

Maria Luiza S. Mello

ESTUDO CITOQUÍMICO E CITOFÍSICO QUANTI-
TATIVO DE ALGUMAS HETERO- E EUCROMATINAS

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Ce-
lular do Instituto de Bio-
logia da UNICAMP para obten-
ção do grau de Livre-Docente
em Biologia Celular.

Campinas

1976

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"Para mi solo recorrer los caminos que tienen corazón,
cualquier camino que tenga corazón.

Por ahí yo recorro, y la única prueba que vale es
atravesar todo su largo. Y por ahí yo recorro mirando,
mirando, sin alinto."

(Carlos Castañeda)

A

Benedicto de Campos Vidal,

pela Oportunidade

A presente pesquisa pôde ser realizada graças à doação de equipamentos e outros auxílios pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 68/748, 70/371 e 75/827), Conselho Nacional de Pesquisas (Proc. 12607/69) e Fundação Alexander von Humboldt.

AGRADECIMENTOS

Ao Setor de Saneamento Ambiental de Campinas, em especial ao Dr. Olavo Rocha e Silva, e ao Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela doação dos exemplares de Triatoma infestans.

Ao Professor Doutor Benedicto de Campos Vidal, pelas críticas, sugestões e constante estímulo durante as diversas etapas de elaboração e execução do presente trabalho.

Aos Professores Doutores Nelson Machado e Fernando Curado, pelas facilidades concedidas no Centro de Computação da UNICAMP e pela elaboração dos programas relacionados à citofotometria por duplo comprimento de onda.

Ao Professor Doutor Rubens Murillo Marques, pelas facilidades permitidas no Departamento de Estatística do Instituto de Matemática da UNICAMP.

Ao Professor Eduardo Ballester, por coordenar o ajuste das curvas de hidrólise à função de Bateman.

Ao Professor Doutor C. Pavan, pela leitura de parte do manuscrito.

À biologista Srta. Maria Christina Malta Pretti, pela reprodução esmerada dos gráficos utilizados, bem como pela realização de algumas ampliações fotográficas.

Aos acadêmicos Alberto da Costa Caseiro Filho e Arthur Carlos de Carvalho, pela realização de ampliações fotográficas de alguns gráficos e micrografias e pelo auxílio técnico em parte da citoquímica para proteínas.

À Universidade Estadual de Campinas, onde o presente trabalho foi executado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL	29
MÉTODOS	30
1. Grau de estabilidade das hetero- e eucromatinas frente à hidrólise ácida e espectros de absorção avaliados no material submetido à reação de Feulgen	30
1.1. Preparo das lâminas. Reação citoquímica	30
1.2. Micro-espectrofotometria	33
A. "Varredura manual"	34
B. Duplo comprimento de onda	36
1.3. Construção das curvas de hidrólise	40
2. Características da basofilia das hetero- e eucromatinas após diferentes procedimentos citoquímicos ..	42
2.1. Preparo das lâminas. Reações citoquímicas	42
2.1.1. Solução corante em diversos pH	42
2.1.2. A basofilia após tratamento com soluções de corante adicionadas de íons Ba^{++} e UO_2^{++}	43
2.1.3. A basofilia após processos de denaturação-reassociação	43
2.1.4. Ação da metilação sobre as cromatinas diferentemente fixadas	45
2.2. Micro-espectrofotometria	45
3. Propriedades anisotrópicas das cromatinas submetidas às reações de basofilia	46
4. Citoquímica para proteínas nucleares básicas e totais	46
4.1. Reações citoquímicas	46
4.2. Micro-espectrofotometria	49

RESULTADOS	51
1. Grau de estabilidade frente à hidrólise ácida e espectros de absorção das cromatinas submetidas à reação de Feulgen	51
1.1. Dados Feulgen-DNA obtidos após citofotometria por "varredura manual"	51
1.2. Dados Feulgen-DNA obtidos após citofotometria por duplo comprimento de onda	62
1.3. Correlação dos dados Feulgen-DNA obtidos pelos dois métodos citofotométricos	70
1.4. Curvas de hidrólise	76
1.5. Análise do perfil das curvas espectrais de Feulgen	88
2. A basofilia das cromatinas após diferentes procedimentos citoquímicos	90
3. Propriedades anisotrópicas das cromatinas submetidas às reações de basofilia	99
4. Alguns dados sobre as proteínas básicas e totais do complexo nucleoproteico nuclear	107
DISCUSSÃO	114
CONCLUSÕES	172
RESUMO	179
SUMMARY	181
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183
APÊNDICE 1 - Função de Bateman	i

Heterochromatin is somewhat like human society -it is a complex subject and simple slogans are inadequate to characterize it. For every apparent rule it is possible to cite an exception . The only solution is to become acquainted with its many and varied facets. The unsolved mysteries it presents remain the source of its fascination.

(David Comings)

I N T R O D U Ç Ã O

Desde a primeira vez que o termo heterocromatina foi introduzido em Citogenética e Biologia Celular, sentiu-se a importância de seu significado e ao mesmo tempo a dificuldade em se lhe atribuir uma definição totalmente não ambígua (Schultz, 1948; Comings, 1972b).

A conotação de heterocromatina, como a conhecemos atualmente, ganhou impulso a partir de uma série de estudos iniciados por Heitz, entre 1928 e 1935. Tais estudos demonstraram que a cromatina de partes específicas de certos cromossomos permanecia condensada durante a interfase, retendo as propriedades de colorabilidade intensa características de cromossomos metafásicos. A cromatina que apresentava esse comportamento foi então denominada heterocromatina, em contraposição à cromatina que se apresentava difusa, não compactada, durante a mesma interfase (eucromatina) (Heitz, 1928, 1931, 1933 e 1934). Segundo Comings (1972b), é importante salientar que a heterocromatina, apresentando heteropiconose (pyknosis (gr.) = condensação) durante toda a interfase, pode ser distinta da condensação não específica que quaisquer cromossomos de um núcleo venham eventualmente a sofrer no período G_1 (ou G_0) de alguns ciclos celulares.

Equivocamente, e contrariando o critério de Heitz, alguns pesquisadores (Frenster, 1965, 1969; Davies, 1968) têm considerado heterocromatina como termo equivalente à heteropiconose.

nose, gerando muita confusão no sentido de atribuir unicamente à heterocromatina propriedades que seriam válidas também à eucromatina (Comings, 1972b). Tal é o caso de se considerar como heterocromatina a cromatina heteropiconótica de linfócitos maduros (Frenster, 1965, 1969) ou de eritrócitos nucleados de aves (Davies, 1968). Estas células são especiais, relativamente dormentes e com 80% ou mais de cromatina heteropiconótica, o que representa um grande excesso em relação ao seu real conteúdo de heterocromatina. Quando expostas à ação de fitohemaglutinina ou por hibridação com células HeLa (Harris, 1970), muita dessa heteropiconose desaparece, à medida que as células vão atravessando os períodos S e G₂ do ciclo celular.

Logo após os primeiros trabalhos de Heitz, provou-se que a heterocromatização era de larga ocorrência tanto em plantas como em animais. Observou-se ser ela muito frequente em cromossomos sexuais e nos cromossomos supernumerários de algumas espécies (Brown, 1966). Em alguns casos, uma heterocromatização progressiva poderá estar aliada a um processo patológico geral, como acontece em certas células tumorais (Harbers, 1969).

Estruturas heterocromáticas individuais podem se combinar entre si, formando outras, maiores, geralmente denominadas cromocentros; estas combinações algumas vezes aparecem como aglomerados amorfos, nos quais os componentes individuais não mais se distinguem.

A heterocromatina pode ocupar praticamente toda a extensão de um cromossomo, como é o caso clássico do cromossomo Y

de Drosophila (Heitz, 1933) ou de um dos X dos mamíferos XX (Ohno et al., 1959; Lyon, 1961 a 1968). Em outros casos, pode se restringir à proximidade do centrômero (heterocromatina centromérica) e/ou às extremidades de um ou mais cromossomos (heterocromatina telomérica) e/ou à vizinhança do organizador do nucléolo.

Num mesmo indivíduo pode-se observar a heterocromatina ocupando regiões cromossômicas que diferem conforme o órgão considerado. Isto foi comprovado nos cromossomos politênicos de larvas do díptero Rhynchosciara, através dos estudos de Pavan e Breuer (1952), quando ficou demonstrado que a disposição da heterocromatina de cromossomos de glândulas salivares diferia daquela verificada nos tubos de Malpighi. Por outro lado, comparando-se os padrões de heterocromatização ao longo do desenvolvimento larval das glândulas salivares, tubos de Malpighi e intestino de sciarídeos, observou-se que, enquanto em Rhynchosciara milleri a presença de um cromocentro típico, formado por um aglomerado de partes heterocromáticas dos vários cromossomos, era constatada nas larvas jovens e nas bem desenvolvidas, tal não se verificava em Rhynchosciara americana. Nesta última, o cromocentro era detectado somente nas jovens (Pavan e Breuer, 1954; Pavan, 1966).

Trabalhos de Muller e colaboradores (1937), Hinton (1942) e Pavan (1946) demonstraram não existir equivalência entre o volume relativo da heterocromatina nos cromossomos mitóticos e nos politênicos de um mesmo díptero. Assim, Hinton (1942) verificou que certa região heterocromática do cromossomo II de

Drosophila melanogaster, que no cromossomo mitótico equivale a 1/5 de seu comprimento, se reduz a uma simples faixa de menos de 1/100 do comprimento do cromossomo politênico (Pavan, 1966). Coisa semelhante foi verificada em Drosophila nebulosa, onde grande parte heterocromática do cromossomo X e todo o cromossomo Y se reduzem a apenas alguns grânulos heterocromáticos nas células das glândulas salivares (Pavan, 1946). Situação inversa, em determinado loco cromossômico, foi verificada por Breuer e Pavan (1955) em cromossomos politênicos de Rhynchosciara americana (Pavan, 1966).

Quando os primeiros conceitos de Heitz sobre heterocromatina foram publicados, já se tinha uma informação considerável sobre a distribuição dos genes nos cromossomos de Drosophila. O cromossomo Y, apontado como heterocromático por Heitz (1933) já havia sido considerado relativamente inerte por Bridges (1916) e Muller (1918). Em 1932, Muller e Painter notaram que o cromossomo X de Drosophila continha um segmento comparável ao Y, heterocromático e geneticamente inativo. Este fato veio fortalecer a idéia então defendida por Heitz de que a heterocromatina estaria ligada a uma "passividade gênica", inatividade ou mesmo ausência de genes. Outros autores consideravam que a heterocromatina teria menos genes por unidade de comprimento do que a eucromatina (Hannah, 1951). Contudo, num estudo intensivo do problema, Cooper (1949, 1952 e 1959) encontrou que, nos cromossomos politênicos cuja porcentagem em heterocromatina é muito reduzida, a proporção de genes por unidade de comprimento é a mesma da encontrada na eucromatina. Segundo es-

te autor, os elementos heterocromáticos dos cromossomos politênicos de Drosophila não são geneticamente inativos nem depauperados em genes e podem mesmo ser encarados como um sistema genético especializado ou um caso especial de diferenciação cromossômica. O cromossomo Y de Drosophila melanogaster, apesar de bastante degenerado, retém ainda algumas funções importantes. A presença nesse cromossomo de genes para fertilidade, reportada por Stern (1929), foi confirmada por Brosseau (1960), o qual determinou ser o seu número de pelo menos sete. A função desses genes estaria relacionada com a maturação e motilidade dos espermatozoides (Saphir, 1930; Shen, 1932). Cooper (1949, 1952) verificou que há um certo número de locais em que os cromossomos X e Y podem parear. Além disso, e provavelmente como consequência desse comportamento, demonstrou-se que 20% dos letais induzidos no cromossomo X por meio de irradiação com 3000r a 4000r sobrevivem na presença do Y e não sobrevivem em combinações XO (Lindsley et al., 1960).

Nos mesmos termos acima, embora se considere inativo um dos cromossomos X de mamíferos XX, que se apresenta heterocromático e constitui a cromatina sexual (Lyon, 1961, 1962, 1963 e 1968), essa inatividade não deve ser total, pois se o fosse, os indivíduos com aneuploidias do X seriam normais.

Também na heterocromatina centromérica de um dos cromossomos do tomate foi relatada a localização de um determinado gene funcionante, por Khush e colaboradores (1965).

Ainda no que se refere a exemplos de possíveis atividades gênicas em heterocromatinas, deve também ser mencionado

aqui o caso da heterocromatização em pulgões coccídeos machos ("mealy bugs") principalmente do gênero Planococcus. Nestes, o lote cromossômico paterno (Brown e Nelson-Rees, 1961) se torna heterocromático relativamente cedo no desenvolvimento embrionário, ou seja, no estágio de blástula (Hughes-Schrader, 1948). Em alguns tecidos, porém, esses cromossomos podem retornar à condição eucromática e presumivelmente à atividade gênica (Nur, 1967). Na linhagem germinativa, o lote cromossômico paterno, heterocromático, continua como um componente geneticamente inativo e é finalmente eliminado quando da formação da célula sexual (Hughes-Schrader, 1935; Brown e Nur, 1964). A sequência meiótica é invertida (Schrader, 1921; Chandra, 1962), ou seja, na 1ª. divisão todos os cromossomos se dividem equacionalmente e na 2ª. divisão os cromossomos homólogos se segregam, os eucromáticos movendo-se para um polo e os heterocromáticos para outro. Os derivados meióticos contendo os cromossomos eucromáticos se desenvolvem em espermatozoides. Os que contêm os cromossomos heterocromáticos degeneram. Portanto, apenas o lote eucromático materno é transmitido pelos pais a seus filhos e filhas. Nas filhas o lote paterno permanece eucromático, mas nos filhos se torna heterocromático.

O comportamento das cromatinas desse pulgão levou Brown (1966) a considerar as heterocromatinas mais como um estado fisiológico cromossômico do que como substâncias que diferissem em relação às eucromatinas.

O desenvolvimento das técnicas que fazem uso dos rádio-isótopos em Biologia Celular contribuiu em muito para que

o "dogma" da inatividade gênica da heterocromatina se tornasse abalado. Foi comprovada a incorporação de precursores radioativos, como a uridina tritiada, em algumas heterocromatinas, salientando para estas, em particular, o fenômeno de transcrição, ou seja, a atividade gênica manifestada através da cópia do DNA por um RNA a ele complementar. No "DNA-body" da prófase meiótica de fêmeas do grilo Acheta domesticus, que, segundo o autor que o descreveu, nada mais é do que uma heterocromatina (Lima-de-Faria, 1969; Lima-de-Faria et al., 1969) e onde ocorre amplificação gênica para cístrons ribossômicos, comprovou-se fenômeno de transcrição no início do diplonema (Lima-de-Faria et al., 1968; Lima-de-Faria, 1969).

O que parecia evidente, após análise de heterocromatinas de diferentes proveniências era de que, em alguns casos, elas poderiam ser mesmo consideradas não codificadoras (Siegger et al., 1970, 1971; Walker, 1971b; Lyon, 1974). Se não o fossem totalmente, pelo menos o seriam quase totalmente. Em outros casos, porém, seriam total ou parcialmente inativas, podendo, portanto, expressar sua atividade em algum momento do desenvolvimento, sob determinadas condições fisiológicas celulares.

A classificação das heterocromatinas em constitutivas e facultativas (Brown, 1966) reflete uma das primeiras tentativas de se separar e definir esses dois grandes grupos. A heterocromatina constitutiva foi considerada como aquela que estaria ocorrendo em porções homólogas de ambos cromossomos homólogos e viria a ser mais tarde catalogada como não codificadora (Walker, 1971b; Lyon, 1974). A facultativa estaria presente em

apenas um dos cromossomos do par e seria inativa, ou seja, não responderia a estímulos de transcrição por causa de alterações na estrutura "super-coiling" da desoxirribonucleoproteína (Lyon, 1974). Poderia, contudo, apresentar expressão gênica em alguma ocasião do desenvolvimento, como no caso da heterocromatização de um dos cromossomos X dos mamíferos XX. Em termos do conceito de Brown (1966) de que as heterocromatinas representariam um estado fisiológico mais do que uma substância, a heterocromatina facultativa forneceria uma oportunidade ímpar para se estudar os mesmos genes em dois diferentes estados. Ainda segundo Brown (1966), a heterocromatina facultativa, embora integrada com o desenvolvimento, sofreria alguma influência extracromossômica que iria estabelecer qual o cromossomo a ser heterocromatizado. Nos mamíferos, em que o X ativo é escolhido no embrião, chegou-se mesmo a sugerir que uma partícula ou episomo se ligaria ao acaso ao cromossomo que permaneceria ativo (Grumbach et al., 1963). Segundo Brown (1966) e Brown e Nur (1964), no caso do pulgão Planococcus citri, o comportamento dos cromossomos paternos estaria provavelmente condicionado antes que estes se combinassem com os do óvulo. Mais recentemente, Chandra e Brown (1975) consideram que nos pulgões "mealy bugs" e nos mamíferos placentários XX ocorreria um processo de "imprinting" cromossômico, ou seja, um dos dois cromossomos homólogos seria geneticamente predeterminado a funcionar diferentemente do outro num estágio subsequente do desenvolvimento. Segundo Sager e Kitchin (1975), no fenômeno de determinação do sexo dos pulgões "mealy bugs" estaria implicada a atuação de en-

zimas dos sistemas M-R do óvulo (M-R = sistemas de modificação e restrição do DNA)*. E levantaram a seguinte hipótese : os cromossomos do óvulo seriam modificados e os do espermatozóide não modificados; se os cromossomos de origem paterna encontrassem a enzima de modificação antes da enzima de restrição, no citoplasma do óvulo, eles seriam também modificados e o embrião se desenvolveria numa fêmea. Se os cromossomos do espermatozóide encontrassem primeiro a enzima de restrição, o embrião se desenvolveria num macho e a partir da 5a. à 8a. divisão de clivagem, o lote cromossômico restrito se tornaria heterocromático . Nas fêmeas, as enzimas de modificação seriam ativas já na linhagem germinativa e conseqüentemente os cromossomos do núcleo do óvulo seriam sempre modificados. A seguir também as enzimas de restrição se tornariam ativas. Sager e Kitchin (1975) consideram que a heterocromatização do lote paterno desses pulgões (mealybugs)

*A base molecular deste fenômeno, pelo menos em sistemas bacterianos, é a presença de sequências nucleotídicas específicas no DNA, com 4 a 8 nucleotídeos de comprimento, que são reconhecidas pelas enzimas de modificação e restrição. Se a enzima de modificação agir primeiro, através de metilação do DNA, irá proteger o sítio de reconhecimento do ataque da enzima de restrição, uma endonuclease. Se o DNA não for modificado, ambos seus fios poderão ser clivados endonucleoliticamente pela enzima de restrição no sítio de reconhecimento ou perto dele. Assim, o sistema M-R é um meio poderoso de eliminação de DNAs particulares (Arber e Linn, 1969; Meselson et al., 1972; Boyer, 1974).

seja induzida e mantida por genes ativos do lote eucromático e seja um estado reversível sob controle do desenvolvimento. De fato, em alguns tecidos desse inseto ocorre reversão da heterocromatização (Nur, 1967). Segundo Sager e Kitchin (1975) tal evento resultaria de alterações reversíveis na sequência nucleotídica dos sítios de reconhecimento do sistema M-R, conforme proposto por Scarano (1967) e Holliday e Pugh (1975), ou de mudanças programadas nas atividades dos genes controladores da heterocromatização, localizados no lote cromossômico eucromático, durante o desenvolvimento. Para o caso da heterocromatização facultativa de um dos cromossomos X dos mamíferos placentários XX, Brown e Chandra (1973) propõem um modelo que envolve o seguinte sistema de controle: um sítio sensetivo localizado em um autossomo de origem materna ativaria um sítio receptor (no cromossomo X), fenômeno que por sua vez regularia o processo da heterocromatização. A ativação de um sítio sensetivo produziria uma "entidade informacional" (Brown e Chandra, 1973), que ativaria o sítio receptor em um dos dois cromossomos X ao acaso, impedindo-o de se tornar heterocromático (ou inativo), protegendo-o, portanto, da heterocromatização. Do fato de que apenas um cromossomo X permanece ativo num indivíduo diplóide, não importa se o número de cromossomos X for maior do que 2, parece haver evidência de que a "entidade informacional" seria uma única macromolécula específica (Brown e Chandra, 1973). Segundo Chandra e Brown (1975), o sítio sensetivo do autossomo paterno estaria sujeito a um processo de "imprinting", provavelmente já quando penetrasse no óvulo. Sager e Kitchin (1975) levantaram a hipótese de que enzimas do sistema M-R- estariam envolvidas

nesse processo, resultando na disponibilidade de um e não de outro loco homólogo para ativação num tempo programado do desenvolvimento.

Se fôssemos compelidos a classificar todas heterocromatinas, com precisão, em facultativas ou constitutivas pelo conceito de Brown (1966), haveria dificuldade em assim se proceder em muitos casos (Comings, 1972b). Como exemplo pode ser citado o caso do cromossomo X de gafanhotos e grilos, bem como do cromossomo X da maioria dos mamíferos durante a espermatogênese (na ovogênese os dois X são eucromáticos (Ohno et al., 1961, 1962)). Em ambos os casos o cromossomo X não representa heterocromatina constitutiva no sentido de que a heterocromatização não lhe é permanente. Não é também heterocromatina facultativa no sentido estrito de que, sendo um cromossomo hemizigoto, não há oportunidade de que apenas um dos homólogos se torne represso. Contudo, como se aproxima mais deste tipo em termos funcionais, Comings (1972b) propõe classificar essa heterocromatina como semi-facultativa. Também com referência ao cromossomo Y humano e de alguns outros mamíferos, cuja heterocromatização permanente faz com que seja classificado como heterocromatina constitutiva, apesar de seu estado hemizigoto, o mesmo autor discorda de tal nomenclatura. Segundo ele haveria^m características diferenciais entre o tipo de heterocromatização do Y e o das heterocromatinas constitutivas. Durante o paquíema o cromossomo Y se apresenta intimamente associado ao X, formando uma vesícula sexual e apresentando ambos um tipo de condensação cromatínica "mais frouxa", diferindo da natureza altamente compactada das heterocromatinas constitutivas

(Comings e Okada, 1972). Em vista dessa situação, Comings (1972b) propõe que se venha a classificar também como semifacultativa a heterocromatização do Y nas células da linhagem germinativa.

Uma das características das heterocromatinas a ser acrescentada às até agora mencionadas, foi conhecida somente a partir do fim dos anos 50. Lima-de-Faria (1959a,b), usando procedimentos radioautográficos, relatou que o DNA do cromossomo sexual X heterocromático do gafanhoto Melanoplus differentialis replicava fora de fase em relação ao DNA dos cromossomos restantes, ou seja, relativamente tarde no período S. Posteriormente, o mesmo autor iria frisar que na realidade é mais saliente o fato da replicação da heterocromatina se estender por mais tempo do que a da eucromatina, terminando, portanto, mais tarde do que esta, do que dizer simplesmente que a heterocromatina inicia a réplica mais tarde, pois no início de tal fenômeno as diferenças com a eucromatina não são assim tão drásticas (Lima-de-Faria, 1969; Lima-de-Faria e Jaworska, 1968). As regiões eucromáticas aparecem marcadas antes, porém são logo seguidas pelas heterocromáticas. (De certa forma o material genético dos segmentos heterocromáticos, replicando-se mais tarde ou demoradamente do que o das regiões eucromáticas, se tornaria disponível para a liberação de uma informação genética ocasional (heterocromatina facultativa) num tempo diferente daquele da eucromatina (Lima-de-Faria, 1959).)

A fim de investigar se o mesmo fenômeno ocorria em outros organismos, Lima-de-Faria (1959a) expôs folhas do Secale

cereale à timidina tritiada. Neste vegetal, todos cromossomos apresentam heterocromatina em ambos os lados do cinetocore e na maioria das extremidades cromossômicas ("knobs")(Lima-de-Faria,1952).Também nesta espécie ficou provado que a heterocromatina replicava seu DNA num tempo diferente daquele verificado para a eucromatina(Lima-de-Faria,1959a).Desde então o mesmo fenômeno foi detectado em diversos organismos. Os únicos relatos de que a replicação do DNA poderia ocorrer primeiro na heterocromatina e a seguir na eucromatina são os de Tanaka(1965,1969) para a orquídea Spiranthes sinensis e o de Tatuno e colaboradores (1970) para uma briófito, Pellia neesiana. No primeiro caso, inclusive, a heterocromatina sofre descondensação durante a replicação do DNA, o que não se observou ainda visualmente em outras heterocromatinas(Comings,1967b; Klinger et al.,1967).

Numa revisão efetuada em 1969,Lima-de-Faria relata que os mamíferos, incluindo o homem, fornecem o maior número de exemplos que confirmam a regra de replicação "tardia" na heterocromatina.No caso do Microtus agrestis, em que se distingue heterocromatina constitutiva e facultativa, demonstrou-se que a última replica mais cedo do que a primeira (Schmid e Leppert, 1969).

À semelhança de Brown (1966) e Nur (1967),Lima-de-Faria(1969) considera as heterocromatinas estados cromossômicos especiais e não substâncias diferentes, citando como exemplo o caso do cromossomo X do Melanoplus macho,que não é heterocromático na espermatogônia,porém se torna assim nos espermatócitos.Não se deve,contudo, esquecer que a heterocromatina

desse cromossomo sexual se aproxima daquela do tipo facultativa (Comings, 1972b).

