-body X-irradiation. Int. J. Radiat. Biol., 39 (4): 437- 440, 1981.