Em 1967, Berendes e Keyl encontraram que em Drosophila hydei a replicação da heterocromatina não acontecia sempre que ocorria a da eucromatina, havendo certa independência entre os dois processos. Usualmente a heterocromatização em núcleos ganglionares poliplóides desse inseto progride através de menos passos de replicação do que os da eucromatina. Também no hemíptero Triatoma infestans, vetor da doença de Chagas, e que apresenta núcleos somáticos altamente poliplóides (Mello, 1969, 1970, 1971 e 1975), a replicação da heterocromatina em tubos de Malpighi não acompanha a da eucromatina em mesma proporção, nos últimos instares do desenvolvimento ninfal (Mello, 1969, 1970 e 1971).

Por sua vez, a heterocromatina facultativa do pulgão do gênero Planococcus geralmente replica seu DNA em leve assincronia com o do lote eucromático (Baer, 1965; Huang, 1971). Porém, nos núcleos poliplóides da cápsula celular que envolve os testículos, Nur (1966) descobriu haver um número poliplóide de cromossomos eucromáticos, mas um número haplóide de cromossomos heterocromáticos. Como o número de cromossomos eucromáticos formava uma série geométrica baseada no seu número haplóide, foi proposto que os cromossomos eucromáticos estariam sofrendo diversos ciclos de replicação e endomitose, enquanto os heterocromáticos permaneceriam não replicados. Essas observações de Nur (1966) foram confirmadas por experimentos com rádio-isótopos e medidas citofotométricas Feulgen-DNA (Lorick, 1970). Este pare

ce se tratar de um exemplo único de controle de síntese de DNA em que um lote inteiro de cromossomos (no caso, heterocromáticos) permanece não replicado, enquanto o outro sofre repetidos ciclos de replicação (Lorick, 1970).

Com o avanço das técnicas bioquímicas e radioautográficas e sua aplicação ao estudo das heterocromatinas, determinou-se, primeiramente em mamíferos, que a heterocromatina constitutiva é um tipo cromatínico especial (Lee e Yunis, 1970 e 1971a,b), que apresenta em sua composição um DNA altamente repetitivo (Yasminéh e Yunis, 1969, 1970; 1971a,b; Arrighi et al., 1970; Yunis e Yasminéh, 1970; Yunis et al., 1971) não transcrito em RNA (Hsu, 1962; Flamm et al., 1969; Sieger et al., 1970, 1971) e que poderia não estar diretamente implicado na elaboração de produtos gênicos úteis em termos pós-transcritivos (Walker, 1971a; Yunis e Yasminéh, 1971; Comings, 1972b; Zuckerkandl, 1974). O DNA da heterocromatina constitutiva do camundongo em particular é composto primariamente por um DNA satélite (Pardue e Gall, 1970) que representa acima de 70% do DNA satélite total do genoma (Lee e Yunis, 1971a,b).

Numa série de experimentos muito bem conduzidos, Sieger e colaboradores (1971) demonstraram que a heterocromatina constitutiva, em contraste com a facultativa, contém um DNA transcritivamente não codificador e não representa um estado represso ou inativo de cromatina. Tais afirmações se basearam nos achados de que a heterocromatina constitutiva do Microtus agrestis não incorpora uridina tritiada (Sieger et al., 1970, 1971), porém incorpora actinomicina D tritiada com uma velocidade

de igual ou mesmo maior do que a da eucromatina (Sieger et al., 1971). De antemão, sabia-se também que a heterocromatina facultativa do tipo encontrado nos pulgões machos do gênero Planococcus incorporava muito menos actinomicina do que a eucromatina (Berlowitz et al., 1969). Ficou demonstrado, portanto, que a ligação da actinomicina D à heterocromatina constitutiva refletia a propriedade de não codificação desta última e não estava necessariamente conectada com uma função repressora das proteínas histônicas ou com condensação cromatínica (Sieger et al., 1971). Com relação a este último aspecto deve-se mesmo ressaltar que em células em cultura do Microtus agrestis a heterocromatina constitutiva é relativamente descondensada e pouco visível; contudo, com experimentos de radioautografia, é possível detectar-se blocos dessa cromatina, que não incorporam ³H-uridina, representando os locais ocupados pela heterocromatina geneticamente não codificadora, porém não visivelmente condensada (Sieger et al., 1970).

Portanto, nos dias atuais, não se pode considerar que a heterocromatina constitutiva seja um "estado" cromossômico como Brown (1966), Nur (1967) e Lima-de-Faria (1969) o admitiram indiscriminadamente para todas as heterocromatinas. Classifica-se atualmente a heterocromatina constitutiva como aquela geralmente não codificadora, com funções outras que transcrição, e a heterocromatina facultativa como cromatina codificadora inativa, não respondendo a estímulos para transcrição por alterações talvez em sua estrutura quaternária, o que, no entanto, pode ser reversível, como no caso do pulgão "mealybug" (Walker, 1971b;

Berlowitz, 1974; Lyon, 1974). A heterocromatina facultativa possui a razão de bases do DNA não significativamente diferente daquela da eucromatina (Berlowitz, 1974) e pode ser considerada como um estado cromossômico (Lyon, 1974).

Estudos de hibridização "in situ" mostraram localização de DNA satélite repetitivo na heterocromatina constitutiva centromérica, bem como em outras regiões heterocromáticas dos cromossomos de Drosophila (Hennig et al., 1970; Jones e Robertson, 1970; Rae, 1970; Gall et al., 1971), Rhynchosciara (Eckhardt e Gall, 1971), do Microtus agrestis (Arrighi et al., 1970), do camundongo comum (Jones, 1970), da salamandra (MacGregor e Kezer, 1971) e do homem (Arrighi e Hsu, 1971; Hsu e Arrighi, 1971). Porém nem todo DNA da heterocromatina constitutiva é satélite ou altamente repetitivo (Comings e Mattoccia, 1972a). Com base em experimentos de ultracentrifugação, demonstrou-se na heterocromatina constitutiva altamente purificada do camundongo a ocorrência de DNA da banda principal, com uma densidade de flutuação ("buoyant density") significativamente diminuída, sugerindo riqueza em AT; esse DNA, porém, não é repetitivo (Mattoccia e Comings, 1971). Tem sido também observado, após ultracentrifugação analítica, que em algumas heterocromatinas ocorre significante concentração de um DNA que ocupa um ombro da curva obtida ("heavy shoulder DNA"), rico em GC, não repetitivo (Comings, 1971; Comings e Mattoccia, 1972b). Por outro lado, também, nem todo DNA repetitivo se localiza na heterocromatina. Estudos de cinética de renaturação do DNA de eucromatina de replicação rápida do hamster chinês indicam que

nesse DNA há tantas sequências repetitivas quanto as do DNA de replicação tardia (Comings e Mattoccia, 1970). Estudos semelhantes com DNA isolado de eucromatina mostram a mesma cinética de renaturação do DNA isolado de heterocromatina (Comings e Mattoccia, 1972a).

Assim, apesar do fato de que DNA satélite esteja geralmente localizado na heterocromatina constitutiva, a observação de que outros tipos de DNA não repetitivo também constituem o DNA da heterocromatina e de que nem todo DNA repetitivo estaria localizado na fração heterocromática indica que os termos DNA repetitivo e heterocromatina constitutiva não devem ser considerados como equivalentes (Comings, 1972a,b).

Em adição ao conhecimento bioquímico dos tipos de DNA encontrados na heterocromatina constitutiva, admite-se que os tipos de proteínas histônicas presentes na heterocromatina não difiram sensivelmente dos da eucromatina (Comings, 1967a; Pallotta et al., 1970). Como única exceção, deve-se mencionar que às vezes, em histonas da heterocromatina, a razão grupos SS/SH poderá aparecer aumentada em relação à da eucromatina (Harbers, 1969; Gorovsky e Eckhardt, 1970). Por outro lado, considera-se existirem diferenças com relação às proteínas não histônicas presentes nos complexos nucleoproteicos (Comings, 1972b). Tais conclusões baseadas em ensaios bioquímicos, já haviam sido mesmo aventadas por Frenster (1965, 1969). Contudo este autor utilizara em seus estudos o linfócito maturo, considerando heterocromatina todo o conjunto de uma cromatina heteropicnótica que na realidade contém em seu interior grande porcen

tagem de uma eucromatina repressa. O acerto de seu relato, contudo, no que se refere às proteínas histônicas, com certeza se deve às diferenças em conteúdo e tipos desses componentes observados quando se compara eucromatina geneticamente ativa com heterocromatina ou mesmo com eucromatina repressa (Alfert, 1958; Frenster, 1965; Kaye e McMaster-Kaye, 1966; Dolbeare e Koenig, 1968; Burdick e Himes, 1969; Himes et al., 1969; Zirkin, 1970). Existe também evidência de que as proteínas não histônicas presentes na eucromatina difiram daquelas presentes na heterocromatina em termos alostéricos (Comings e Riggs, 1971).

Também em termos citoquímicos, ultra-estruturais e morfométricos (e deixando de lado o relato de publicações que se referem exclusivamente à detecção de conteúdo de DNA e seus graus de replicação, incorporação de uridina e timidina tritida, bandeamento cromossômico e experiências de hibridização "in situ") tem-se buscado caracterizar as heterocromatinas e detectar suas diferenças com relação às eucromatinas, seja "in situ" ou após isolamento das mesmas (Sandritter et al., 1965; Sandritter, 1966; Harbers e Sandritter, 1968; Ruch e Rosselet, 1970; Mittermayer et al., 1971; Vidal, 1972d; Kiefer et al., 1972; Zirkin e Kim, 1972; Mello et al., 1973a, Zirkin, 1973, Burkholder e Weaver, 1974; Mello, 1976). Alguns desses estudos, contudo, se fizeram em cromatinas definidas apenas em termos descritivos de condensação, sem nenhuma distinção implicada em diferenças de atividade de transcrição ou propriedades de replicação (Mittermayer et al., 1971; Zirkin e Kim, 1972; Burkholder e Weaver, 1974).

Com base em resultados citoquímicos às vezes aliados a ensaios bioquímicos, aventou-se a possibilidade de que heterocromatinas ou mesmo "cromatinas simplesmente condensadas" comportar-se-iam diferentemente das eucromatinas ou "cromatinas não condensadas" frente à reação de Feulgen (Sandritter et al., 1965; Sandritter, 1966; Harbers e Sandritter, 1968; Mittermayer et al., 1971). Esta reação citoquímica, descrita em 1924 por Feulgen e Rossenbeck como específica para DNA, é, no geral, considerada de caráter estequiométrico para a quantificação desse componente químico. Até recentemente vinha sendo utilizada praticamente com esse único propósito. Atualmente novas perspectivas foram decerradas para a reação de Feulgen (Bachmann, 1968), conforme será relatado mais abaixo.

A reação de Feulgen envolve duas etapas : uma hidrólise ácida e a seguir tratamento do material com o reativo de Schiff (1866). A hidrólise ácida remove do DNA preferencialmente purinas, "desmascarando" a função aldeídica dos açúcares desoxirribofuranose aos quais se acham ligadas (Feulgen e Rossenbeck, 1924; DiStephano, 1948; Overend e Stacey, 1949). Os aldeídos assim "desmascarados" reagem com o reativo de Schiff, leucoderivado da fucsina básica. A reação entre os radicais aldeídos e o reativo de Schiff restaura o grupo cromofórico na molécula do leucoderivado (Feulgen e Voit, 1924; Lessler, 1951; Longley, 1952; Tamm e Cahrgaff, 1953; Kasten, 1959). Porém quando a hidrólise é estendida além de seu tempo ótimo, para o qual se obtêm valores máximos de absorção, haverá liberação de pirimidinas e simultaneamente despolimerização do ácido apurí-

nico (Tamm et al., 1952; Andersson e Kjellstrand, 1975). Diminui, portanto, o número de grupamentos aldeídos disponíveis para responderem positivamente à reação de Feulgen e, consequentemente, os valores de absorção. O avanço do procedimento hidrolítico pode ser estudado "in situ" computando-se fotometricamente os valores Feulgen-DNA para diferentes tempos de hidrólise e construindo-se "curvas de hidrólise". Com o estudo de tais curvas é possível se aquilatar a maior ou menor resistência de uma cromatina ao processo hidrolítico.

Tem-se verificado que a porção da curva de hidrólise menos suscetível de variações é sua parte ascendente (Bachmann, 1968; Böhm, 1968; James, 1972). A porção descendente, porém, pode apresentar modificações em função de diferentes estados de diferenciação celular e desenvolvimento (Agrell e Bergqvist, 1962; Sandritter e Böhm, 1964; Sandritter et al., 1965; Brachet e Preumont, 1966; Eberhard e Mazia, 1966; Bachmann, 1968; Brachet et al., 1968; Harbers e Sandritter, 1968; Sprenger et al., 1971; Mittermayer et al., 1971).

Sandritter, em 1966, sugeriu que as atipias das curvas de hidrólise encontradas em células tumorais estaria relacionada com modificações da razão eucromatina/heterocromatina nessas células, a partir de suposições anteriores (Sandritter et al., 1965) de que tais cromatinas reagiriam diferentemente à hidrólise ácida. Segundo Sandritter e colaboradores (1965), durante a hidrólise ácida os grupos aldeídos da heterocromatina seriam "desmascarados" mais lentamente do que os da eucro -

matina; núcleos com a mesma quantidade de DNA, mas diferentes proporções de hetero- e eucromatina captariam diferentes quantidades de corante após tempos de hidrólise semelhantes. Por outro lado, as pesquisas efetuadas em diversos tipos de células por Agrell e Bergqvist (1962), Eberhard e Mazia (1966), Bachmann (1968), Brachet e colaboradores (1968) e Sonnenbichler e Nobis (1970) sugeriram que as proteínas nucleares poderiam exercer alguma influência na produção de atipias nas curvas de hidrólise, "protegendo" diferentemente o DNA a elas associado e retardando a ação hidrolítica sobre ele. É, portanto, para se supor que, se diferentes proteínas associadas ao DNA ou ao complexo DNA-histonas estivessem ocorrendo nas diferentes cromatinas e fossem diferentemente extraíveis pela hidrólise ácida, poderiam vir a ser detectadas variações nas curvas de hidrólise.

Em 1971, Mittermayer e colaboradores isolaram de células do timo de vitelo cromatinas diferentemente condensadas (em termos puramente morfológicos) e relataram para estas diferente estabilidade frente à hidrólise ácida. Segundo eles a hidrólise da "eucromatina" se efetuou mais rapidamente do que a da "heterocromatina". Tal resultado foi detectado não só através da análise citofotométrica das cromatinas isoladas, mas também bioquimicamente, pelo achado de diferentes quantidades de desoxirribose nos sobrenadantes das frações cromatínicas hidrolisadas. Estes autores admitiram que o grau de condensação do DNA na cromatina poderia estar implicado na hidrôlise ácida diferencial e ser influenciado por proteínas prin -

principalmente "residuais".

Contudo, segundo Kiefer e colaboradores (1972), que estudaram a heterocromatina constitutiva e a eucromatina de células ganglionares do Microtus agrestis, "in situ", a cinética de hidrólise seria idêntica para ambas cromatinas. Tal conclusão se baseou no estudo de uma razão de valores Feulgen-DNA (heterocromatina/eucromatina + heterocromatina) x 100, que não mostrou diferir à medida em que se prolongava a hidrólise. Estes autores generalizam a conclusão de que a cinética de hidrólise não variaria em função do tipo cromatínico. Porém não explicam a causa das atipias de curvas de hidrólise detectadas em outros sistemas celulares nem admitem que o comportamento frente à reação de Feulgen, por eles encontrado, possa não ser universal e variar de acordo com o tipo de heterocromatização envolvida e com as proteínas associadas ao DNA. Aparentemente esse trabalho teve um efeito desestimulante no sentido de se continuarem as buscas sobre as diferenças em curvas de hidrólise de heterocromatina e eucromatina e seu significado, pois não surgiram novas publicações sobre o assunto. Deve-se considerar que o achado de tais diferenças "in situ" teria importante significado geral no estabelecimento de mais uma característica diferencial entre tipos cromatínicos. Além disso, poderia talvez trazer também alguma informação que se somasse a outras tentativas no sentido do estabelecimento de padrões diferenciais, que favorecessem identificação de estados fisiológicos celulares especiais e mesmo diagnóstico precoce de processos celulares patológicos, como é o caso de célu-

las cancerosas, que podem vir a desenvolver heterocromatização progressiva (Harbers, 1969).

Ainda, com base em resultados citoquímicos, existe também o relato de que o índice histonas/DNA (concentração em 10^{-13} g/ μm^3), igual a 3,7 na heterocromatina (constitutiva) e 2,2 na eucromatina de Rhoeo discolor, não varia em células de diferentes regiões de suas raízes secundárias, enquanto a razão proteínas não histônicas/DNA varia com o tipo cromatínico e com o grau de diferenciação celular (Ruch e Rosselet, 1970). Zirkin (1973), estudando a heterocromatina e a eucromatina de fígado de sapo, constatou na primeira muito menos proteínas não histônicas do que na segunda.

Por outro lado, após um elegante estudo citofísico quantitativo ao nível da microscopia de polarização, Vidal (1972d) pôde demonstrar diferenças com relação a proteínas em hetero- e eucromatinas isoladas de fígado de camundongo. Quando a heterocromatina foi corada com uma solução de azul de toluidina a pH 3,6, apresentou-se mais birrefringente (retardos ópticos mais elevados) do que a eucromatina. Em ambas cromatinas submetidas a tratamento por tripsina foi detectado di-croísmo linear, dispersão anômala da birrefringência e um efeito semelhante ao de Cotton (Vidal, 1972a) após coloração. Contudo, estes fenômenos ópticos se mostraram mais proeminentes na heterocromatina, indicando que esta apresenta proteínas que respondem diferentemente à digestão enzimática, se comparada à eucromatina, e que tornam o filamento cromatínico capaz de apresentar características anisotrópicas diferentes. Estas proprie-

dades poderão também refletir diferente conformação molecular do complexo nucleoproteico(Vidal, 1972d). O papel das proteínas em criar ou alterar propriedades anisotrópicas particulares foi também demonstrado pelo mesmo autor, fazendo uso de padrões de DNA, poli-l-lisina e complexos DNA-poli-l-lisina (Vidal, 1972d).

A partir dos mesmos tipos de células para as quais se conhece "in situ" os padrões de ocorrência de cromocentros(Müller,1966) e de certa forma em apoio aos achados de Vidal(1972d), foram determinadas nas frações cromatínicas "condensadas" e "estendidas", isoladas por centrifugação e examinadas ao microscópio eletrônico, diferentes respostas à digestão por DNase I (Burckholder e Weaver,1974).Isto já não acontece em amostras de DNA purificado das mesmas frações cromatínicas. Tal comportamento fala em favor de uma diferente interação de proteínas cromossômicas com o DNA, possibilitando-lhe maior resistência ao ataque pela DNase I quando integrando cromatinas "condensadas" (Burckholder e Weaver, 1974).

Se as heterocromatinas e eucromatinas coradas forem analisadas quanto a propriedades matemáticas especiais de sua imagem digitalizada poderão ser encontradas diferenças, conforme relato de Mello (1976) e Mello e colaboradores(1973a) para algumas células somáticas e da linhagem germinativa do hemíptero Triatoma infestans. Neste inseto, à semelhança de outros hemípteros (Geitler,1938;1939a,b)tem sido relatado o fenômeno de intensa poliploidização nas células epiteliais dos tubos de Malpighi ao longo do desenvolvimento ninfal(Mello,1969,

1970, 1971 e 1975). Desde o 1º instar ninfal é evidente nos núcleos de tais células a presença constante de massas de cromatina condensada, as quais, apresentando réplica de DNA mais lenta do que a do DNA da cromatina restante, não condensada, e aparente inatividade de transcrição, foram consideradas heterocromáticas (Mello, 1969, 1970, 1971, 1975 e 1976). Por outro lado, algumas modificações nos padrões de heterocromatização são observadas em parte dos núcleos dos tubos de Malpighi, à medida que progride o desenvolvimento ninfal. Do 1º ao 3º instars, os núcleos em quase sua total maioria apresentam um único corpo heterocromático aproximadamente esférico, como padrão geral e uniforme ao longo dos tubos de Malpighi. A partir de então os núcleos da porção proximal dos tubos continuarão com o mesmo padrão, porém os da porção distal passarão a exibir diversos cromocentros com formas variadas (Mello, 1969, 1971, 1976). No 5º instar ambos tipos de núcleos poderão atingir graus de ploidia iguais a $32n$ e $64n$ (Mello, 1969 e 1976). Se se submeter os núcleos dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans à reação de Feulgen, determinando-se a seguir seus valores de extinção ponto por ponto através de citofotometria de varredura automática e as imagens digitalizadas das áreas heterocromáticas e eucromáticas, estas poderão ser analisadas matematicamente. Tal análise revela que:

1. há maior homogeneidade nos valores das médias das extinções por unidade de área (μ^2) nas heterocromatinas;
2. os cromocentros podem mudar de localização nos núcleos dos tubos de Malpighi, à medida que se aproxima o fim do

desenvolvimento ninfal;

3. núcleos do 5º instar, com vários cromocentros, apresentam os corpos heterocromáticos mais afastados do centro da imagem nuclear do que núcleos com um único cromocentro;

4. núcleos do 4º e 5º instars, com apenas um cromocentro, apresentam a razão das extinções médias (referentes à área condensada/área total) maior do que a de núcleos com vários cromocentros.

Considerando-se o aparente caráter de heterocromatina constitutiva dos cromocentros dos núcleos poliplóides dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans e as alterações em seus padrões de heterocromatização durante o desenvolvimento ninfal, este se torna um material conveniente para a busca de outros caracteres diferenciais entre heterocromatina e eucromatina (e mesmo entre heterocromatinas de núcleos com um ou vários cromocentros; idem entre eucromatinas), através de métodos citotímicos e citofísicos quantitativos. Com este objetivo, portanto, no presente trabalho estudam-se "in situ", nas diferentes cromatinas dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans,

1. as curvas de hidrólise após fixação em líquidos que preservam diferentemente as proteínas associadas ao DNA;

2. as curvas de absorção de Feulgen nas diferentes condições de fixação e hidrólise;

3. as características da basofilia, que refletem a acessibilidade e proximidade de grupos fosfatos do DNA não ligados a proteína (Lison, 1955; Davison e Butler, 1956; Miura e Ohba, 1967; Itzhaki, 1971; Mello e Vidal, 1972, 1973, 1974, 1975,

1976; Vidal, 1972c,d);

4. a resposta aos métodos de denaturação-renaturação (Arrighi e Hsu,1971; Vidal,1972; Mello,1973);

5. a ocorrência de fenômenos anisotrópicos tais como a dispersão da birrefringência, após coloração por soluções de azul de toluidina. Estes fenômenos, associados a padrões específicos de basofilia "in situ", informam as variações em disponibilidade e proximidade dos grupos fosfatos "livres" do DNA e sobre o estado de orientação macromolecular do complexo DNA-proteína (Vidal, 1972c,d; Mello e Vidal, 1973, 1974, 1975 e 1976);

6. a resposta a reações citoquímicas para proteínas nucleares, inclusive após a hidrólise pertinente à reação de Feulgen.

Para facilidade de redação, no texto serão utilizadas com frequência as abreviaturas H_1 e E_1 , para designar, respectivamente heterocromatina e eucromatina de núcleos com um cromocentro, e H_s e E_s , respectivamente, para heterocromatina e eucromatina de núcleos com vários cromocentros.

*

*

*

M A T E R I A L

Ninfas de 5º instar do Triatoma infestans Klug (Hemiptera, Reduviidae), com ao redor de 15 dias nesse estadio, foram dissecadas vivas e delas removeram-se rapidamente os tubos de Malpighi, sobre os quais já havia sido colocada uma gota de fixador.

Para cada condição experimental utilizaram-se órgãos de pelo menos 3 indivíduos.

*

*

*

M É T O D O S

1. Grau de estabilidade das hetero- e eucromatinas frente à hidrólise ácida e espectros de absorção avaliados no material submetido à reação de Feulgen.

1.1. Preparo das lâminas. Reação citoquímica.

Supondo-se que as hetero- e eucromatinas pudessem apresentar diferentes curvas de hidrólise e que as diferenças implicadas pudessem ser salientadas em determinadas condições de fixação, variou-se a mesma. O material foi, assim, fixado em um dos seguintes fixadores, que preservam diferentemente as proteínas nucleares:

1. Etanol absoluto - ácido acético glacial, 3:1 (v:v), durante 5 min;
2. Formol a 10% neutro, durante 1h;
3. MFA (metanol absoluto- formol- ácido acético glacial, 17:2:1), durante 15min.

O formol a 10% tamponado a pH 7,0 é um fixador que sabidamente preserva as proteínas nucleares, embora possa alterar-lhes o estado físico conformacional (Swift, 1950, Mello, 1973) e é recomendado por alguns autores para a citoquímica quantitativa do DNA (Ruch, 1966; Swift, 1966). Por outro lado, o etanol acético pode promover a dissociação de parte das histonas complexadas ao DNA (Dick e Johns, 1967 e 1968; Sivak e Wolman, 1974), mas é o fixador de eleição dos citologistas e citogeneticistas, quando se deseja estudar a cromati-

na ou cromossomos após esmagamento. Quanto ao MFA, segundo Böhm e colaboradores (1968), é o fixador mais indicado na determinação do conteúdo de DNA nuclear, seja através de absorção na gama do U.V., seja através da reação de Feulgen.

Após se completar o tempo de fixação, os tubos de Malpighi foram lavados em etanol absoluto (quando o fixador havia sido de natureza alcoólica) (5min) e hidratados. Quando a fixação foi realizada em formol, lavaram-se os órgãos diretamente em água destilada, durante 15 min. Logo após, efetuou-se a reação de Feulgen.

Como primeira etapa da reação citoquímica, foi efetuada uma hidrólise com HCl 0,1N (pH 1,2), à temperatura de 37°C. A escolha de uma hidrólise mais suave do que a convencional residuiu no fato da primeira permitir melhor reprodutibilidade da reação de coloração e minimizar a sobreposição do processo de liberação de aldeídos do DNA com o de solubilização da desoxirribose (Sandritter et al., 1965; Böhm, 1968; Vahs, 1973). Além disso, propicia curvas de hidrólise com regiões de absorção máxima e pós-máxima mais extensas. Utilizaram-se os seguintes tempos de hidrólise:

1. Material fixado em formol: 1h, 2h, 3h, 6h, 7h, 9h, 15h, 18h, 21h, 27h;
2. Material fixado em etanol-acético: 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 13h40min, 18h, 21h, 24h, 31h;
3. Material fixado em MFA: 2h, 3h, 6h, 7h30min, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h, 27h.

Uma vez realizada a hidrólise, os tubos de Mal-

pighi foram lavados em água destilada, ligeiramente secos com papel yes e deixados, então, por 1h, à temperatura ambiente de 26°C, no reagente de Schiff, cuja preparação é descrita a seguir (Lillie, 1954- modificado):

1. Levar 100ml de água destilada à ebulição.
2. Retirar do fogo e adicionar 1g de fucsina básica.
3. Resfriar até 60°C. Filtrar.
4. Acrescentar 4g de bissulfito de potássio. Dissolver bem.
5. Juntar 10ml de HCL 1N.
6. Deixar 24h em repouso na obscuridade.
7. Adicionar 150 a 250mg de carvão ativo (Norit). Agitar e filtrar. Conservar em refrigerador a 0°C-5°C.

Foi utilizada fucsina básica de fabricação Carlo Erba. Considerando-se existir referência de que após o uso de reagente de Schiff com pH superior a 2,4 são encontrados valores Feulgen-DNA diferentes dos esperados em função dos graus de ploidia e número de cromossomos, em núcleos diplóides e tetraplóides de fígado (Walker e Richards, 1959), no presente trabalho empregou-se um reativo de Schiff com pH não superior a 1,92.

Após serem tratados pelo reativo de Schiff, os tubos de Malpighi foram submetidos a três banhos, de 3min cada, em água sulfurosa (metabissulfito de potássio a 10%, 1 parte; HCL 1N, 1 parte; água destilada, 18 partes), preparada no momento do uso. Logo após, foram eles lavados em água destilada e colocados sobre lâminas nas quais já havia sido posta uma gota de ácido acético a 45% (em alguns casos empregou-

-se etanol a 70%). Procedeu-se, então, a um suave esmagamento dos órgãos cobertos com uma lamínula, de maneira a não provocar um espalhamento excessivo do material nuclear. As lamínulas foram removidas por congelamento em CO_2 líquido. Mergulharam-se, a seguir, as lâminas em etanol a 70%, desidratando-se o material numa série alcoólica, diafanizando-o em xilol e montando-o em bálsamo do Canadá, cujo índice de refração ($n = 1,54$) é adequado para os estudos citofotométricos subsequentes.

A fim de se evitarem erros provenientes da diminuição de intensidade de coloração ("fading"), as lâminas coradas foram guardadas ao abrigo da luz e utilizadas para as medidas citofotométricas dentro de um espaço de tempo não superior a 6 meses (Garcia e Iorio, 1966).

1.2. Micro-espectrofotometria.

A micro-espectrofotometria dos núcleos corados foi realizada num fotomicroscópio Zeiss equipado com um fotômetro 01 e um fotomultiplicador EMI 6256.

Os diferentes comprimentos de onda em que se determinaram os valores de extinção ou de transmitância foram obtidos com o uso de uma régua monocromadora de fabricação Schott.

Para a determinação das curvas de hidrólise tornou-se necessário obter, nos vários tempos de hidrólise, os valores relativos Feulgen-DNA em unidades arbitrárias por área de cromatina considerada. Como no presente trabalho as regiões heterocromáticas e eucromáticas foram estudadas "in situ", a determinação fotométrica dos valores de transmitância pelo método de duplo comprimento de onda, de conhecida preci-

são e reprodutibilidade e reduzido erro distribucional (1 a 2%) (Ornstein, 1952; Patau, 1952; Mendelsohn, 1966), não pôde ser efetuada em cada área em separado. Isto porque a própria distribuição topográfica das cromatinas e as características do método citofotométrico impossibilitaram o seu uso. Portanto, empregou-se um método fotométrico de "varredura manual" para as diferentes regiões cromatínicas, computando-se valores de extinção para diversos setores de cada área. O uso de múltiplos "plugs", segundo Mendelsohn (1966), introduz no máximo 10% de erro. Evitou-se determinar um único "plug" por área heterocromática ou eucromática, pois tal procedimento poderia acarretar uma avaliação errônea dos valores Feulgen-DNA, devido à não homogeneidade da distribuição do material corado, ocasionando um erro distribucional elevado, de mais de 40%, conforme se constatou mesmo num teste preliminar.

Para se avaliar o acerto de tal decisão, compararam-se os valores Feulgen-DNA do núcleo total obtidos pela soma dos valores calculados para as áreas heterocromáticas e eucromáticas em separado, após "varredura manual", com valores obtidos diretamente para o núcleo total através do método citofotométrico de duplo comprimento de onda, de Ornstein (1952) e Patau (1952). Assim, estudou-se o grau de correlação entre os dados fornecidos pelos dois procedimentos citofotométricos.

A. "Varredura manual".

Para a medida das extinções utilizou-se objetiva Pol-Neofluar 63/0,90, optovar 2, diafragma de medida com diâ

metro igual a 0,16mm, diafragma de campo com diâmetro igual a 0,4mm e ocular Kpl W MPM 12,5x. A área de mensuração foi, portanto, igual a $1,26/u^2$.

Para que o objeto estivesse no plano focal do condensador (Lison, 1960), fez-se uso de uma objetiva Zeiss Plan 10x/0,22, como condensador. A abertura numérica dessa objetiva é a sugerida por Lison (1960) e que permite:

1. diminuição da aberração para as partes do objeto que não estejam no plano focal do condensador (as aberrações de esfericidade produzem "luz parasita");

2. aproximação semelhante às condições de validade da lei de absorção (em luz não paralela a fração de energia absorvida por um objeto absorvente varia segundo a dimensão do objeto);

3. a diminuição da "luz parasita" proveniente da difração ao nível dos objetos vizinhos ao objeto estudado (Lison, 1960).

As medidas de extinção foram efetuadas num comprimento de onda igual a 550nm. Efetuaram-se 2 a 3 medidas em cada um dos vários setores diferentes (4 a 16) em que cada área cromatínica foi dividida. Cada núcleo medido foi fotografado e o negativo levado a um ampliador. A imagem nuclear foi assim projetada e desenhada, apresentando um aumento final de 4000x. Com um planímetro Polar determinaram-se a seguir as áreas de cada setor cromatínico considerado. Multiplicou-se a área de cada setor pelo respectivo valor de extinção (média de 2 ou 3 medidas), obtendo-se desse modo um valor Feulgen-DNA por setor. A seguir, somaram-se os valores dos setores que perfaziam a área heterocromática, o mesmo sendo realizado para a eucromática.

Quando se desejou obter o valor Feulgen-DNA por núcleo, somaram-se os resultados obtidos para as zonas heterocromáticas e eucromáticas. A porcentagem de erro inerente ao processo de planimetria, no presente trabalho, com base na curva publicada por Schiemer, em 1962, é ao redor de 1% para as eucromatinas e 5% para as heterocromatinas.

Os dados Feulgen-DNA foram distribuídos numa escala de valores segundo uma progressão geométrica, possuindo 10 classes intermediárias entre os valores 25 e 50, 50 e 100, 100 e 200 etc (Ferreira et al., 1967).

Com os valores Feulgen-DNA variando em função do tempo de hidrólise, construíram-se as curvas de hidrólise para as hetero- e eucromatinas. Procedeu-se a seguir ao ajuste das curvas à função de Bateman (Böhm e Seibert, 1966). Os procedimentos matemáticos envolvidos nessa etapa serão descritos mais para a frente e também no Apêndice 1.

B. Método de duplo comprimento de onda.

Conforme já mencionado, este método foi utilizado para verificar em que extensão o cálculo dos valores Feulgen-DNA a partir de dados de absorção obtidos por "varredura manual" foi válido.

O método de duplo comprimento de onda, descrito simultânea e independentemente por Ornstein e Patau, em 1952, apresenta como principais vantagens a compensação dos erros distribucionais devidos à não homogeneidade em compactação e distribuição do material corado, a possibilidade de se medir objetos com forma irregular e a não necessidade de um foco

preciso de todos os pontos a serem medidos em conjunto. Segundo Mendelsohn (1966), no máximo 1 a 2% de erro nas medidas são introduzidos por este método citofotométrico.

Por outro lado, há uma série de exigências ópticas e operacionais a serem preenchidas para que o método possa ser considerado de real validade.

Por este método, os valores Feulgen-DNA por núcleo, em unidades arbitrárias, são calculados pela aplicação das fórmulas:

$$m_t = \frac{B L_a C}{k_a \ln 10} \quad ;$$

$$C = \frac{1}{2 - Q} \ln \frac{1}{Q - 1} \quad ;$$

$$Q = \frac{L_b}{L_a} = \frac{1 - T_b}{1 - T_a} \quad ,$$

sendo:

B = área do campo de medida,

m_t = quantidade total de cromóforo,

T = transmitância,

k = absortividade (constante, utilizada nos cálculos para obtenção de quantidades absolutas),

$\underline{a}$ e $\underline{b}$ = comprimentos de onda, tais que $k_b = 2k_a$.

Determinando-se, portanto, para uma mesma área de medida, os valores de transmitância em dois comprimentos de onda $\underline{a}$ e $\underline{b}$ (de tal forma que o valor de extinção encontrado em

b seja o dobro do de a), obtém-se o valor de Q e consequentemente o de C.

Na prática, em determinações quantitativas relativas,

$$m_t = B L_a C.$$

No caso da reação de Feulgen, m_t representa os valores Feulgen-DNA. Como a determinação desses valores pelo método de duplo comprimento de onda é muito laboriosa e o conjunto de tabelas para facilitar os cálculos, publicado por Mendelsohn, em 1958, é incompleto, no presente trabalho todos os cálculos foram efetuados em computador IBM-1130, partindo-se dos dados de transmitância e valor da área de mensuração.

No caso específico ainda da reação de Feulgen, a escolha dos dois comprimentos de onda deve ser tal que o comprimento de onda a esteja no lado verde do espectro (Garcia e Iorio, 1966). Além disso, na escolha dos dois λ costuma-se levar em consideração o critério de Garcia e Iorio (1966), segundo o qual, sendo E_a a extinção no λ mais curto e E_b a extinção no λ mais longo, a razão E_a/E_b deve ser levemente superior a 0,50, ou seja, ao redor de 0,51-0,53. Este pequeno excesso compensará, segundo os autores mencionados, o efeito promovido pela presença de espaços não absorventes em meio ao material corado.

Quando a escolha dos dois comprimentos de onda é acertada, ou seja, quando os valores de extinção nos dois λ guardam entre si a relação requerida, os valores Feulgen-DNA

encontrados terão um menor coeficiente de variação independentemente da área de mensuração empregada e da relação dos meios absorvente para não absorvente. Isto obviamente dentro de um certo limite, pois, quando a área total de mensuração é muito maior do que a área absorvente, o brilho introduzido pelos espaços não absorventes tende a aumentar as transmitâncias (de la Torre e Salisbury, 1964; Garcia e Iorio, 1966; Mello e Zanardi, 1976).

Para a seleção dos dois λ a serem empregados a fim de se obter o valor das transmitâncias, foram determinadas curvas espectrais de absorção nas zonas heterocromáticas e eucromáticas de 15 núcleos por experimento. Usou-se objetiva Pol-Neofluar 63/0.90, optovar 2, diafragma de mensuração com diâmetro igual a 0,16mm e diafragma de campo com diâmetro igual a 0,2mm. A área de mensuração correspondeu, portanto, a $1,26\mu^2$.

Uma vez determinado o pico principal da curva de absorção, considerou-se o valor de extinção no λ desse pico como correspondendo a 100% e a partir deste calculou-se para os outros λ a porcentagem de extinção relativa. Determinou-se, a seguir a média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação desses novos valores para cada comprimento de onda.

As curvas espectrais de absorção prestaram-se não somente para a seleção dos dois comprimentos de onda a serem utilizados na determinação dos valores Feulgen-DNA, mas também para a análise de seu próprio perfil nos vários experimentos. O objetivo dessa investigação reside no fato de já terem sido apontadas variações no perfil dessas curvas em função de alterações na associação DNA-proteína (revisão em Deitch, 1966a).

Foi também testado se as flutuações instrumentais na presente investigação eram casuais, ou seja, se após plotar-se as áreas de mensuração como abcissas e as estimativas Feulgen-DNA como ordenadas (as transmitâncias sendo medidas para alguns pares de λ escolhidos), a inclinação da reta obtida se aproximaria de zero. Segundo Garcia e Iorio (1966), a inclinação dessa reta pode ser representada pelo coeficiente de regressão $\hat{b}$, o qual pode ser calculado pelo método dos quadrados mínimos (Dixon e Massey, 1957; Steel e Torrie, 1960), ou seja,

$$\hat{b} = \frac{\sum^I x_i y_i}{\sum^I x_i^2}, \text{ onde}$$

X_i = qualquer área particular de mensuração usada,

Y_i = valores Feulgen-DNA obtidos para sua área correspondente X_i ,

I = número total de medidas,

$x_i = X_i - \bar{X}$,

$y_i = Y_i - \bar{Y}$.

A homogeneidade da luz e a uniformidade da resposta do fotocátodo do citofotômetro foram testadas segundo Garcia e Iorio (1966), ou seja, variando-se a posição do núcleo dentro do campo de medida e computando-se o valor da transmitância após cada deslocamento.

1.3. Construção das curvas de hidrólise.

Para a construção das curvas de hidrólise ajustadas à chamada função de Bateman (Böhm e Seibert, 1966), traba-

lhrou-se simultaneamente com todos os dados Feulgen-DNA obtidos após diferentes tempos de hidrólise para cada tipo cromatínico. Esta função é do tipo

$$y = \frac{y_0 k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

Seus parâmetros são estimados resolvendo-se uma equação que não é linear, através de um procedimento de regressão complexo e que deve ser necessariamente efetuado em computador.

A função de Bateman (1910) foi primeiramente estabelecida para o decaimento radioativo em átomos. Encontrou aplicação também em Biologia, quando Teorell (1937- apud Böhm e Seibert, 1966) e Dost (1953- apud Böhm e Seibert, 1966) deram indicação de que seria valiosa para representar, em função do tempo, as modificações de concentração de uma substância dissolvida no sangue e que simultaneamente pudesse ser extravasada ou eliminada do mesmo.

No caso de curvas de hidrólise para material submetido à reação de Feulgen, a função de Bateman também pode ser aplicada, considerando-se:

y = quantidade de grupos aldeídos "produzidos" no DNA, num tempo t , após começo da hidrólise;

y_0 = a quantidade total, potencialmente presente, de grupos aldeídos no DNA, no começo da hidrólise (t_0);

k_1 = constante de "produção" de aldeídos livres no DNA;

k_2 = constante de destruição dos aldeídos (por quebra de partes do ácido apurínico)(Böhm e Seibert, 1966).

O DNA decompõe-se, sob a influência do HCl, em purinas (P) e ácido apurínico (A) com radicais aldeídos livres. Com o auxílio da reação de coloração, a concentração de aldeídos livres será estudada em função do tempo e assim a concentração da substância A poderá ser avaliada. A velocidade com que a quantidade de A aumenta é proporcional à velocidade de diminuição do substrato ainda disponível.

A representação matemática das curvas de hidrólise ganha um significado especial nos casos atípicos, isto é, quando as curvas apresentam dois ou mais picos, como acontece em células embrionárias de Rana temporaria (Agrell e Bergqvist, 1962) e em células tumorais (Sandritter e Böhm, 1964; Böhm, 1965).

O ajuste matemático dos dados reais à função de Bateman no presente trabalho adaptou-se a um esquema geral proposto por Ballester (1975-manuscrito em preparação) e transcrito no Apêndice L.

Obtidas as curvas, foram elas comparadas entre si. A partir destas, calcularam-se também curvas com valores percentuais e índices $(H_1/(E_1 + H_1))100$, $(H_s/(E_s + H_s))100$, $(H_1/(H_s + H_1))100$ e $(E_1/(E_s + E_1))100$.

2. Características da basofilia das hetero- e eucromatinas após diferentes procedimentos citoquímicos.

2.1. Preparo das lâminas. Reações citoquímicas.

2.1.1. Solução corante em diversos pH.

O material foi fixado em etanol acético, la-

vado em etanol absoluto, hidratado, parte dele tratado por uma solução de RNase Sigma (2mg/ml de água destilada) a 37 °C, por 40 min (Deitch, 1966a), lavado, a seguir, em água destilada e esmagado em uma gota de ácido acético a 45%. As lamínulas foram, então, mergulhadas em etanol a 70% (1 a 2 min) e depois em água destilada (10 min). O material foi corado numa solução de azul de toluidina (Merck) a 0,025% em tampão McIlvaine durante 15 min. Foram utilizadas soluções-tampão nos seguintes pH: 2,5; 3,4; 4,0 e 5,0 (Lison, 1960). As lâminas foram a seguir lavadas rapidamente em água destilada, secadas ao ar, diafanizadas 5 min em xilol e montadas em Eukitte.

2.1.2. A basofilia após tratamento com soluções de corante adicionadas de íons Ba^{++} e UO_2^{++} .

Utilizou-se material fixado em etanol acético, submetido à digestão por RNase e esmagado em ácido acético a 45%. O material foi tratado por soluções de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine, pH 3,4, adicionadas ou de $Ba(NO_3)_2$ (1 mequiv) ou de $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (1 mequiv) (Lison, 1960).

2.1.3. A basofilia após processos de denaturação - reassociação.

Foi utilizado material fixado em etanol acético, tratado por RNase e esmagado em ácido acético a 40%. Após terem sido retiradas as lamínulas, as lâminas foram imersas em etanol a 70% (1 a 2 min), água destilada (10 min) e então deixadas secar. A denaturação foi efetuada com NaOH 0,014M (pH 12,15) por 30s (Vidal, 1972- apud Mello, 1973) ou NaOH 0,07 N

por 1 a 2 min(Arrighi e Hsu, 1971). A seguir as lâminas foram submetidas a 3 banhos rápidos de etanol a 70%, um banho de etanol a 80% (1min) e um de etanol a 95% (2 min) e deixadas secar. A reassociação foi realizada em solução 2SSC (2 (NaCl 0,15M + citrato de sódio 0,015M)/1000ml de água destilada) a 65°C por uma noite (12h)(Arrighi e Hsu, 1971). A seguir o material foi lavado duas vezes em etanol a 70%, passado por etanol a 95% e deixado secar.

Dois tipos de coloração foram realizados:

1. utilizando-se uma solução de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine, pH 4,0, por 15min. A seguir o material foi lavado rapidamente em água, secado, diafanizado em xilol (5min) e montado em Eukitte (Vidal, 1972b).
2. usando-se uma solução de Giemsa, por 10min (Arrighi e Hsu, 1971):

Preparo da solução:

10ml de solução mãe

1ml de metanol

29ml de tampão McIlvaine a pH 6,8

Completar a 100ml com água destilada.

As lâminas foram então lavadas em água, secadas ao ar, diafanizadas em xilol e montadas em Eukitte.

Foram também preparadas algumas lâminas nas quais se efetuou tratamento em separado ou por NaOH 0,014M (30s) ou por solução 2SSC a 65°C por uma noite. Ambos tratamentos foram seguidos por coloração com azul de toluidina a 0,025% (pH 4,0).

2.1.4. Ação da metilação sobre as cromatinas diferentemente fixadas.

A atuação da metilação (metanol-100ml, HCl concentrado- 0,8ml; pH 0,08; 5h; 60°C)(Fischer e Lillie, 1954; Mello e Vidal, 1972) foi investigada em material fixado em etanol acético a 45% e em material fixado em formol neutro a 10% e esmagado em etanol a 70%. Após a metilação, as lâminas foram lavadas em etanol absoluto; o material foi hidratado e corado com uma solução a 0,025% de azul de toluidina a pH 4,0.

Algumas lâminas foram tratadas, após metilação, pelo reativo de Schiff durante 1h, passadas por 3 banhos de água sulfurosa (5min cada) e a seguir lavadas em água destilada, desidratadas, diafanizadas e tornadas permanentes em Eukitte . Tal procedimento visou detectar a atuação da metilação sobre a denaturação do DNA e possível formação de ácido apurínico.

2.2. Micro-espectrofotometria.

O estudo dos padrões de basofilia foi realizado determinando-se o perfil das curvas espectrais de basofilia e os seus máximos de absorção, em luz não polarizada, e estabelecendo-se índices metacromáticos (valores de extinção em $\lambda = 555\text{nm}$ /valores de extinção em 625nm)(Mello et al., 1973) para cada condição experimental descrita acima.

As mensurações foram efetuadas usando-se um fotomicroscópio Zeiss equipado com fotômetro 01 e fotomultiplicador EMI 6256. Utilizou-se objetiva Pol 63/0.90 ou Plan 40/0.65, optovar 2, diafragmas de mensuração com diâmetros iguais a

0,25mm e 0,16mm e diafragmas de campo com diâmetros iguais a 0,1mm ou 0,2mm. Como condensador foi usada uma objetiva Zeiss Plan 10/0,22.

Os diferentes comprimentos de onda foram obtidos com uma régua monocromadora Schott.

3. Propriedades anisotrópicas das cromatinas submetidas às reações de basofilia.

Nos mesmos preparados utilizados para a investigação dos padrões de basofilia foram feitas observações de anisotropia e medida dos retardos ópticos das cromatinas em diferentes comprimentos de onda. Essa investigação foi realizada com o mesmo fotomicroscópio Pol-Zeiss, usando-se luz UV polarizada, objetiva Pol 63/0.90, optovar 2, compensadores de Bräce-Köhler $\lambda / 20$ e $\lambda / 10$ e condensador Zeiss 1,3. Porções cromatínicas filamentosas foram orientadas nas direções NO-SE ou NE-SO com respeito ao azimute do plano de polarização da luz.

Com as medidas dos retardos ópticos nos diferentes comprimentos de onda foram determinadas curvas de dispersão da birrefringência das cromatinas e suas principais características, tais como, sinal e valor dos retardos ópticos, presença de zona de transição e localização do ponto de inflexão.

4. Citoquímica para proteínas nucleares básicas e totais.

4.1. Reações citoquímicas.

A investigação citoquímica de proteínas básicas

nucleares foi realizada em tubos de Malpighi fixados em formol neutro a 10% durante 1 hora, lavados em água destilada durante 15 min, incluídos em parafina e cortados com a espessura de 7, μ , ou levemente esmagados em etanol a 70%. Submeteu-se este tipo de material às seguintes reações:

A. Reação do fast green alcalino, segundo método de Alfert e Geschwind (1953), modificado por Deitch (1966a), para detecção de histonas:

1. Os ácidos nucleicos são removidos das preparações com TCA a 5% (preparado na hora do uso), durante 15 min a 90°C.

2. Mergulham-se, então, as lâminas em TCA a 5% frio e a seguir em diversos banhos de água destilada.

3. Efetua-se a coloração à temperatura ambiente e durante 30min, numa solução de fast green FCF preparada pela dissolução de 1ml de uma solução estoque aquosa a 1% do corante em 9ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,005M, com adição de diversas gotas de Na_2HPO_4 0,005M, a fim de levar o pH a 8,0-8,1.

4. Lavam-se os preparados várias vezes em água destilada, seguindo-se diretamente uma desidratação com etanol a 95% (2 a 5 min), dois banhos em etanol absoluto (5 min cada), diafanização e montagem permanente em bálsamo do Canadá.

B. Fast green alcalino (pH 8,0-8,1) após desaminação (Bloch, 1966):

1. Os ácidos nucleicos são removidos com TCA a 5%, durante 15min a 90°C.

2. Mergulham-se as lâminas em TCA a 5% frio e várias vezes em água destilada.

3. Submete-se o material a 3 banhos (15 min cada) com uma solução de ácido nitroso obtido pela adição de partes iguais de nitrito de sódio a 10% e ácido acético a 10% (van Slyke, 1911; Bloch, 1966).

4. Lava-se o material em água destilada.

5. Efetua-se a seguir a coloração, de modo semelhante ao relatado no procedimento A.

Este método permite diferenciar histonas ricas em arginina das ricas em lisina; no geral o material se cora pelo fast green somente quando a razão arginina/lisina for maior do que 1 (Bloch, 1966).

C. Método de fast green-eosina, segundo Bloch (1966):

1. Hidrolisa-se o material durante 15 min em TCA a 5% (90°C).

2. Lavam-se os preparados 3 vezes (10min cada) em etanol a 70% (os itens 2 a 7 devem ser efetuados em banho de gelo).

3. Deixa-se o material durante 30min em uma solução de fast green FCF a 0,1% em tampão TRIS 0,07N, pH 8,3.

4. Transferem-se as lâminas para uma solução que consiste na mistura de fast green FCF a 0,05% e eosina Y a 0,05% em tampão TRIS 0,07N, pH 8,3, onde deverão ficar durante 1h.

5. Lavam-se as lâminas 10 min em solução tampão e em etanol a 70% e 95%.

6. Completa-se a desidratação, diafaniza-se o material e finalmente monta-se o mesmo em bálsamo do Canadá.

Segundo este método, as histonas ricas em lisina se coram com eosina (Bloch, 1966).

Também, em esmagamentos fixados em etanol acético, foi investigada a remoção de proteínas totais e básicas ao longo do processo hidrolítico pertinente à reação de Feulgen (HCl 0,1N a 37°C). O conteúdo relativo de histonas e o de proteínas totais, após diferentes tempos da ação hidrolítica pelo HCl, foram estudados após a reação do fast green alcalino e fast green a pH 2,7 (Deitch, 1966b), respectivamente. No caso da investigação de proteínas totais foi utilizada solução corante a 0,1% em ácido acético a 1% durante 30min. A seguir o material foi lavado em ácido acético a 1% (1 min), desidratado em 3 banhos de álcool butílico terciário, diafanizado em 2 banhos de xilol e montado em bálsamo do Canadá (Deitch, 1966a).

4.2. Micro-espectrofotometria.

Nas lâminas submetidas à coloração pelo fast green em pH 8,1 e 2,7 foram determinadas curvas espectrais para as heterocromatinas e eucromatinas, com o citofotômetro Zeiss, segundo procedimentos semelhantes aos relatados para as lâminas submetidas à reação de Feulgen. Com base na análise dessas curvas ($n = 10$), escolheram-se os comprimentos de onda adequados para se efetuar a citofotometria por duplo comprimento de onda dos núcleos totais ou para se realizar um "varredura manual" das zonas heterocromáticas e eucromáticas em separado.

Para a determinação das curvas espectrais foram utilizados: objetiva Pol-Neofluar 63/0.90, optovar 2, diafrag-

ma de mensuração com diâmetro igual a 0,16mm, diafragma de campo com diâmetro igual a 0,2mm. Para as medidas de transmitância segundo o método de duplo comprimento de onda, foram usados: objetiva Plan 40/0.65, optovar 1,25, diafragma de mensuração com diâmetro igual a 1,6mm, diafragma de campo com diâmetro igual a 0,4mm. Para as medidas de extinção, segundo a "varredura manual", empregou-se objetiva Pol-Neofluar 63/0.90, optovar 2, diafragma de mensuração com diâmetro igual a 0,16mm e diafragma de campo com diâmetro igual a 0,3mm.

O cálculo dos valores fast green-histonas e a distribuição dos mesmos numa escala em progressão geométrica foram realizados segundo os procedimentos descritos para os valores Feulgen-DNA.

*

*

*

R E S U L T A D O S

1. Grau de estabilidade frente à hidrólise ácida e espectros de absorção das cromatinas submetidas à reação de Feulgen

1.1. Dados Feulgen-DNA obtidos após citofotometria segundo "varredura manual"

Os tipos de núcleos estudados no presente trabalho podem ser observados nas figuras 1 e 2. Os núcleos com um único cromocentro, presentes ao longo de todos os tubos de Malpighi até o 3º instar ninfal, passam a ser encontrados, a partir do 4º instar, predominantemente na porção proximal desses órgãos. Neste mesmo estadio de desenvolvimento das ninfas, núcleos com vários cromocentros se tornam, com frequência, presentes na região distal dos tubos de Malpighi (Fig. 1). Ocasionalmente, porém, uma ou duas células do tipo proximal (núcleos com um único corpo heterocromático) poderão ser encontradas em meio a células do tipo distal (núcleos com vários cromocentros), principalmente próximo à região mediana dos tubos de Malpighi (Fig. 2).

Alguns aspectos da resposta à reação de Feulgen nas cromatinas submetidas a diferentes fixadores e tempos de hidrólise acham-se visualizados nas figuras 3, 4 e 5.

Os núcleos dos tubos de Malpighi não se apresentaram corados em algumas condições experimentais utilizadas, ou seja, quando o tempo de hidrólise foi muito curto:

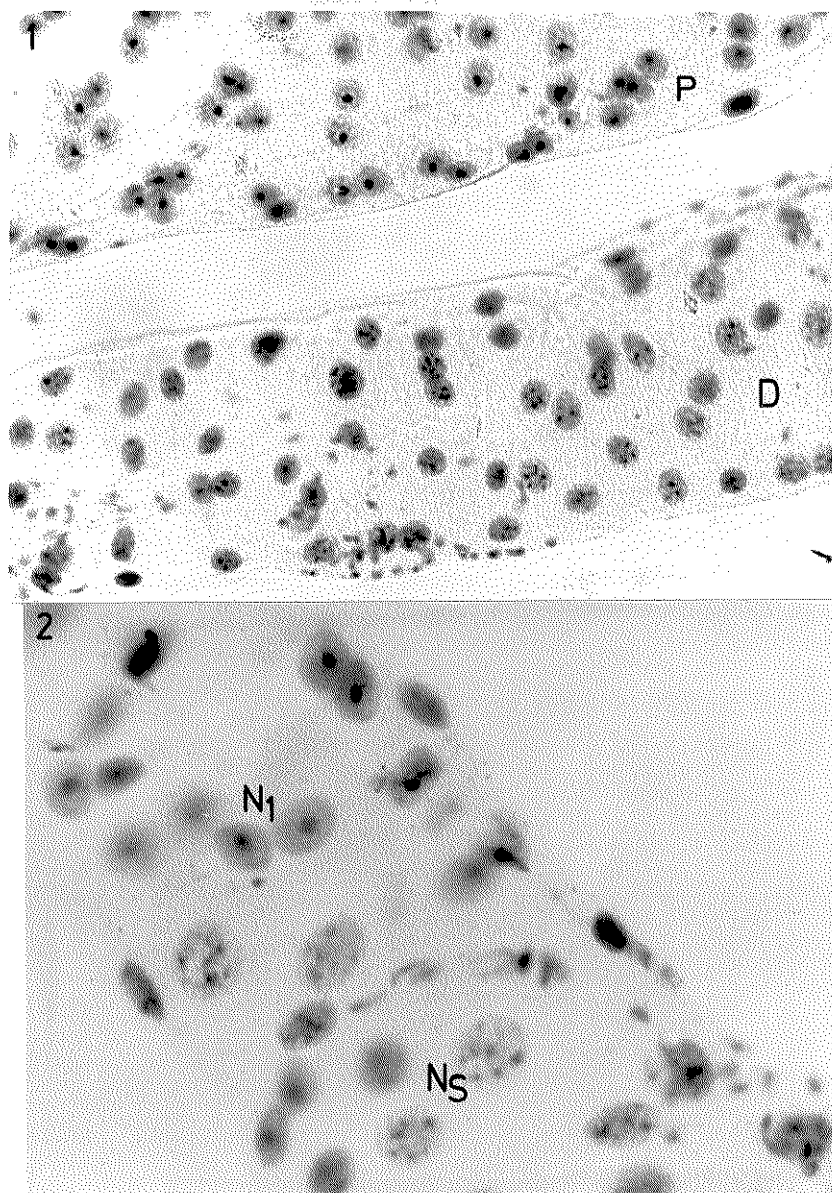


Fig. 1. Núcleos com um e vários cromocentros, localizados em diferentes porções dos tubos de Malpighi de uma ninfa do 5º instar, após reação de Feulgen. D = região distal; P= região proximal.

Fig. 2. Núcleos com um cromocentro (N_1) em meio aos núcleos com vários corpos heterocromáticos (N_s), numa porção media na de um dos tubos de Malpighi de ninfa do 5º instar (reação de Feulgen).

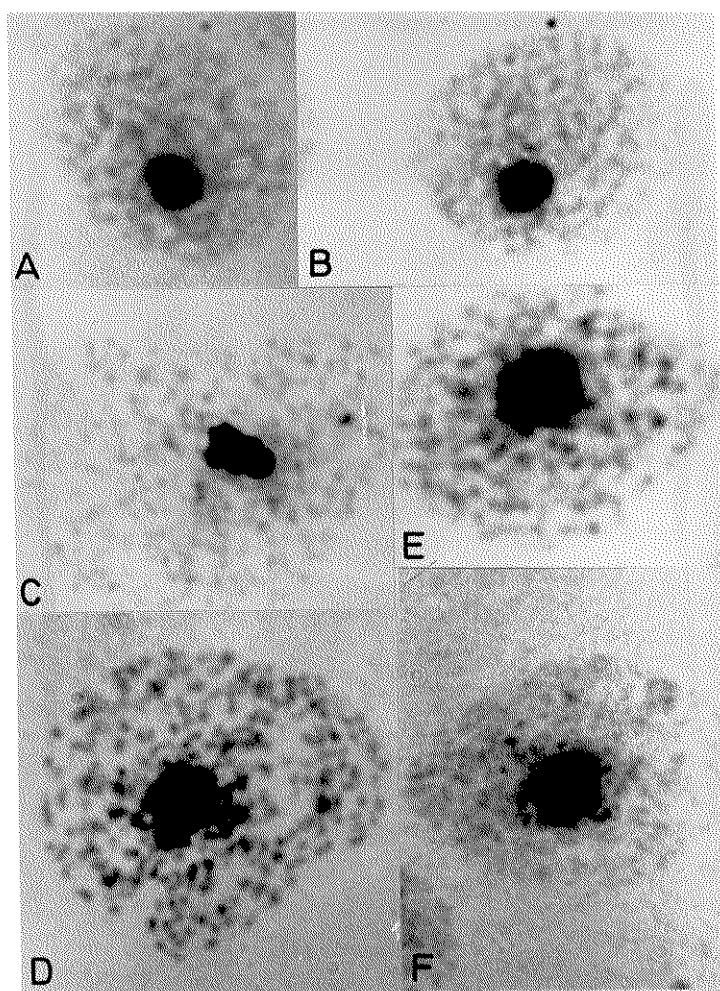


Fig. 3. Núcleos com um único cromocentro fixados em etanol-acético e submetidos à reação de Feulgen. Tempos de hidrólise: 4h (A), 13h40min (B), 18h (C), 21h (D), 24h (E) , 31h (F).

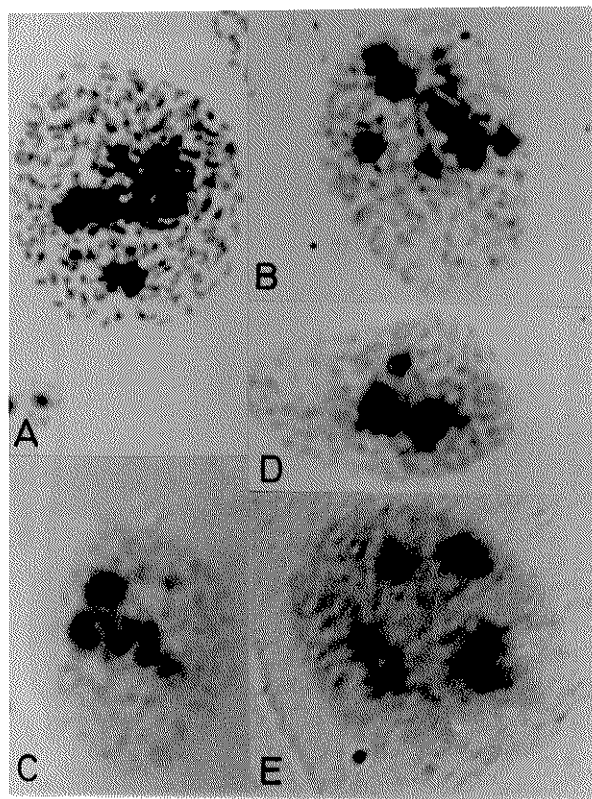


Fig. 5. Núcleos com vários cromocentros, fixados em MFA. Tempos de hidrólise: 15h (A), 18h (B), 21h (C), 24h (D), 27h (E).

<u>fixador</u>	<u>tempos de hidrólise</u>
etanol-ácido acético	30min, 1h
formol a 10%	1h, 2h, 3h, 6h, 7h
MFA	2h, 3h, 6h, 7h30min, 12h

Os valores Feulgen-DNA em unidades arbitrárias, determinados separadamente para as áreas heterocromáticas e eucromáticas através de um método citofotométrico de "varredura manual", num $\lambda = 550\text{nm}$, e plotados em histogramas de frequência, acham-se apresentados nas figuras 6 a 8. Foram colocados em gráfico apenas os conjuntos de dados para os quais $n > 10$.

Através da análise dos conjuntos de histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA pode-se inferir que:

1. como regra, os valores Feulgen-DNA das eucromatinas são sempre superiores aos das heterocromatinas respectivas, nos diferentes tempos de hidrólise, exceto em parte do material fixado em etanol acético e hidrolisado além de 24h (Fig. 6). As distribuições dos valores Feulgen - DNA das eucromatinas de núcleos submetidos a esse fixador e hidrolisados até 18h em HCl 0,1N, apresentam-se ocupando intervalos superiores e praticamente não sobreponíveis aos das distribuições das heterocromatinas. À medida que avança o tempo de hidrólise, contudo, os histogramas vão se tornar sobreponíveis em larga proporção. Ao redor de 24h de hidrólise, os valores relativos às eucromatinas decrescem, enquanto os das heterocromatinas permanecem ocupando praticamente os mesmos intervalos de classe. Isto se verifica principalmente em núcleos com um único cro-

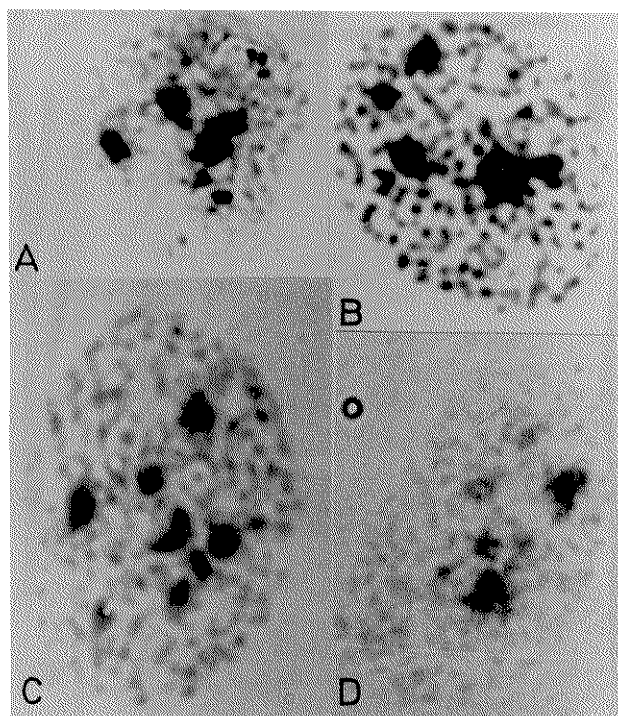


Fig. 4. Núcleos com vários cromocentros fixados em formol a 10% e submetidos à reação de Feulgen. Tempos de hidrólise : 15h (A), 18h (B), 21h (C), 27h (D).

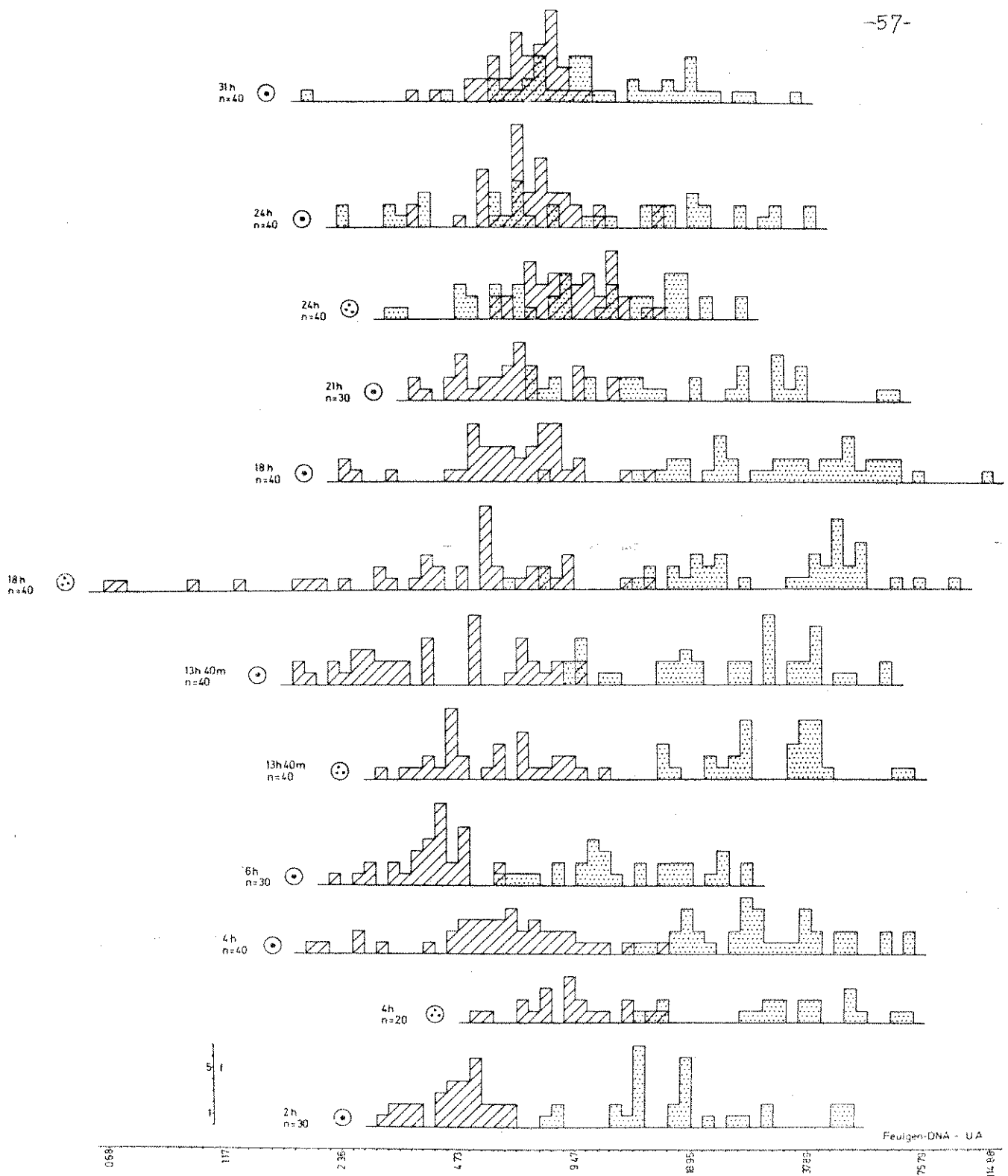


Fig. 6. Histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA de núcleos fixados em etanol acético e hidrolisados em HCl 0,1N. ● = núcleos com um cromocentro; ⊙ = núcleos com vários cromocentros; histogramas hachureados = heterocromatinas; histogramas pontilhados = eucromatinas.

nocentro. Assim, os valores Feulgen-DNA da eucromatina de alguns núcleos serão, portanto, até menores do que os da heterocromatina respectiva (Fig. 6).

2. no material fixado em formol as sobreposições das distribuições de valores Feulgen-DNA referentes às regiões hetero- e eucromáticas são raras (Fig. 7). No material fixado em MFA predominam sobreposições de pequenas partes das distribuições mencionadas (Fig. 8).
3. diferenças quanto à localização das distribuições de frequência na escala de valores Feulgen-DNA, quando se comparam heterocromatinas (e eucromatinas) de núcleos com um e com vários cromocentros (mesmo tempo de hidrólise) não são muito marcantes no material fixado em etanol acético (Fig. 6). Nos tubos de Malpighi fixados em formol, considerando-se os tempos de hidrólise empregados, há muita semelhança nos perfis e localização das distribuições dos valores Feulgen-DNA de H_1 comparada à H_s e de E_1 comparada à E_s (Fig. 7). Por outro lado, no material fixado em MFA, e levando-se em conta o número variável de observações por experimento, observa-se diferença na localização e perfil das distribuições de valores Feulgen-DNA principalmente das eucromatinas, nos tempos de 21 e 24h de hidrólise (Fig. 8).
4. os valores máximos Feulgen-DNA não são aparentemente atingidos num mesmo tempo de hidrólise, quando se varia a fixação. São também encontradas variações em função dos tipos cromatínicos (Tabela I). Tais observações fo-

F - HCl 0,1N

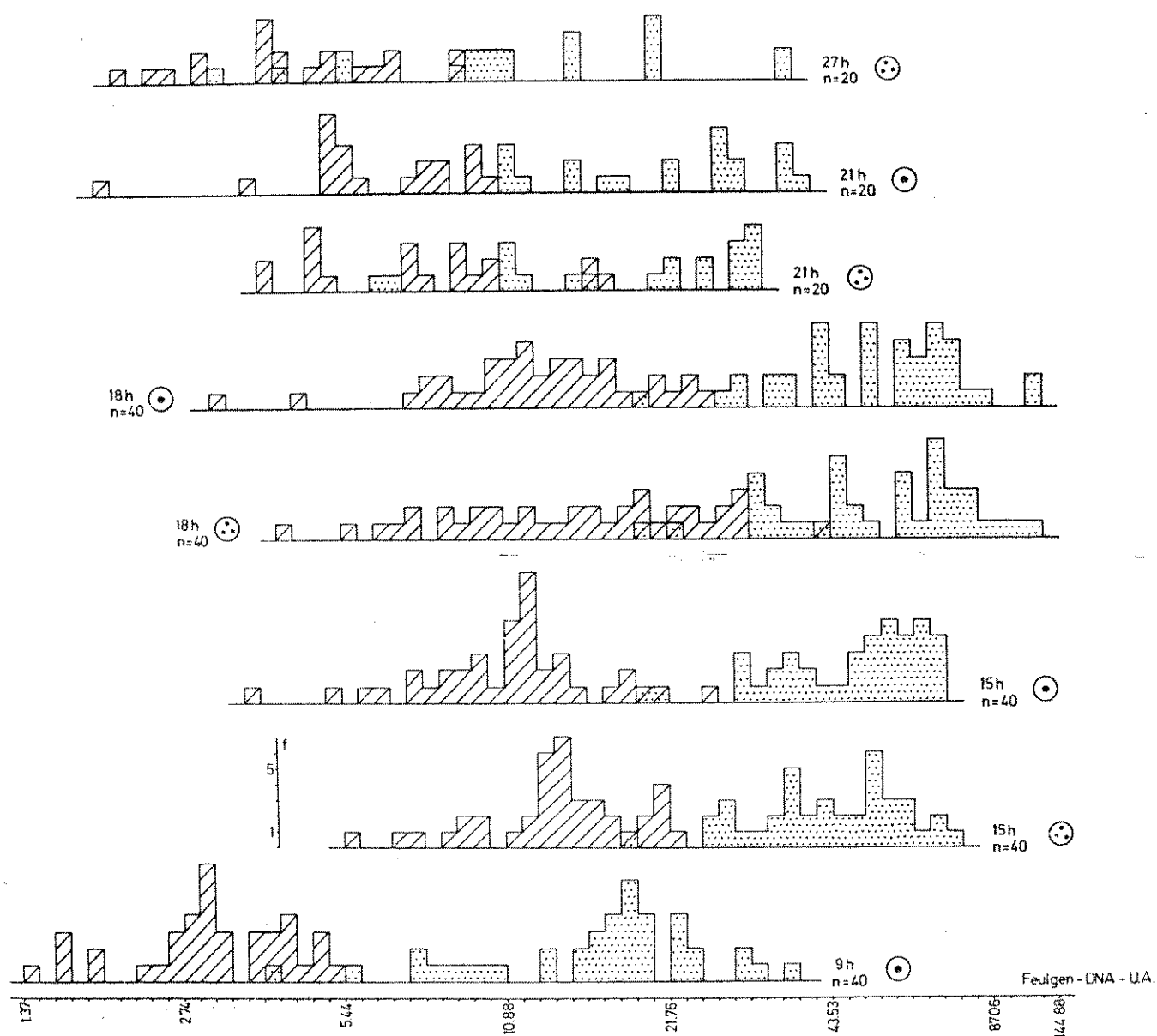


Fig. 7. Histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA de núcleos fixados em formol a 10% e hidrolisados em HCl 0,1N. ● = núcleos com um cromocentro; ⊙ = núcleos com vários cromocentros; histogramas hachureados = heterocromatinas; histogramas pontilhados = eucromatinas.

B-HCl 0,1N

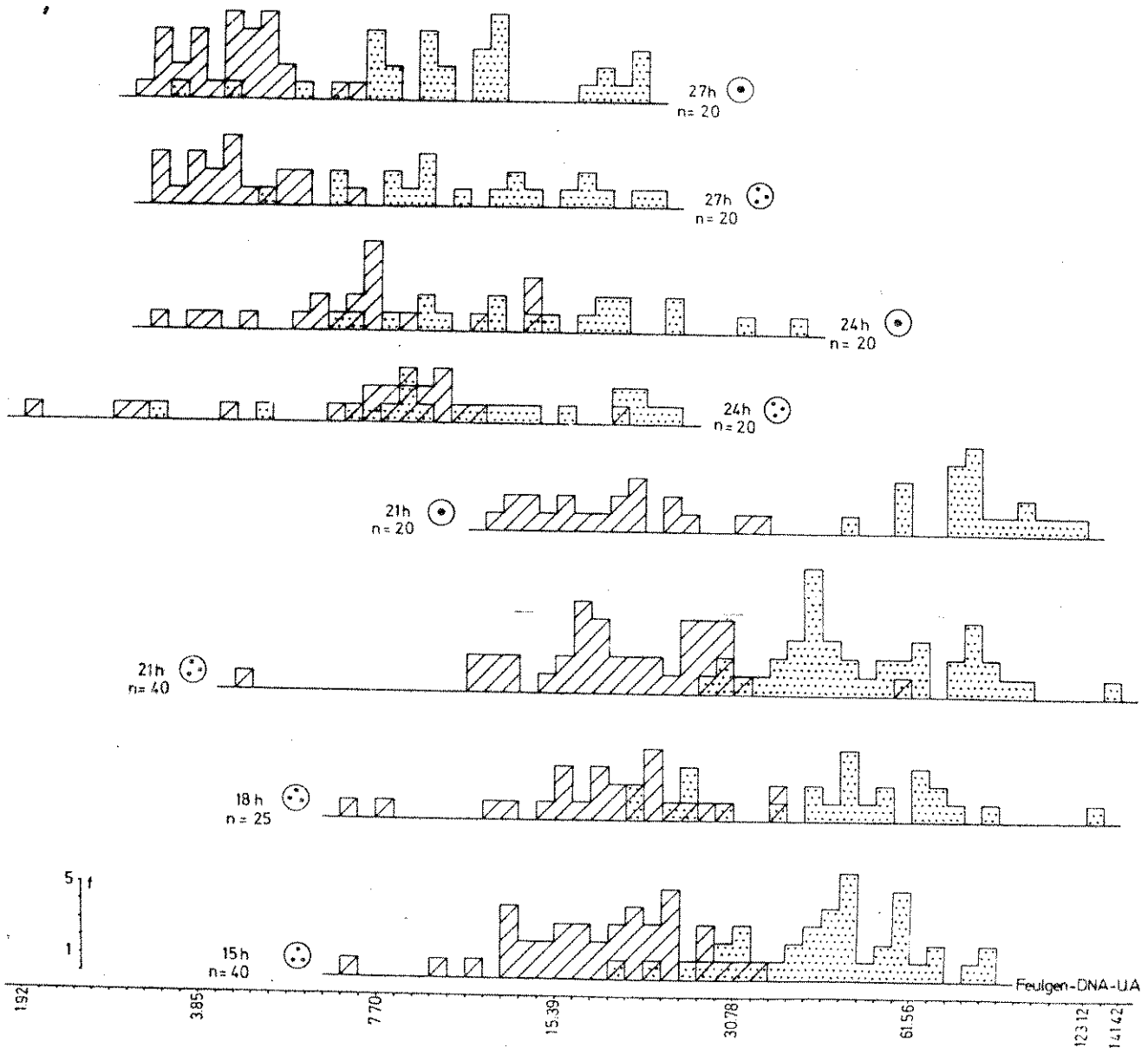


Fig. 8. Histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA de núcleos fixados em MFA e hidrolisados em HCl 0,1N. $\odot$ = núcleos com um cromocentro; $\odot\odot\odot$ = núcleos com vários cromocentros; histogramas hachureados = heterocromatinas; histogramas pontilhados = eucromatinas.

ram baseadas na posição ocupada pelos histogramas na escala de valores Feulgen-DNA, nas várias condições experimentais.

TABELA I. Tempos de hidrólise correspondendo aos valores Feulgen-DNA máximos nas diferentes condições experimentais e inferidos através da localização dos histogramas de frequência na escala de valores Feulgen-DNA.

Fixadores	Tempos de hidrólise (h)			
	H_1	E_1	H_s	E_s
Etanol-ácido acético	18	18	24 (21?)	18
Formol	18	18	18	18
MFA	21	21	18 a 21	15 a 21

5. Os valores Feulgen-DNA mais elevados apresentados por H_1 , H_s e E_1 foram encontrados em núcleos fixados em MFA (21h de hidrólise) e os de E_s em núcleos fixados em formol (18h de hidrólise).

Em outras palavras, os principais pontos salientados pelos resultados do presente sub-capítulo podem ser assim resumidos:

- há alteração nas relações que os histogramas da cromatina condensada e não condensada guardam entre si, à medida que

- avança a hidrólise, em algumas condições experimentais. Podem ocorrer, inclusive, sobreposições parciais desses histogramas. É salientado, portanto, um comportamento diferente das hetero- e eucromatinas frente à hidrólise ácida, e que varia em função da fixação a que se submete o material.
- os valores Feulgen-DNA das heterocromatinas são inferiores aos das eucromatinas em todos os experimentos analisados, exceto em parte dos núcleos fixados em etanol-acético e hidrolisados em HCl 0,1N em tempos além de 24h.
 - diferenças entre os perfis dos histogramas referentes a H_1 e H_2 e também entre os de E_1 e E_2 somente se verificam em alguns poucos tempos de hidrólise e dependem da fixação usada.
 - há variação nos valores Feulgen-DNA máximos alcançados, em função da fixação. Algumas poucas diferenças são também encontradas em função dos tipos cromatínicos. Os valores Feulgen-DNA máximos são apresentados pelos núcleos fixados em MFA e em segundo lugar pelos fixados em formol.

A validade do uso do método citofotométrico na obtenção dos dados relatados foi testada, comparando-se os valores Feulgen-DNA do núcleo total obtidos a partir dos métodos citofotométricos de "varredura manual" (valores avaliados na heterocromatina somados aos da eucromatina) e de duplo comprimento de onda.

1.2. Dados Feulgen-DNA obtidos após citofotometria por duplo comprimento de onda.

Como primeiro passo para a seleção dos dois comprimentos de onda operacionais para análise citofotométrica segundo o método de Patau (1952) e Ornstein (1952), foram determinadas as curvas espectrais de absorção para as áreas heterocromáticas e eucromáticas dos núcleos corados.

Os comprimentos de onda escolhidos através da análise dos resultados referentes às curvas espectrais foram 500 e 550nm. Dois dos conjuntos de dados percentuais de absorção mais expressivos, bem como o coeficiente de variação das extinções relativas nos diferentes comprimentos de onda acham-se relatados nas tabelas II e III, como exemplos da sequência de procedimentos efetuados para a escolha dos dois comprimentos de onda operacionais.

O perfil das curvas espectrais das cromatinas submetidas à reação de Feulgen nas diferentes condições experimentais, bem como os dados levantados na comparação dessas curvas entre si acham-se relatados num sub-capítulo à parte.

Segundo Garcia e Iorio (1966), quando a escolha do par de comprimentos de onda a ser utilizado na avaliação das transmitâncias é acertada, os valores Feulgen-DNA determinados nesses λ deverão ser relativamente constantes para medidas efetuadas em diferentes áreas de mensuração (que não sejam muito maiores do que a área de absorção), o que não acontece se determinados em outros pares de λ . Portanto, para o par ideal de comprimentos de onda, o coeficiente de variação das medidas deverá ser menor do que os de medidas efetuadas em outros λ . Esse teste foi também realizado no presente trabalho. Dentre os

TABELA II. Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos com um único cromocentro, fixados em etanol acético, hidrolisados por 13h40min em HCl 0,1N e corados pelo reativo de Schiff (n= 15 curvas).

λ (nm)	Heterocromatina		Eucromatina	
	$\bar{X} \pm S$	CV(%)	$\bar{X} \pm S$	CV(%)
610	26,9 $\pm$ 1,4	5,20	22,9 $\pm$ 1,5	6,55
600	48,5 $\pm$ 2,8	5,77	45,2 $\pm$ 2,6	5,75
590	71,3 $\pm$ 3,0	4,21	65,5 $\pm$ 1,6	2,44
580	89,8 $\pm$ 5,2	5,79	81,8 $\pm$ 3,5	4,28
575	98,3 $\pm$ 1,8	1,83	94,8 $\pm$ 0,2	0,21
570	98,5 $\pm$ 1,3	1,32	98,6 $\pm$ 0,4	0,41
565	97,7 $\pm$ 0,4	0,41	98,6 $\pm$ 0,7	0,71
560	92,9 $\pm$ 1,9	2,05	89,3 $\pm$ 1,0	1,12
555	89,1 $\pm$ 1,9	2,13	78,7 $\pm$ 1,5	1,91
<u>550</u>	<u>85,4 $\pm$ 3,0</u>	<u>3,51</u>	<u>64,3 $\pm$ 1,7</u>	<u>2,64</u>
540	77,0 $\pm$ 3,1	4,03	61,2 $\pm$ 8,6	14,05
530	71,7 $\pm$ 3,4	4,74	51,2 $\pm$ 8,8	17,19
520	61,5 $\pm$ 3,0	4,88	47,1 $\pm$ 9,5	20,17
510	53,6 $\pm$ 1,3	2,42	40,5 $\pm$ 11,0	27,16
<u>500</u>	<u>42,8 $\pm$ 1,2</u>	<u>2,80</u>	<u>33,3 $\pm$ 8,0</u>	<u>24,02</u>
490	31,1 $\pm$ 0,8	2,57	25,3 $\pm$ 7,2	28,46
480	22,2 $\pm$ 1,0	4,50	20,3 $\pm$ 2,3	11,33

$$E_{500}/E_{550} = 0,501$$

$$E_{500}/E_{550} = 0,517$$

TABELA III. Média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação das extinções relativas de núcleos com um único cromocentro fixados em formol a 10%, hidrolisados por 18h em HCl0,1N e corados pelo reativo de Schiff (n= 15 curvas)

λ (nm)	Heterocromatina		Eucromatina	
	$\bar{X} \pm S$	CV(%)	$\bar{X} \pm S$	CV(%)
610	14,7 $\pm$ 3,1	21,09	14,8 $\pm$ 7,0	47,30
600	28,1 $\pm$ 3,7	13,16	32,1 $\pm$ 6,6	20,56
590	39,3 $\pm$ 4,0	10,17	52,6 $\pm$ 5,3	10,08
580	61,1 $\pm$ 10,0	16,37	71,3 $\pm$ 3,8	5,33
575	74,9 $\pm$ 13,0	17,36	89,6 $\pm$ 3,3	3,68
570	90,1 $\pm$ 4,2	4,66	91,2 $\pm$ 4,1	4,50
565	98,8 $\pm$ 0,6	0,50	98,8 $\pm$ 1,0	1,01
560	95,7 $\pm$ 0,8	0,83	99,0 $\pm$ 0,5	0,51
555	87,8 $\pm$ 1,1	1,25	96,1 $\pm$ 0,6	0,62
<u>550</u>	<u>81,4 $\pm$ 1,6</u>	<u>1,97</u>	<u>90,9 $\pm$ 0,6</u>	<u>0,66</u>
540	69,9 $\pm$ 7,4	10,59	80,4 $\pm$ 1,7	2,11
530	65,7 $\pm$ 8,2	12,48	75,4 $\pm$ 4,2	5,57
520	60,9 $\pm$ 6,8	11,16	64,2 $\pm$ 3,3	5,14
510	55,7 $\pm$ 5,6	10,05	58,3 $\pm$ 5,0	8,58
<u>500</u>	<u>41,8 $\pm$ 5,7</u>	<u>13,63</u>	<u>48,7 $\pm$ 3,3</u>	<u>6,77</u>
490	34,3 $\pm$ 4,2	12,24	39,3 $\pm$ 2,8	7,12
480	21,2 $\pm$ 2,3	10,85	24,9 $\pm$ 2,5	10,04

$$E_{500}/E_{550} = 0,513$$

$$E_{500}/E_{550} = 0,535$$

vários núcleos analisados pode ser citado como exemplo o caso de um núcleo fixado em etanol acético e submetido à hidrólise em HCl 0,1N por 18h, em que os comprimentos de onda selecionados após análise das curvas espectrais seriam 500 e 550nm. Na tabela IV são encontrados os valores Feulgen-DNA desse núcleo, obtidos para diversos pares de λ e usando-se diversas razões área de mensuração/área de absorção. Quando a razão entre as áreas foi igual a 5,09, os valores Feulgen-DNA afastaram-se muito dos obtidos para razões de áreas que variaram de 3,25 a 3,41, provavelmente devido a um aumento em transmitância ocasionado pelo aumento excessivo em área não absorvente incluída no campo citofotometrado (Garcia e Iorio, 1966). Por esta razão, os dados levantados para tal relação específica de áreas foram excluídos do cálculo do coeficiente de variação para cada par de comprimentos de onda. O exame da tabela V revela que o menor valor de coeficiente de variação é aquele verificado para o par de comprimentos de onda 500-550nm. Além disso, quando se utiliza este par de comprimentos de onda, as flutuações instrumentais são casuais, uma vez que o valor do coeficiente de regressão b e o da inclinação da reta obtida, considerando-se as áreas de mensuração como abcissas e as estimativas Feulgen-DNA como ordenadas (Fig. 9), são nesse caso os que mais se aproximam de zero (Tabela V) (Garcia e Iorio, 1966).

Com base na análise de resultados como os das tabelas IV e V e nas considerações feitas acima, resolveu-se escolher uma área para mensuração das transmitâncias igual a $803,84 \mu^2$, o que possibilita uma razoável área não absorvente circundando os

TABELA IV. Valores Feulgen-DNA para um mesmo núcleo medido com diferentes áreas de mensuração e diferentes pares de comprimentos de onda. Área do núcleo considerado= $A_1 = 235,5\mu^2$.

Aumen- to da objeti- va (x)	Aumento do diâmetro do dia- fragma de campo (mm)	Diâmetro do dia- fragma de medi- da(mm)	A_2 (área de men- suração (μ^2)	A_2/A_1	Valores Feulgen-DNA em unidades arbitrárias para diferentes pares de λ					
					$\lambda_b = 570nm$	$\lambda_b = 520nm$	$\lambda_b = 540nm$	$\lambda_b = 550nm$	$\lambda_a = 505nm$	$\lambda_a = 500nm$
						$\lambda_a = 490nm$	$\lambda_a = 500nm$	$\lambda_a = 500nm$		
16	2	0,4	766,11	3,25	170,8	113,4	160,9	177,0		
16	1,25	0,4	778,92	3,31	170,6	101,3	144,9	174,5		
40	1,25	0,4	803,84	3,41	176,8	109,3	154,3	176,8		
16	1,6	0,4	1197,66	5,09	210,8	166,5	206,0	220,4		

núcleos sem que interfira significativamente nos valores de transmissão computados. Utilizou-se, portanto, para a citofotometria por duplo comprimento de onda, objetiva Plan 40/0,65 , optovar 1.25x, diafragma de medida com diâmetro igual a 1,6mm, diafragma de campo com diâmetro igual a 0,4mm, condensador objetiva 10/0,20 e ocular Kpl W MPM 12,5x.

TABELA V. Média aritmética, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), amplitude de variação (AV) e coeficiente de regressão $\hat{\beta}$ (Garcia e Iorio, 1966) dos valores Feulgen-DNA em unidades arbitrárias do núcleo analisado na tabela IV, considerando-se diferentes pares de λ e usando-se as três primeiras áreas de medida relatadas na referida tabela. O par de λ 500 e 550nm é o que melhor preenche os requisitos intrínsecos ao método citofotométrico.

λ (nm)	$\bar{X} \pm S$	CV(%)	AV	$\hat{\beta}$
b = 570 a = 505	172,7 $\pm$ 3,5	2	6,2	+0,171
b = 520 a = 490	108,0 $\pm$ 6,1	5,6	12,1	-0,050
b = 540 a = 500	153,3 $\pm$ 8,0	5,2	16,0	-0,099
b = 550 a = 500	176,1 $\pm$ 1,4	0,8	2,5	+0,008

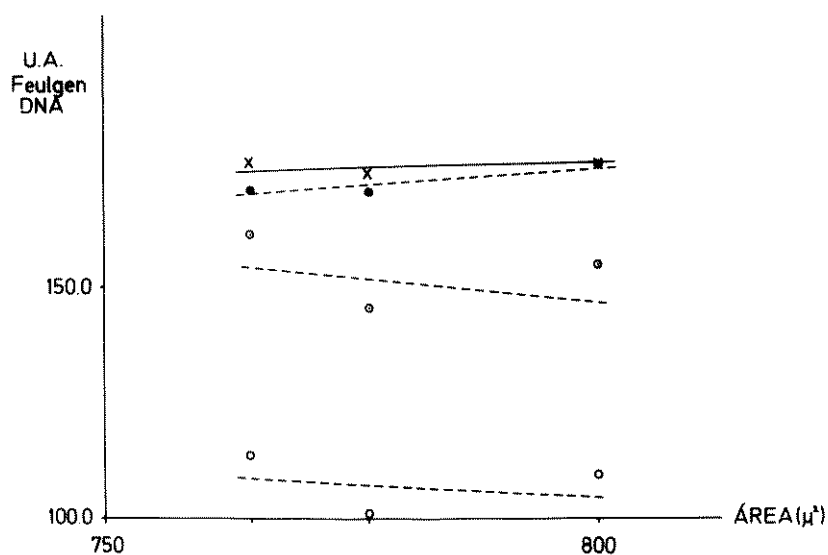


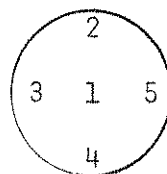
Fig. 9. Retas de regressão obtidas após determinação dos valores de transmitância em diferentes pares de comprimentos de onda (Tabelas IV e V).

- = 505-570nm
- = 490-520nm
- ⊙ = 500-540nm
- x = 500-550nm

Variando-se a posição de um núcleo dentro de um campo de medida e determinando-se o valor da transmitância nas diferentes posições, pôde-se constatar a homogeneidade da luz e da resposta do fotocátodo, uma vez que a diferença máxima de transmitâncias observada entre as posições 3 (ou 4) e 5 foi de apenas 0,44% (Tabela VI).

TABELA VI. Teste de homogeneidade da luz e uniformidade da resposta do fotocátodo em um núcleo fixado em etanol acético ($\lambda = 570\text{nm}$; área de mensuração = $1962,50 \mu^2$; diâmetro do diafragma de campo = $0,8\text{mm}$).

Posição	Transmitância : leituras em triplicata	Média aritmética das transmitâncias por posição
1	90,1; 90,0; 90,0	90,0
2	90,0; 90,0; 90,0	90,0
3	90,0; 89,7; 89,9	89,9
4	90,0; 89,8; 89,8	89,9
5	90,4; 90,2; 90,4	90,3



1.3. Correlação dos dados Feulgen-DNA obtidos pelos dois métodos citofotométricos.

Calculados os valores Feulgen-DNA dos núcleos totais, através dos dois métodos citofotométricos, foram a seguir determinados os coeficientes de correlação r entre eles.

$$r_{xy} = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{(n-1) S_X S_Y},$$

sendo: X , os valores Feulgen-DNA determinados pelo método de "varredura manual" e
Y , os valores Feulgen-DNA obtidos através da citofotometria por duplo comprimento de onda.

Para todos os casos estudados, os valores de r foram positivos. A relação desses valores para os diferentes experimentos, bem como o seu nível de significância (Snedecor, 1940-apud Graner, 1952) acham-se descritos nas tabelas VII, VIII e IX. No geral, há uma variação altamente correlacionada entre as séries de variáveis X e Y, pois o valor de r encontrado é muito maior do que o respectivo valor em tabela (ao nível de $P_{0.01}$). Apenas no caso de núcleos com um único cromocentro, fixados em MFA, hidrolisados durante 18h em HCl 0,1N e esmagados, após a reação de Feulgen, em ácido acético a 45% (n= 6), há indicação de uma variação correlacionada das duas variáveis ao nível de $P_{0.05}$ (Tabela IX).

Nas figuras 10 e 11 foram colocados em gráfico conjuntos de valores Feulgen-DNA obtidos através do método citofotométrico de "varredura manual" (abcissas) e do método de duplo comprimento de onda (ordenadas) e respectivos valores de correlação r .

Nas presentes condições experimentais, portanto, infere-se que seja válida a utilização dos valores Feulgen-DNA avaliados após o método citofotométrico de "varredura manual", para a determinação das curvas de hidrólise nas áreas heterocromáticas e eucromáticas separadamente.

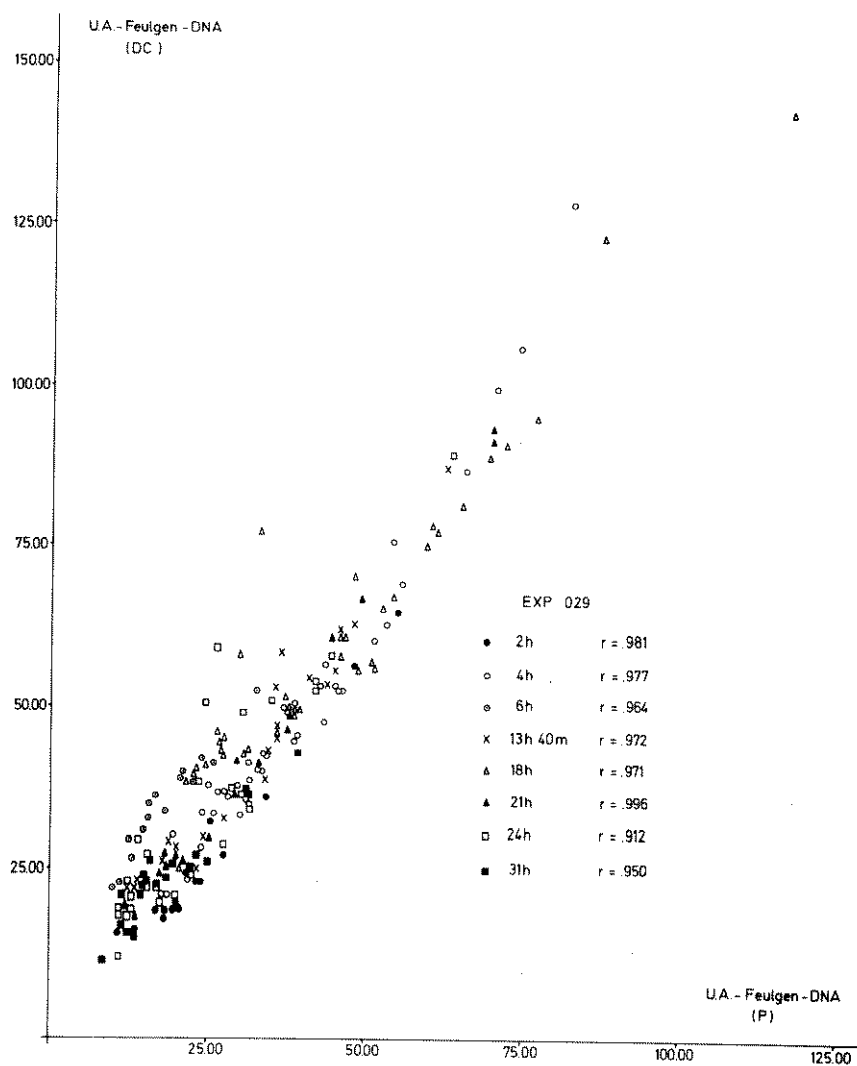


Fig. 10. Correlação entre os valores Feulgen-DNA obtidos pelos métodos de "varredura manual"(P) e de duplo comprimento de onda (DC) de núcleos com um cromocentro, fixados em etanol acético.

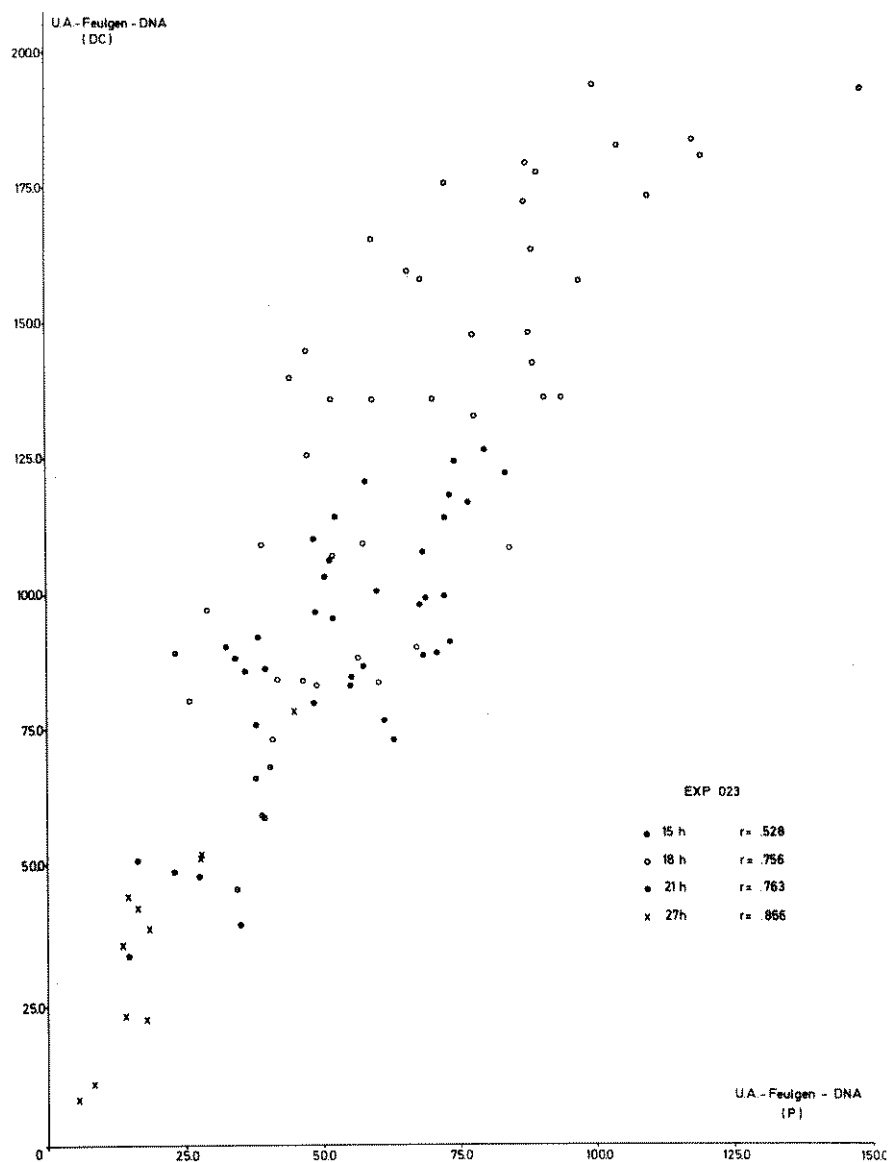


Fig. 11. Correlação entre os valores Feulgen-DNA obtidos pelos métodos de "varredura manual" (P) e de duplo comprimento de onda (DC) de núcleos com vários cromocentros fixados em formol a 10%.

TABELA VII. Correlação dos valores Feulgen-DNA determinados após métodos de "varredura manual" e duplo comprimento de onda em núcleos dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans fixados em etanol acético.

Tipos de núcleo	tempos de hidrólise	valores de r	graus de liberdade
UM cromocentro	2h	$0,981 > r_{0,01} = 0,62$	14
	4h	$0,977 > r_{0,01} = 0,39$	38
	6h	$0,964 > r_{0,01} = 0,64$	13
	13h40min	$0,972 > r_{0,01} = 0,55$	19
	18h	$0,971 > r_{0,01} = 0,39$	36
	21h	$0,996 > r_{0,01} = 0,61$	15
	24h	$0,912 > r_{0,01} = 0,49$	25
	31h	$0,950 > r_{0,01} = 0,56$	18
vários cromocentros	4h	$0,970 > r_{0,01} = 0,76$	8
	13h40min	$0,986 > r_{0,01} = 0,66$	12
	18h	$0,938 > r_{0,01} = 0,45$	30
	24h	$0,955 > r_{0,01} = 0,56$	18

TABELA VIII. Correlação dos valores Feulgen-DNA determinados após métodos de "varredura manual" e de duplo comprimento de onda em núcleos dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans fixados em formol a 10%.

tipos de núcleo	tempos de hidrólise (h)	valores de $\underline{r}$	graus de liberdade
um cromocentro	9	$0,898 > r_{0,01} = 0,45$	30
	15	$0,866 > r_{0,01} = 0,54$	21
	18	$0,845 > r_{0,01} = 0,39$	38
	21	$0,734 > r_{0,01} = 0,71$	10
vários cromocentros	15	$0,528 > r_{0,01} = 0,45$	31
	18	$0,756 > r_{0,01} = 0,39$	38
	21	$0,763 > r_{0,01} = 0,73$	9
	27	$0,866 > r_{0,01} = 0,73$	9

TABELA IX. Correlação dos valores Feulgen-DNA determinados após métodos de citofotometria por "varredura manual" e duplo comprimento de onda em núcleos dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans fixados em MFA.

tipos de núcleos	tempos de hidrólise(h)	valores de $\underline{r}$	graus de liberdade
um cromocentro	15	$0,935 > r_{0,01} = 0,92$	4
	18	$r_{0,01} = 0,92 > 0,843 > r_{0,05} = 0,81$	4
	21	$0,880 > r_{0,01} = 0,56$	18
	24	$0,709 > r_{0,01} = 0,62$	14
	27	$0,776 > r_{0,01} = 0,56$	18
vários cromocentros	15	$0,807 > r_{0,01} = 0,39$	36
	18	$0,892 > r_{0,01} = 0,55$	19
	21	$0,788 > r_{0,01} = 0,54$	22
	24	$0,855 > r_{0,01} = 0,71$	10
	27	$0,860 > r_{0,01} = 0,64$	13

1.4. Curvas de hidrólise

Se se considerar a média aritmética das amostras de valores Feulgen-DNA das heterocromatinas e eucromatinas em separado e seu respectivo intervalo de confiança nos diferentes tempos de hidrólise, serão obtidas curvas de hidrólise como as salientadas na figura 12. Nesta, pode-se observar que apenas os núcleos fixados em etanol acético apresentam curvas de hidrólise com dois picos bem distintos. Nota-se também que as cromatinas a se apresentarem primeiramente coradas são as fixadas em etanol acético (após 1h de hidrólise). As fixadas em formol somente irão exibir coloração após 7h de hidrólise e as fixadas em MFA, após 12h de hidrólise.

Os valores Feulgen-DNA máximos atingidos irão também variar para as diferentes cromatinas, conforme a fixação utilizada. Para as cromatinas fixadas em etanol acético ou formol a 10%, os tempos de hidrólise correspondentes aos valores máximos apresentados nas curvas da figura 12 mostram-se em acordo com aqueles inferidos através da localização dos respectivos histogramas de frequência na escala de valores Feulgen-DNA (Tabela I; Figs. 6 e 7). Contudo, para o material fixado em MFA, os picos das curvas de H_s e E_s são encontrados num mesmo tempo de hidrólise que H_1 e E_1 (Fig. 12). Isto difere do que se observa após análise dos conjuntos de histogramas de frequência respectivos (Fig. 8; Tabela I).

De modo geral, a observação das curvas de hidrólise da figura 12 indica valores Feulgen-DNA máximos nas heterocromatinas e em E_1 de células fixadas em MFA, vindo a seguir

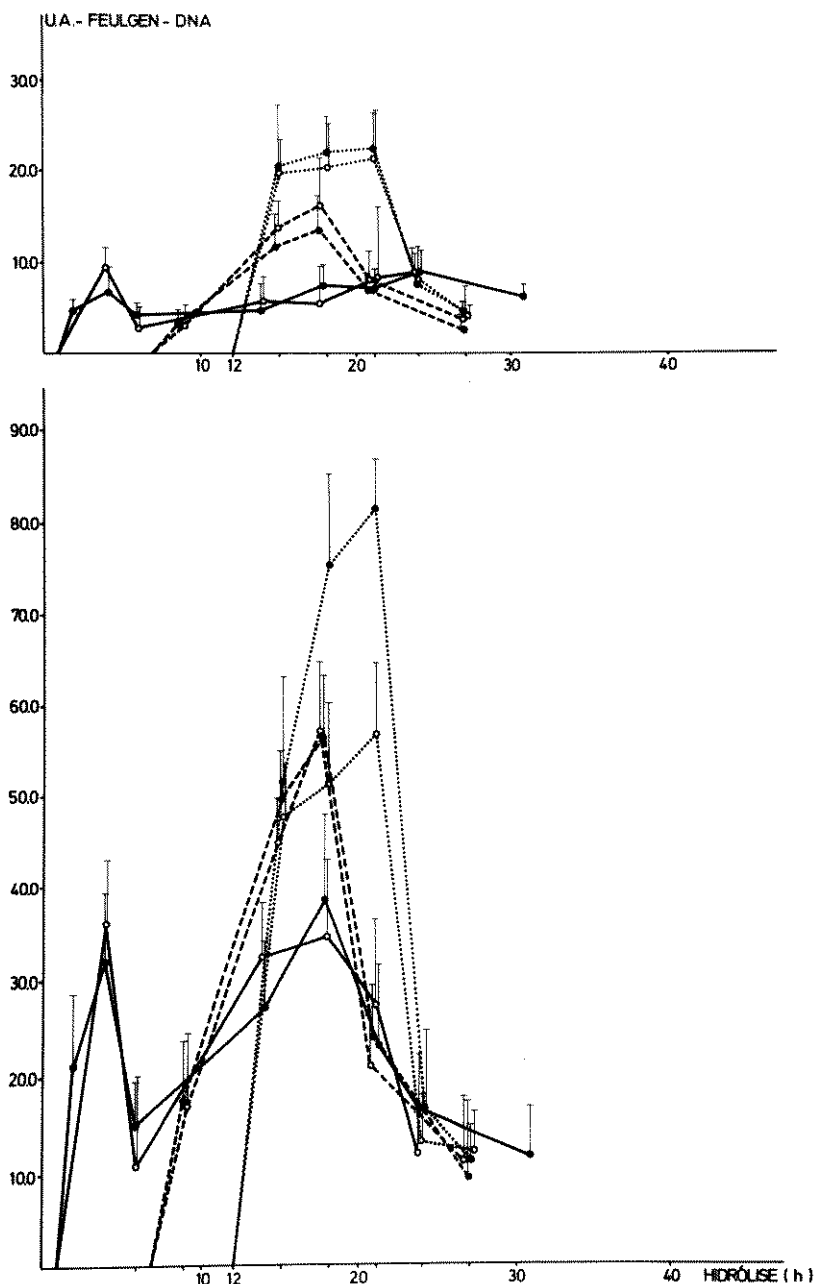


Fig. 12. Curvas de hidrólise para as heterocromatinas (H) e eucromatinas (E) fixadas em etanol acético (—), formal(- - -) ou MFA (.....), obtidas pela ligação dos valores correspondentes às médias aritméticas dos dados Feulgen-DNA em diferentes tempos de hidrólise. ● = núcleos com um cromocentro; ○ = núcleos com vários cromocentros. Acha-se indicada apenas a parte superior do intervalo de confiança das médias para evitar sobreposição do traçado das linhas.

as cromatinas fixadas em formol , E_s de células fixadas em MFA e, por fim, as cromatinas fixadas em etanol acético.

Quando as curvas de hidrólise são ajustadas à função de Bateman, obtêm-se representações como as das figuras 13 e 14, diretamente copiladas da impressão obtida após a elaboração matemática realizada pelo computador. Na figura 13 são apresentadas as curvas de E_1 e H_1 de núcleos fixados em etanol acético, bem como os pontos correspondentes a todos os valores Feulgen-DNA utilizados para o seu processo de ajuste à função matemática. Na figura 14 foram reunidas todas as curvas ajustadas correspondentes às aquelas esquematizadas na figura 12.

Após o ajuste, as curvas de hidrólise das cromatinas fixadas em etanol acético passam a apresentar um único pico, correspondendo a diferentes tempos de hidrólise , quando se comparam E_1 , E_s , H_1 e H_s (Fig. 14). E_s atinge valores máximos Feulgen-DNA maiores e num tempo de hidrólise anterior a E_1 . Contudo, E_1 apresenta a inclinação da parte descendente da curva menos abrupta do que E_s . Isto aparentemente estaria relacionado com uma maior resistência à despolimerização do ácido apurínico em E_1 , se comparada a E_s . A curva de H_s também atinge valores máximos Feulgen-DNA e entra em declínio antes da curva de H_1 . Contudo, os valores máximos de H_1 e H_s são praticamente coincidentes. Os valores máximos alcançados por H_1 e H_s ocorrem, segundo as curvas ajustadas, num tempo de hidrólise posterior aos de E_1 e E_s e se estendem por um espaço de tempo mais longo do que o destas últimas (Fig. 14).

As curvas de hidrólise das cromatinas fixadas

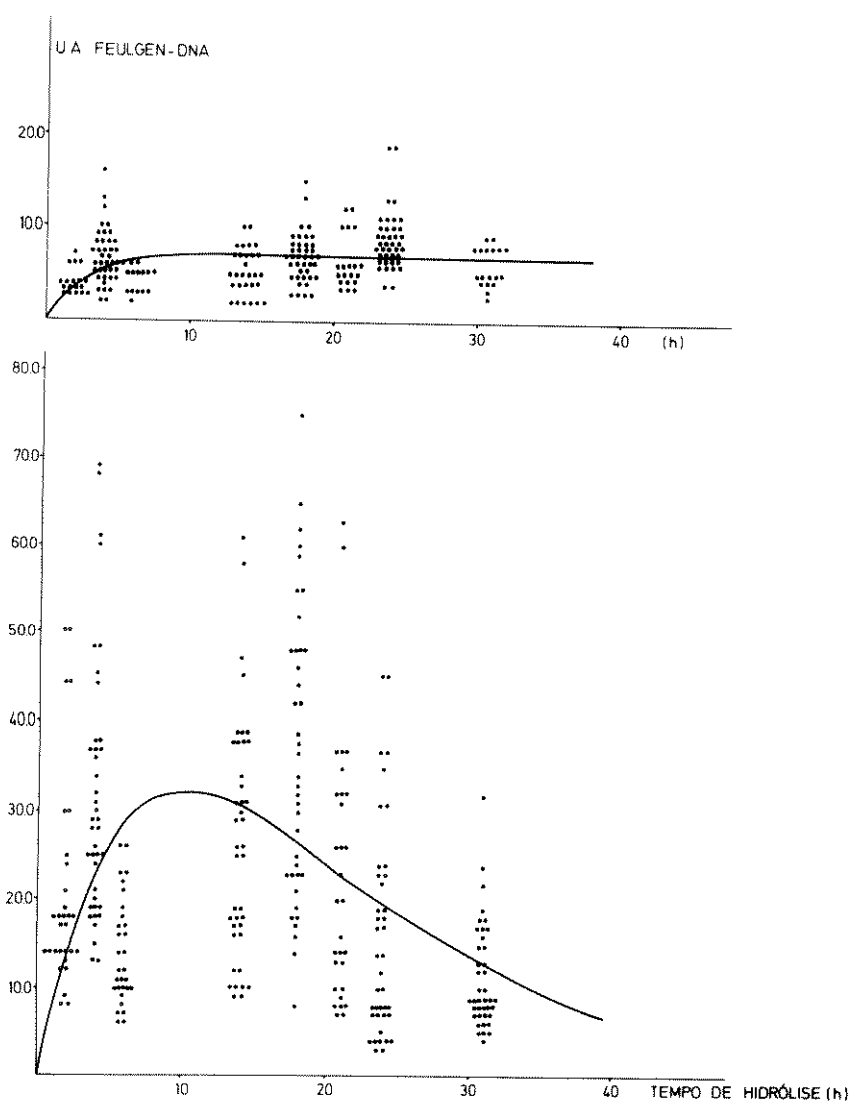


Fig. 13. Curvas de hidrólise ajustadas à função de Bateman, das cromatinas H_1 (curva superior) e E_1 (curva inferior) fixadas em etanol acético.

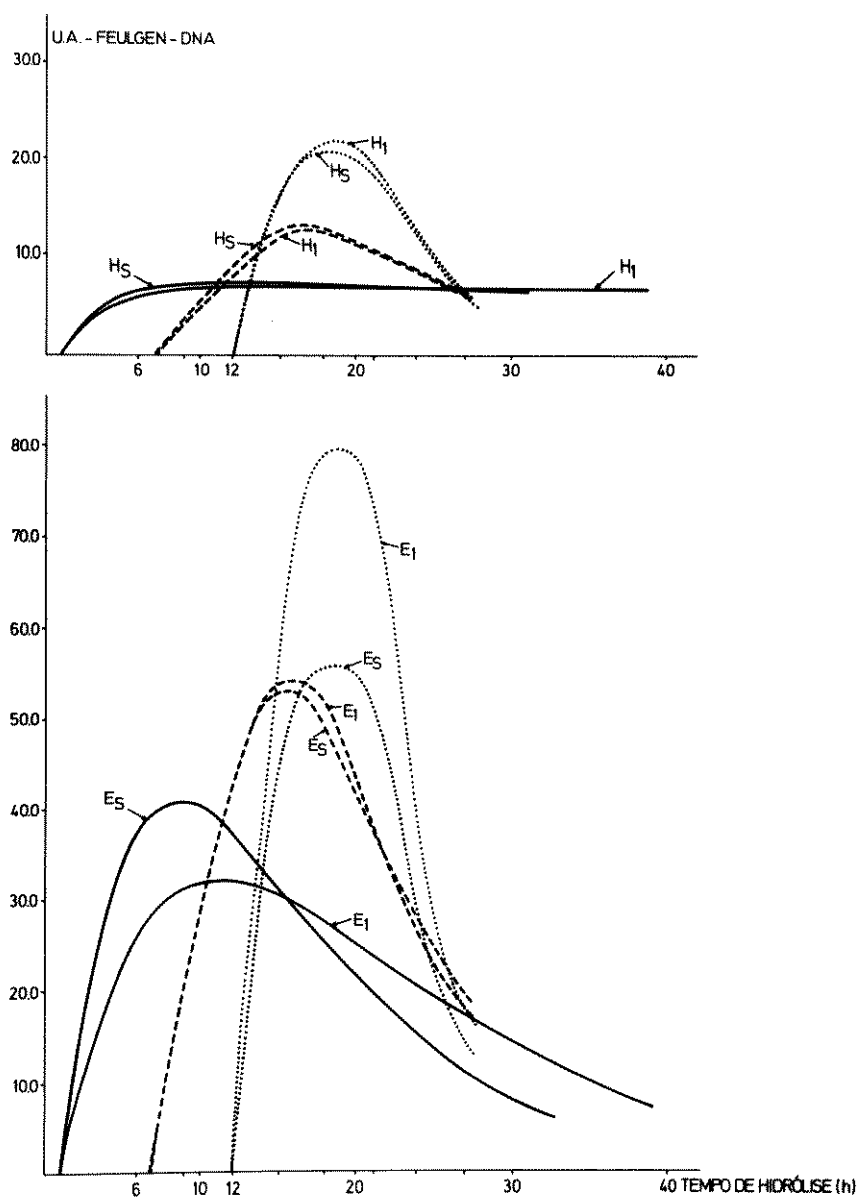


Fig. 14. Curvas de hidrólise ajustadas à função de Bateman, das heterocromatinas (H_1 e H_s) e eucromatinas (E_1 e E_s) fixadas em etanol acético (—), formol (- - -) ou MFA (.....).

em formol apresentam seus valores máximos mais elevados e num tempo de hidrólise subsequente aos das curvas de material fixado em etanol acético. As curvas de H_s e H_l são praticamente idênticas. O mesmo é válido para as porções ascendentes das curvas de E_s e E_l ; quanto às regiões descendentes destas curvas, dentro do intervalo de tempos de hidrólise estudados, há muita semelhança nos perfis. Os máximos das curvas de H_s , H_l , E_s e E_l são encontrados em tempos de hidrólise muito próximos, os quais são anteriores ao verificado nas curvas não ajustadas (Figs. 12 e 14).

Por outro lado, as curvas de hidrólise ajustadas, das cromatinas fixadas em MFA, apresentam os mais elevados valores máximos. Estes se localizam num único tempo de hidrólise, anterior ao observado nas curvas não ajustadas (Figs. 12 e 14). Além disso, esse tempo de hidrólise é posterior ao das curvas ajustadas correspondentes ao material fixado em formol (Fig. 14). As curvas de H_l e H_s são praticamente idênticas. Contudo, a curva de E_l apresenta seu valor máximo mais elevado do que o da curva de E_s .

Para o intervalo de tempo de hidrólise utilizados, há indicação de que as porções descendentes das curvas de hidrólise de material fixado em MFA e de H_l e H_s fixadas em formol possam chegar a valores inferiores aqueles apresentados por material fixado em etanol acético.

A partir das curvas ajustadas da figura 14 foram obtidas curvas de hidrólise com valores Feulgen-DNA percentuais, para facilitar a comparação entre elas (Figs. 15, 16 e

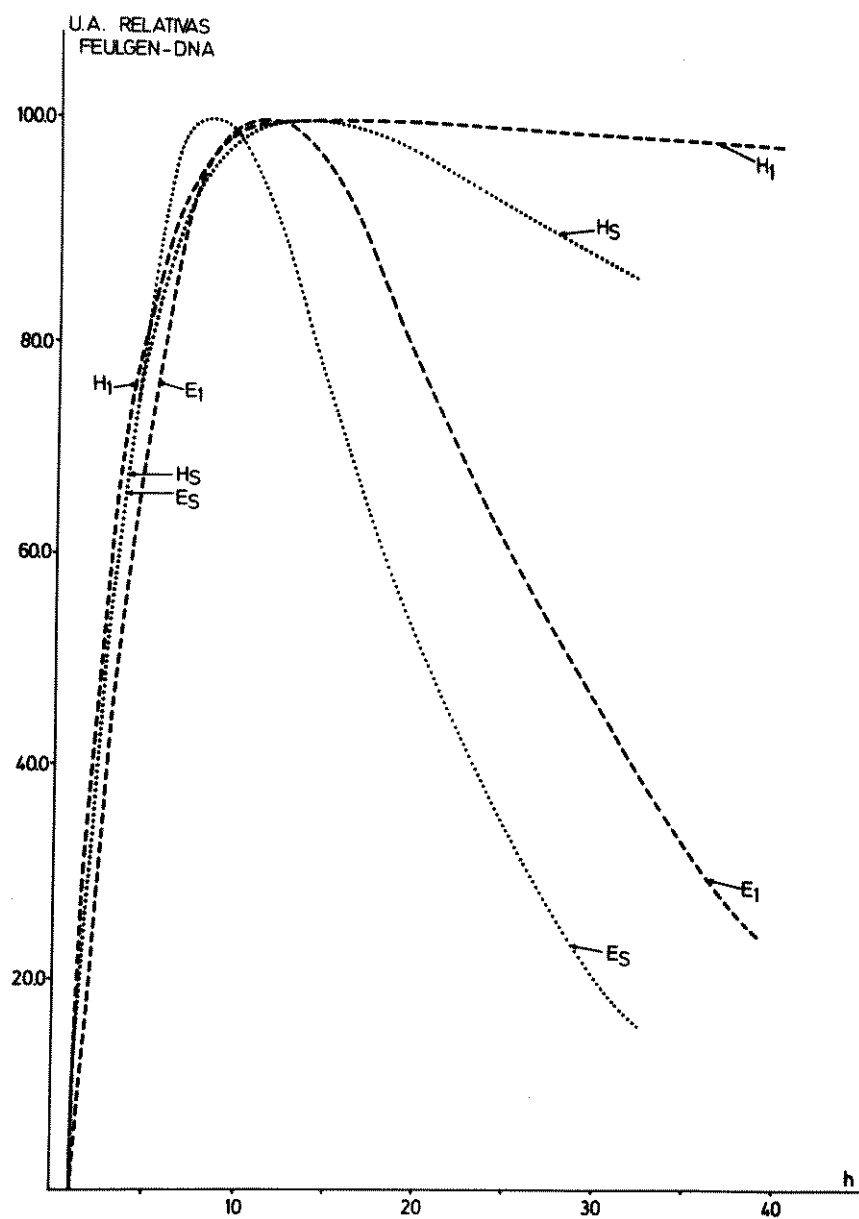


Fig. 15. Curvas percentuais de hidrólise, obtidas a partir daquelas esquematizadas na figura 14, para as cromatinas fixadas em etanol acético.

17. Considerando-se as curvas percentuais das cromatinas fixadas em etanol acético (Fig. 15), observam-se diferenças em extensão do intervalo de tempo ocupado por valores Feulgen-DNA máximos, quando se comparam as heterocromatinas com as eucromatinas. Nota-se também que a velocidade com que a porção descendente das curvas das heterocromatinas tende a atingir o eixo das abcissas é mais lenta do que a das eucromatinas respectivas. Há também diferenças nesse sentido, quando se compara H_1 com H_s e E_1 com E_s . Com relação à porção ascendente das curvas, entretanto, não se encontram diferenças tão marcantes como as da região descendente. A cromatina a apresentar inclinação mais abrupta da porção descendente da curva de hidrólise, com relação ao eixo das abcissas, é E_s . Por outro lado, é H_1 que demonstra inclinação mais suave dessa região com relação ao mesmo eixo.

Quanto às curvas percentuais das cromatinas fixadas em formol, observa-se muita semelhança entre elas (Fig. 16). H_1 e H_s são coincidentes. E_s e E_1 também praticamente o são, exceto talvez na porção final da parte descendente das curvas computadas, quando a de E_1 mostra-se levemente mais abrupta do que a de E_s .

Com relação ao material fixado em MFA, há também muita semelhança nos perfis das curvas (Fig. 17). Estas são praticamente coincidentes, com diferenças mínimas das eucromatinas E_1 e E_s quando comparadas às heterocromatinas, na porção descendente correspondendo aos tempos de hidrólise de 24-27 horas. Estas curvas apresentam porções ascendentes e descendentes com inclinação muito aguda e região de valores máximos pouco ex-

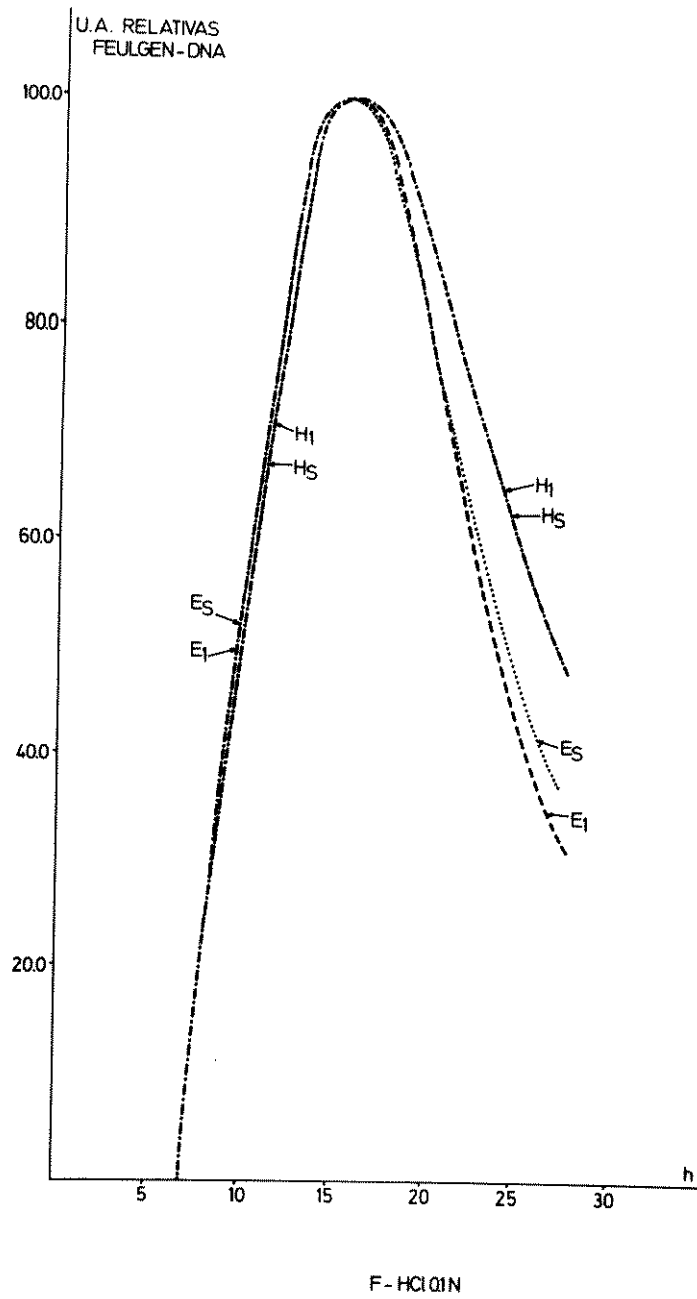


Fig. 16. Curvas percentuais de hidrólise, obtidas a partir daquelas esquematizadas na figura 14, para as cromatinas fixadas em formol.

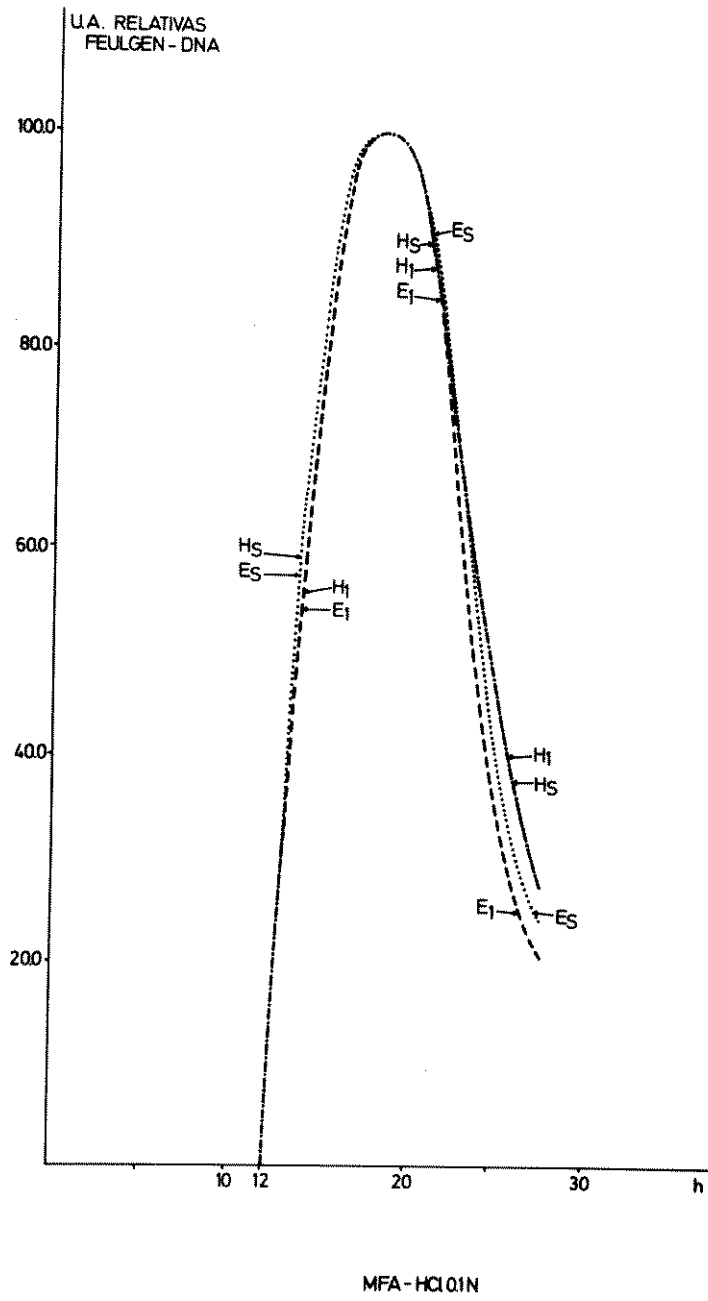


Fig. 17. Curvas percentuais de hidrólise, obtidas a partir daquelas esquematizadas na figura 14, para as cromatinas fixadas em MFA.

tensa.

As observações relativas às curvas de hidrólise ajustadas à função de Bateman, bem como às curvas percentuais encontram expressão equivalente através do cálculo das razões $(H_1/(E_1 + H_1)) \times 100$ ou $(H_s/(E_s + H_s)) \times 100$, bem como das razões $(H_1/(H_s + H_1)) \times 100$ e $(E_1/(E_s + E_1)) \times 100$ (Tabela X). Considerando-se principalmente os dados Feulgen-DNA percentuais, toda vez que os valores da heterocromatina forem aproximadamente iguais aos da eucromatina, $(H/(E + H)) \times 100 \approx 0,50$; quando $H > E$, $(H/(E + H)) \times 100 > 0,50$ e quando $H < E$, $(H/(E + H)) \times 100 < 0,50$. Analisando-se as razões obtidas a partir de dados Feulgen - DNA das curvas ajustadas e principalmente as das curvas percentuais, nota-se maior variação em seus valores, quando as cromatinas provêm de células fixadas em etanol acético. As variações são mínimas em material fixado em MFA. Um certo aumento em variação no valor de $(H_1/(E_1 + H_1)) \times 100$ das cromatinas fixadas em formol se faz notar nos tempos de 21 a 27h de hidrólise (Tabela X). As variações são mínimas para a razão $(H_1/(H_s + H_1)) \times 100$, mesmo para material fixado em etanol acético. Quanto à razão $(E_1/(E_s + E_1)) \times 100$, variação em seu valor é detectável preponderantemente no material fixado em etanol acético.

Hã, portanto, sugestão de não ocorrerem diferenças no comportamento das cromatinas frente à hidrólise, quando o material é fixado em MFA e mesmo em formol. Neste último caso, pode-se fazer algumas restrições com relação ao tempo de hidrólise de 27h. Nas células fixadas em etanol acético, contudo, E_1 se comporta diferentemente de H_1 ; idem E_s , de H_s e E_1 , de E_s .

TABELA X. Razão de valores Feulgen-DNA das cromatinas diferentemente fixadas e hidrolisadas. A=valores obtidos a partir das curvas de hidrólise ajustadas; b= valores obtidos das curvas ajustadas percentuais. Entre parênteses, abaixo de cada coluna, foram colocados os coeficientes de variação respectivos, em %.

Tempos de hidrólise (h)		$(H_1/(E_1+H_1))100$		$(H_s/(E_s+H_s))100$		$(H_1/(H_s+H_1))100$		$(E_1/(E_s+E_1))100$	
Fixadores		A	B	A	B	B	B	B	B
Etanol-ácido acético	2	23,0	58,3	15,6	50,6	50,8	46,0		
	4	20,2	55,6	15,0	48,8	50,4	39,9		
	6	16,8	51,5	18,1	55,1	50,0	54,6		
	13,66	18,2	50,5	22,9	61,2	50,3	58,2		
	21	20,4	53,4	26,5	67,3	51,0	61,1		
	24	22,9	57,7	31,9	71,9	51,8	63,4		
tíco	31	25,7	61,3	48,5	83,5	53,3	70,9		
		34,1	70,4	(46,4)	(19,96)	(2,23)	(18,74)		
		(23,9)	(11,16)						
Formol	9	14,7	47,5	16,2	47,5	50,0	50,0		
	15	18,5	50,0	19,5	50,0	50,0	50,3		
	18	19,5	50,7	20,8	51,0	50,0	50,3		
	21	21,8	53,4	22,5	53,0	50,0	48,7		
	27	(25,82)	(9,13)	(15,8)	(6,9)	(zero)	(3,20)		
MFA	15	22,6	50,0	23,5	50,0	48,9	48,9		
	18	21,9	50,0	27,4	50,0	50,0	50,0		
	21	21,4	50,0	26,5	49,6	50,0	49,6		
	24	23,5	55,3	30,5	52,1	50,0	46,7		
	27	27,5	56,0	30,7	53,5	49,8	46,6		
		(10,41)	(5,94)	(10,8)	(3,31)	(0,96)	(3,33)		

H_1 , em relação à H_S , mostra uma resposta semelhante, ao processo hidrolítico, com alguma restrição feita para o tempo de 3lh de hidrólise (Tabela X).

1.5. Análise do perfil das curvas espectrais de Feulgen.

De um modo geral, as curvas espectrais de absorção dos núcleos dos tubos de Malpighi submetidos à reação de Feulgen apresentaram um pico localizado frequentemente em $\lambda = 565-575\text{nm}$ e um ombro na região de $520-530\text{nm}$. Poucas diferenças foram detectadas nas curvas espectrais em função do tipo de cromatina considerada, da fixação e dos tempos de hidrólise. Estas diferenças residiram na variação em localização do máximo de absorção e no maior ou menor pronunciamento do ombro da curva.

Muitas vezes E_S apresentou o pico de absorção localizado num comprimento de onda mais curto do que E_S , geralmente após tempos longos de hidrólise, em material fixado em etanol acético (E_S , 565nm ; H_S , 575nm) ou MFA (E_S , 560nm ; H_S , 570nm). Quanto ao ombro da curva, em geral este se apresentou mais pronunciado nas heterocromatinas do que nas eucromatinas, especialmente quando o material era fixado em etanol acético ou formol e hidrolisado acima de 2lh (Fig. 18). Esse pronunciamento na heterocromatina aumentou à medida em que se prolongou o tempo de hidrólise. Simultaneamente, o máximo de absorção, às vezes, se deslocou para comprimentos de onda mais longos.

Os tempos de hidrólise para os quais as variações no perfil das curvas espectrais foram detectadas não coincidiram, quando se consideram as diferentes fixações.

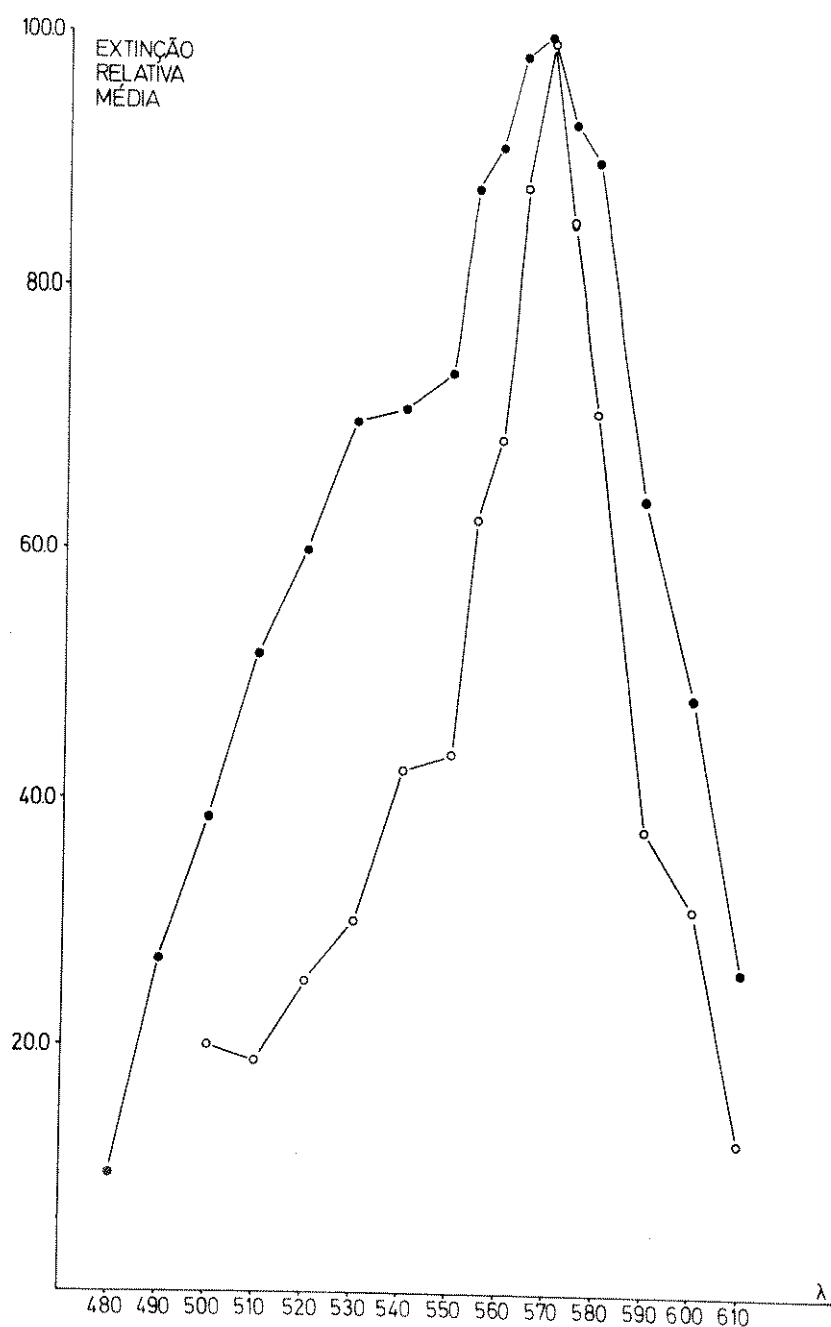


Fig. 18. Curvas espectrais de absorção de Feulgen, de H₁ (●) e E₁ (○), de núcleos fixados em etanol acético e hidrolisados 24h em HCl 0,1N (n = 15). Extinção em valores percentuais.

2. A basofilia das cromatinas após diferentes procedimentos citoquímicos.

Tanto as heterocromatinas como as eucromatinas dos núcleos dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans se coraram com soluções de azul de toluidina em diferentes pH (3,4 ; 4,0 e 5,0). Dada a intensidade da coloração a pH 5,0, a detecção citofotométrica dos valores de extinção se tornou prejudicada nas heterocromatinas, mesmo após digestão por RNase. Pôde-se apenas constatar que nas eucromatinas E_1 e E_s o pico de absorção da curva espectral se localizava em $\lambda = 570\text{nm}$, após digestão por RNase.

Já no material corado a pH 4,0 puderam ser realizadas mensurações dos valores de extinção principalmente em áreas menos densas dos cromocentros. Assim, foi possível comparar-se as curvas espectrais de basofilia das cromatinas entre si. Na tabela XI acham-se relatados os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção para as curvas espectrais obtidas em material submetido ou não ao tratamento por RNase. Observa-se que nas cromatinas não submetidas à digestão enzimática há uma tendência geral dos picos de absorção se localizarem em $\lambda = 570\text{nm}$. Após o tratamento pela RNase, os picos para as cromatinas H_s , E_s e E_1 deslocam-se para comprimentos de onda mais longos (590 e 580nm). Verifica-se também um ombro nas curvas espectrais, o que, anteriormente à digestão, somente se observava em H_1 .

Os perfis das curvas espectrais após tratamento pela RNase e coloração pelo azul de toluidina a pH 4,0 podem ser

TABELA XI. Curvas espectrais de basofilia das cromatinas do Triatoma infestans coradas com azul de toluidina a pH 4,0: comprimentos de onda dos máximos de absorção e dos ombros das curvas (n = 10 ou 9).

Cromati-		Comprimentos de onda (nm)		
nas	Sem trata- mento por RNase	Com tratamen- to por RNase	Denaturação- reassociação segundo Vidal, após RNase	2SSC NaOH 0,014M
H _s	570	590 520 (ombro)	560	560 580
H _l	570-580 540(ombro)	570 550 ou 540-550 (ombro)	555 600 (ombro)	560 570
E _s	570	590 560 (ombro)	570	560 570
E _l	570	580 560(ombro)	560-570	560 570

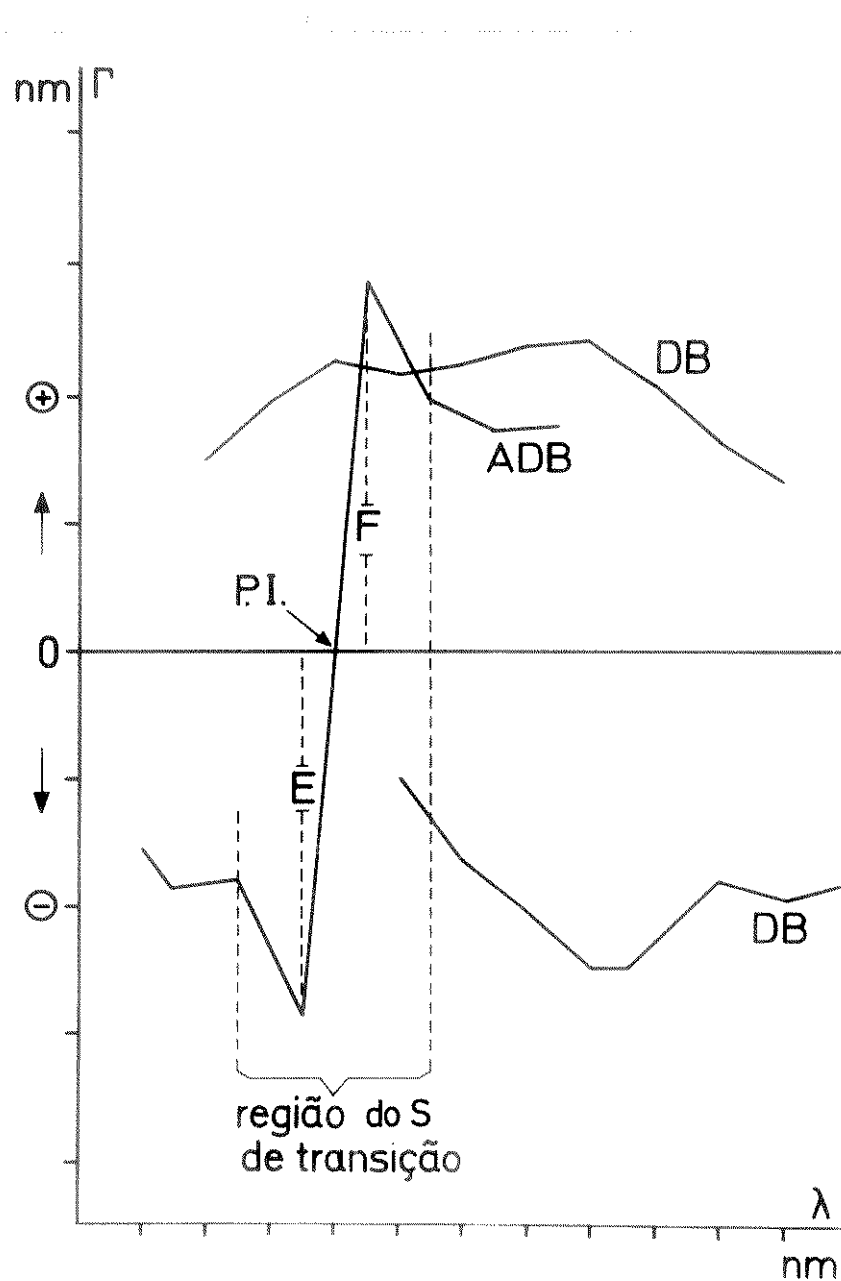


Fig. 29. Esquemas de curvas de dispersão normal (DB) e anômala (ADB) da birrefringência consideradas dentro de um certo intervalo de comprimentos de onda. No caso da ADB observa-se um ponto de inflexão (P.I.). Γ = retardos ópticos.

observados na figura 19. O valor dos índices metacromáticos ($E_{\lambda=555nm}/E_{\lambda=625nm}$) acha-se indicado em cada curva. De 10 núcleos com um cromocentro examinados, apenas um deles apresentou a curva para H_1 do tipo representado em tracejado nessa figura e que, em termos de perfil e valor do índice metacromático, mais se assemelha a H_S . Deve ser notado que o valor dos índices metacromáticos para as cromatinas de núcleos com vários cromocentros neste caso se aproxima de 1,00. Nos núcleos com um só cromocentro foram encontrados índices metacromáticos com valores ao redor de 1,20-1,30, o que se deve a um maior pronunciamento das absorções da região de $\lambda = 555nm$.

Em preparados submetidos à ação da RNase e subsequentemente corados com azul de toluidina a pH 3,4 foram feitas algumas observações em núcleos com apenas um cromocentro. Os picos de absorção continuaram sendo encontrados nos mesmos comprimentos de onda que os das curvas obtidas para pH 4,0 e os índices metacromáticos de H_1 aumentaram (Fig. 20). Em material semelhantemente tratado por RNase e corado a pH 3,4, porém adicionando-se cátions bário à solução corante (Lison, 1960), os picos de absorção se deslocaram para comprimentos de onda mais longos, ou seja,

	AT pH 3,4	AT pH 3,4 + Ba ⁺⁺
H_1	560-570nm	580nm
E_1	580nm	590nm

Por outro lado, os índices metacromáticos de - cresceram sensivelmente, sendo menores do que 1,00 (Fig. 20).

Em outra série de lâminas submetidas ao mesmo

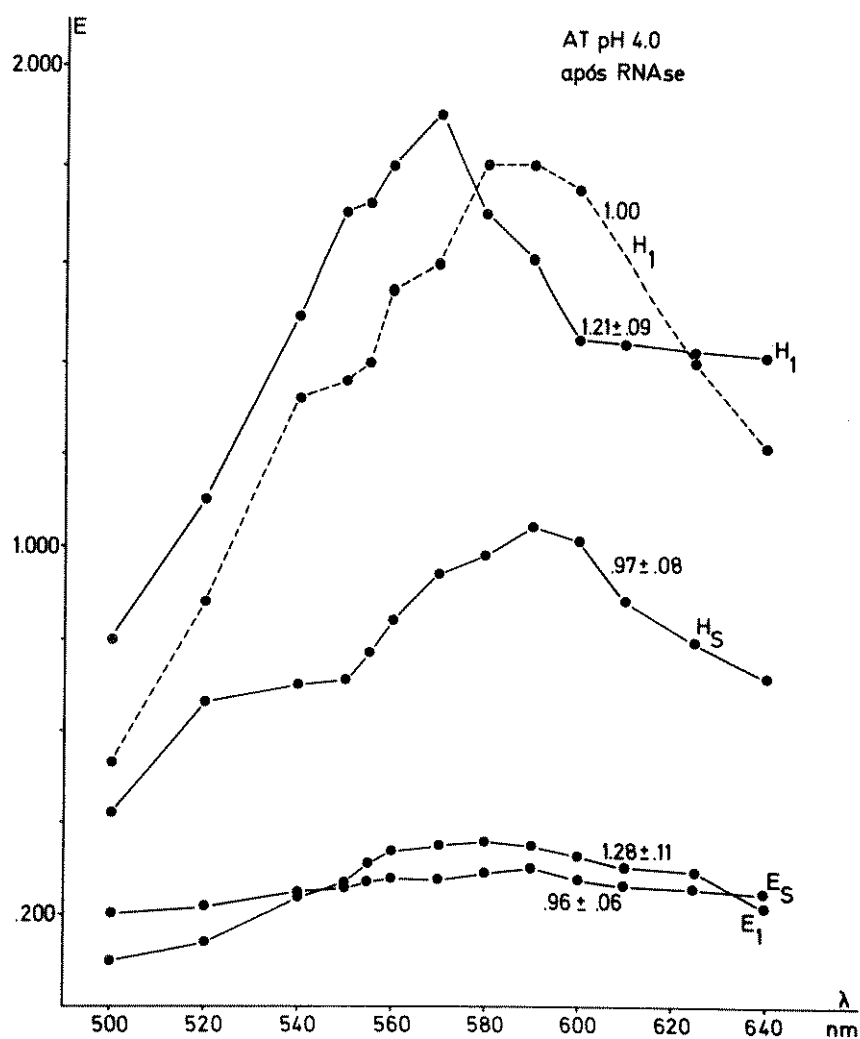


Fig. 19. Curvas espectrais de basofilia das cromatinas coradas com azul de toluidina a pH 4,0, após digestão por RNAse ($n=10$ para E_1 , E_S , H_S ; $n=9$ para H_1 - curva em linha contínua). A curva em linha tracejada corresponde a apenas uma medida de extinção por comprimento de onda.

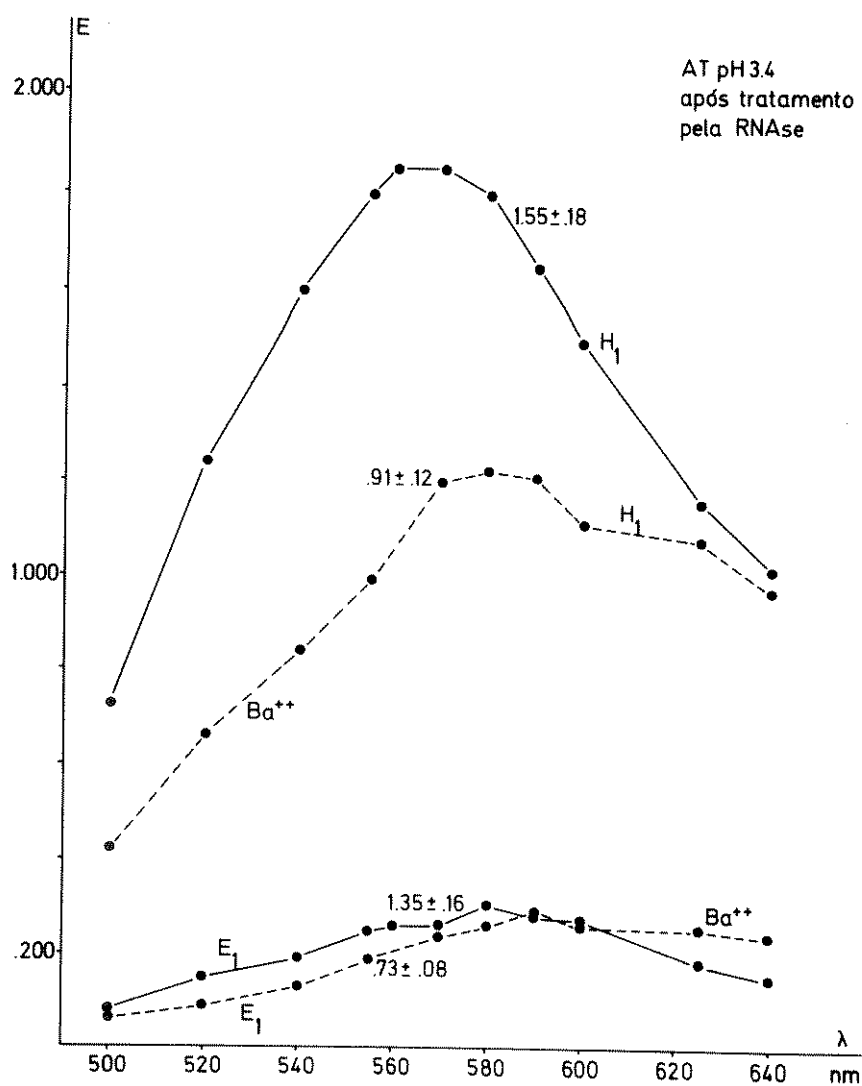


Fig. 20. Curvas espectrais de basofilia das cromatinas coradas com azul de toluidina a pH 3,4 após digestão por RNase (n=10). As curvas tracejadas correspondem à coloração por uma solução de azul de toluidina adicionada de cations bário.

tratamento RNase-azul de toluidina pH 3,4 + Ba^{++} , fez-se agora comparação dos padrões de basofilia entre os diversos tipos de cromatina. Conforme pode ser deduzido da análise da figura 21, embora os perfis das curvas H_1 e H_s sejam diferentes (a curva de H_s continua a salientar seu ombro ao redor de $\lambda = 520nm$), os seus índices metacromáticos não diferem estatisticamente. Por outro lado, a curva de E_1 apresenta a região de seu máximo de absorção deslocada para comprimentos de onda mais longos do que os de E_s e consequentemente um menor índice metacromático do que esta.

Na mesma figura 21 acham-se esquematizadas curvas tracejadas H_1 e E_1 obtidas de material tratado por RNase e a seguir por uma solução de azul de toluidina a pH 3,4 + UO_2^{++} . Sabe-se que a basofilia metacromática devida a radicais PO_3^- é anulada, quando a solução de azul de toluidina em pH 3,4 empregada na coloração se adiciona UO_2^{++} , o que não se verifica quando se adiciona Ba^{++} para uma mesma miliequivalência ^{baixa} desses cátions (Lison, 1960). No presente experimento observou-se que, de fato, os picos de absorção das curvas espectrais se deslocaram para comprimentos de onda acima de 620nm (UO_2^{++}); também os índices metacromáticos decresceram sensivelmente (Fig. 21).

Denaturação-renaturação. No material denaturado-renaturado pelo processo de Arrighi e Hsu (1971), observa-se forte coloração dos cromocentros; mesmo as eucromatinas se coram, embora muito menos intensamente. Nestas últimas observam-se aspectos de entumescimento e alterações estruturais nos

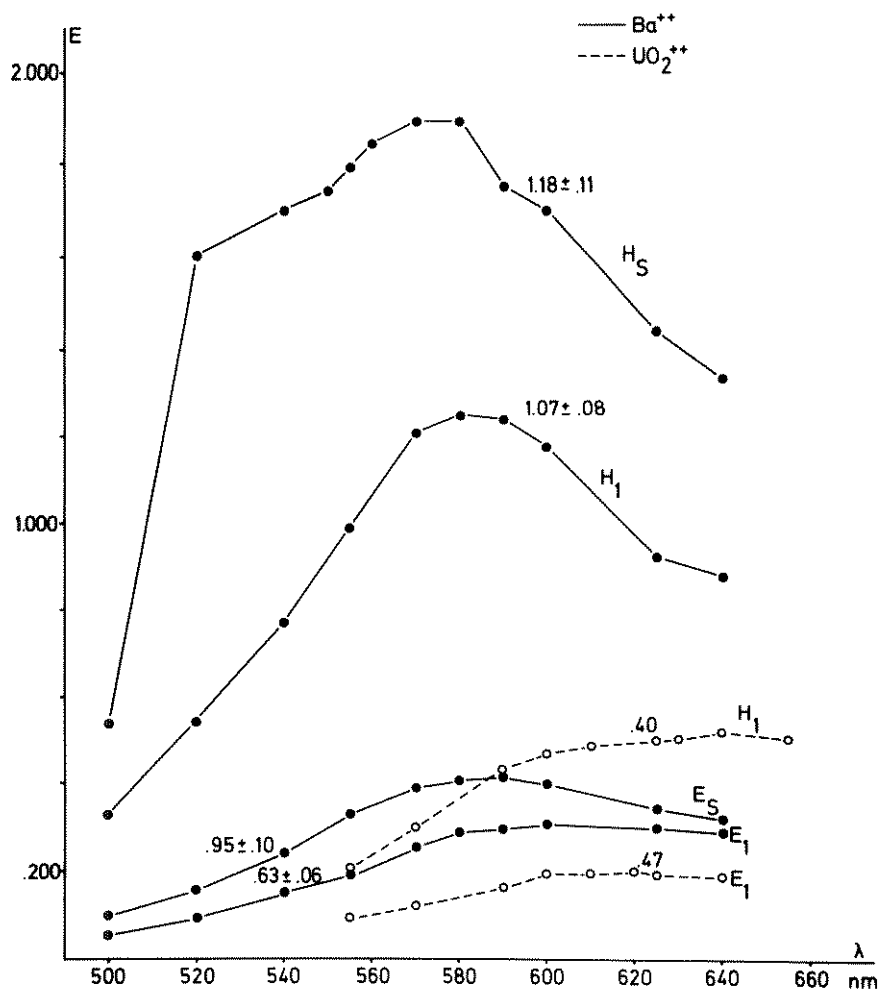


Fig. 21. Curvas espectrais de basofilia das cromatinas coradas com azul de toluidina a pH 3,4 com a adição de íons Ba^{++} ou UO_2^{++} ($n = 10$).

"bastonetes" cromatínicos (Fig. 22).

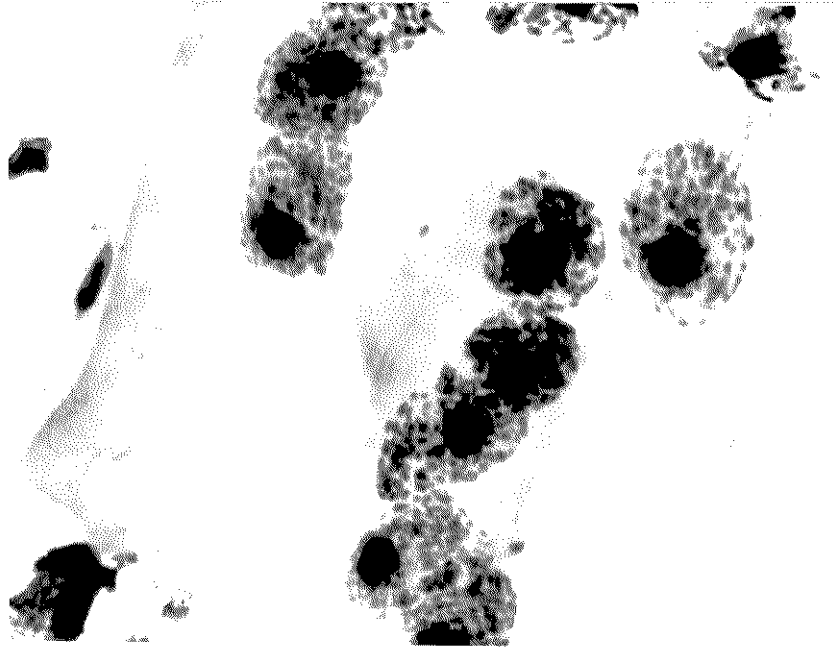


Fig. 22. Núcleos dos tubos de Malpighi submetidos ao processo de denaturação-renaturação de Arrighi e Hsu (1971). x 1096.

Quanto ao material denaturado-renaturado pelo procedimento de Vidal(Mello, 1973) após tratamento pela RNase, tanto as heterocromatinas como as eucromatinas se coram intensamente com Giemsa ou azul de toluidina a pH 4,0 em violeta - róseo, enquanto porções citoplasmáticas do epitélio dos tubos de Malpighi e o tecido conjuntivo que os reveste se coram em verde. Após os procedimentos de denaturação-reassociação segundo Vidal e coloração por azul de toluidina a pH 4,0, os picos das curvas espectrais se deslocam para comprimentos de on

da mais curtos em relação ao controle não tratado (Tabela XI). Os índices metacromáticos também se elevam ligeiramente.

Efetuando-se tratamento dos preparados apenas com solução 2SSC, os máximos de absorção de todas cromatinas se localizaram em $\lambda = 560\text{nm}$ (Tabela XI) e o índice metacromático em todos os casos se aproximou de 1,50-1,60. Tratamento isolado do material apenas com NaOH 0,014M motivou a localização dos picos de H_s em $\lambda = 580\text{nm}$ e os das eucromatinas e H_l em 570nm (Tabela XI). Os índices metacromáticos neste caso se apresentaram menores (ao redor de 1,40) do que os obtidos após denaturação-renaturação, os quais, por sua vez, foram menores do que os encontrados após ação isolada da solução 2SSC.

Efeito da metilação. Se os tubos de Malpighi fixados em etanol acético e esmagados em ácido acético a 45% forem submetidos a uma metilação durante 5h, as heterocromatinas se coram intensamente pelo azul de toluidina a pH 4,0, enquanto as eucromatinas se coram muito palidamente. Ambas, entretanto, apresentam picos de absorção localizados em $\lambda = 570\text{nm}$ e índices metacromáticos variando de 1,19 a 1,26 ($n = 5$). Se após a metilação, ao invés de se corar o material com azul de toluidina, tratamo-lo pelo reativo de Schiff, as heterocromatinas aparecerão intensamente coradas, enquanto a coloração nas eucromatinas será pouco evidente.

Se o material submetido à metilação tiver sido fixado em formol a 10%, contudo, somente os cromocentros aparecerão corados pelo azul de toluidina, com um máximo de absorção em $\lambda = 610\text{nm}$ e índice metacromático igual a 0,50-0,55 ($n = 5$). Es

te mesmo material fixado em formol, quando tratado pelo reativo de Schiff após metilação, não se cora.

3. Propriedades anisotrópicas das cromatinas submetidas às reações de basofilia.

A análise do material fixado em etanol acético, esmagado em ácido acético, corado com azul de toluidina a pH 4,0 e 3,4 e examinado entre analisador e polarizador cruzados, demonstra a ocorrência de birrefringência nas regiões heterocromáticas e eucromáticas dos núcleos dos tubos de Malpighi (Figs. 23 a 26).

Nas heterocromatinas a birrefringência após coloração com azul de toluidina a pH 4,0 é azul-violácea nas regiões aparentemente mais compactadas e amarela nas porções menos compactadas e periferia dos cromocentros. Nas eucromatinas, que aparecem sob a forma de pequenos bastonetes, os quais, segundo Geitler (1938 e 1939), corresponderiam aos cromossomos individualizados (Fig. 23, 24, 27 e 28), a birrefringência é amarela. (Deve-se salientar que o número de "bastonetes" individualizados e possíveis de serem contados nos núcleos 32n dos tubos de Malpighi do 5º instar é aproximadamente o dobro daquele de núcleos do 4º instar (16n). Tal fato, além de estar em acordo com as suposições de Geitler (1938 e 1939) e o conhecimento da duplicação do conteúdo Feulgen-DNA dessas cromatinas nesse período ninfal (Mello, 1969, 1971, 1975 e 1976) é fortemente sugestivo de não estar aí ocorrendo fenômeno de politenização (Figs 27 e 28).

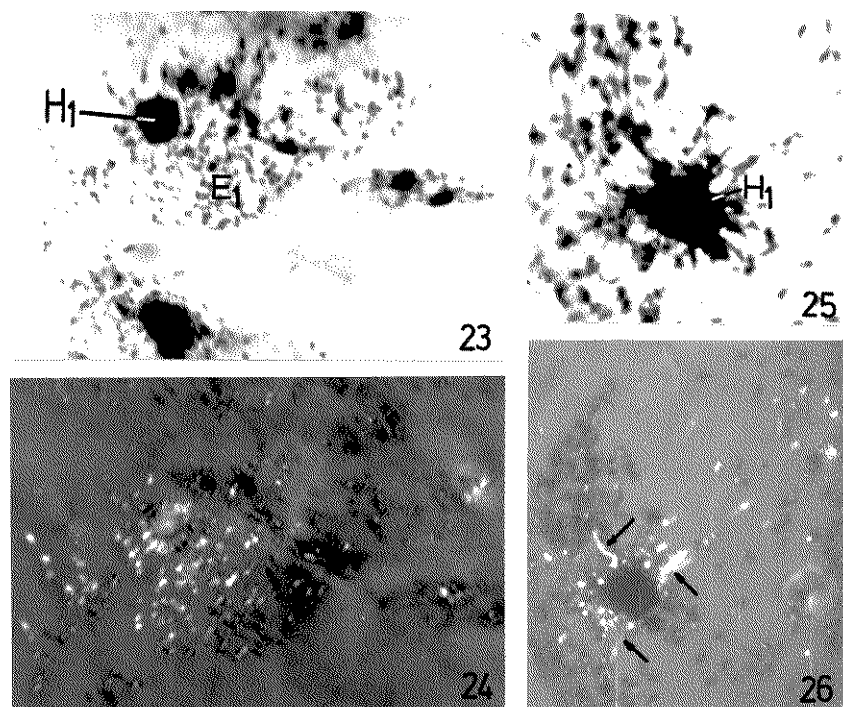
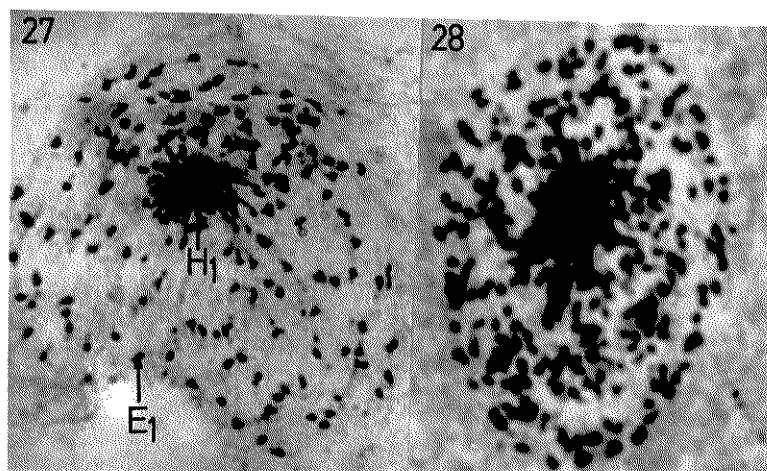


Fig. 23. H_1 e E_1 de núcleo corado com azul de toluidina a pH 4,0 após RNase. x 970

Fig. 24. O mesmo núcleo da fig. 23, agora observado entre analisador e polarizador cruzados. Observar a birrefringência de H_1 e E_1 .

Fig. 25. Detalhe de cromocentro H_1 após tratamento por Rnase e coloração com azul de toluidina a pH 4,0. x 1612 ($\lambda = 550\text{nm}$).

Fig. 26. O mesmo núcleo da fig. 25, observado entre analisador e polarizador cruzados, com polarizador levemente girado a fim de salientar a birrefringência dos filamentos cromatínicos da região periférica ao cromocentro (setas). x1024.



Figs. 27 e 28. Núcleos dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans corados com azul de toluidina a pH 4,0.

27. ninfa do 4º instar. x 1100

28. ninfa do 5º instar. x 1380

Tanto para as heterocromatinas como para as eucromatinas, a medida dos retardos ópticos (R.O.) em diversos comprimentos de onda permitiu que se estabelecesse ser a dispersão da birrefringência anômala, ou seja, há mudança do sinal de seus R.O. a partir de um determinado comprimento de onda (Fig. 29). Considerando-se a amplitude de comprimentos de onda utilizados no presente estudo, encontraram-se valores de R.O. negativos em comprimentos de onda mais curtos e positivos em comprimentos de onda mais longos. (Em curvas de dispersão anômala da birrefringência, a região que contém o ponto no qual os retardos ópticos mudam de sinal (ponto de inflexão) é chamada zona de transição (Fig. 29)).

Nos núcleos em estudo, devido à compactação e sobreposição de material nos cromocentros, não se pôde avaliar a

dispersão da birrefringência em alguns casos, pela dificuldade em se orientar corretamente o material com relação ao γ do compensador. A medida dos R.O. nas heterocromatinas se fez sempre em partes dos cromocentros e não no cromocentro como um todo, uma vez que não se podia compensar simultaneamente toda a birrefringência, principalmente quando as estruturas tendiam a uma forma esférica.

Também observações de dicroísmo linear não foram realizadas devido ao tamanho das estruturas e impossibilidade de orientação e medida de absorção das estruturas.

Muitas vezes foi observado um conjunto de "bastonetes" eucromáticos, na periferia dos cromocentros, alguns dos quais se ligavam entre si por estruturas filamentosas. A compensação da birrefringência dos diferentes "bastonetes" ligados por esses filamentos é simultânea. Seus padrões de dispersão da birrefringência são também idênticos aos da eucromatina mais afastada dos cromocentros.

A comparação das curvas de dispersão anômala da birrefringência, principalmente na zona de transição permite que se considere serem os valores dos R.O. em núcleos corados a pH 3,4 sempre superiores aos de núcleos corados a pH 4,0.

O tratamento pela RNase antes da coloração ou o uso de cátions Ba^{++} na solução corante a pH 3,4 praticamente não alteram os valores e o sinal dos R.O..

Analizando-se 10 núcleos com um e 10 com diversos cromocentros, corados a pH 4,0 e 3,4 e previamente tratados por RNase, obtiveram-se os seguintes resultados:

pH da solução cromatinas soma dos R.O. de E e F (Fig.29)
corante em valor absoluto ($\bar{X} \pm S$)

4,0	H_1	$48,0 \pm 1,4$
	E_1	$39,8 \pm 1,0$
	H_S	$48,5 \pm 1,6$
	E_S	$47,5 \pm 1,3$
3,4	H_1	$53,2 \pm 0,8$
	E_1	$46,9 \pm 1,0$
	H_S	$50,7 \pm 1,1$
	E_S	$52,6 \pm 1,3$

Comparando-se os valores dessas médias de retardos ópticos, infere-se que :

$$\begin{aligned}
 H_1 &> E_1 && \text{pH } 4,0 \text{ e } 3,4 \\
 E_S &> E_1 && \text{pH } 4,0 \text{ e } 3,4 \\
 H_S &= H_1 && \text{pH } 4,0 \\
 H_S &\approx E_S && \text{pH } 4,0 \\
 H_1 &> H_S && \text{pH } 3,4 \\
 E_S &> H_S && \text{pH } 3,4
 \end{aligned}$$

Tais afirmações podem mesmo serem comprovadas através do cálculo de simples testes t :

$$\begin{aligned}
 \text{pH } 4,0 \quad H_1 \times E_1 & \quad t = 15,07 > t_{0,001} = 5,04 \text{ (G.L. = 8)} \\
 H_S \times E_S & \quad t_{0,20} = 1,40 < t = 1,53 < t_{0,10} = 1,86 \text{ (G.L. = 8)} \\
 E_S \times E_1 & \quad t = 14,84 > t_{0,001} = 5,04 \text{ (G.L. = 8)} \\
 H_S \times H_1 & \quad t_{0,50} = 0,71 < t = 0,74 < t_{0,40} = 0,89 \text{ (G.L. = 8)} \\
 \text{pH } 3,4 \quad H_1 \times E_1 & \quad t = 8,08 > t_{0,001} = 5,04 \text{ (G.L. = 8)} \\
 H_S \times E_S & \quad t_{0,01} = 3,36 < t = 3,52 < t_{0,001} = 5,04 \text{ (G.L. = 8)} \\
 E_S \times E_1 & \quad t = 10,98 > t_{0,001} = 5,04 \text{ (G.L. = 8)} \\
 H_S \times H_1 & \quad t = 5,81 > t_{0,001} = 5,04 \text{ (G.L. = 8)}
 \end{aligned}$$

Quando a cromatina é corada a pH 3,4, o ponto de inflexão da curva de dispersão geralmente se desloca para comprimentos de onda mais curtos do que os verificados a pH 4,0 , exceto no caso de H_1 :

cromatinas	λ em nm	
	pH 4,0	pH 3,4
E_1	525	515
E_s	525	520
H_1	525	525
H_s	525	515

Observa-se também que, a pH 4,0, há aparente constância na localização do ponto de inflexão.

Após os procedimentos de denaturação-renaturação (coloração com azul de toluidina a pH 4,0, método de Vidal), a birrefringência é também nítida (Fig. 30). O perfil das curvas de dispersão da birrefringência não se altera. O ponto de inflexão da curva continua sendo encontrado na mesma região do espectro (525nm) e o sinal dos R.O. também não muda. Quanto aos valores dos retardos ópticos, estes são aproximadamente iguais ou menores do que os dos controles não denaturados-reassociados. A relação entre os valores dos R.O., $H_1 > E_1, H_s > E_s$ e $E_s > E_1$ continua sendo mantida após denaturação-renaturação.

$$H_1 = 49,4 \pm 3,3$$

$$E_1 = 39,2 \pm 1,3$$

$$H_s = 44,6 \pm 1,9$$

$$E_s = 42,4 \pm 2,2$$

$$H_s \times E_s \quad t_{0,05} = 2,31 < t = 2,39 < t_{0,02} = 2,90 \text{ (G.L. = 8)}$$

$$H_l \times E_l \quad t = 9,09 > t_{0,001} = 5,04 \text{ (G.L. = 8)}$$

$$E_s \times E_l \quad t_{0,001} = 5,04 > t = 3,96 > t_{0,01} = 3,36 \text{ (G.L. = 8)}$$

Porém, $H_l > H_s$, a semelhança dos resultados a pH 3,4:

$$H_s \times H_l \quad t_{0,001} = 5,04 > t = 3,99 > t_{0,01} = 3,36 \text{ (G.L. = 8)}$$

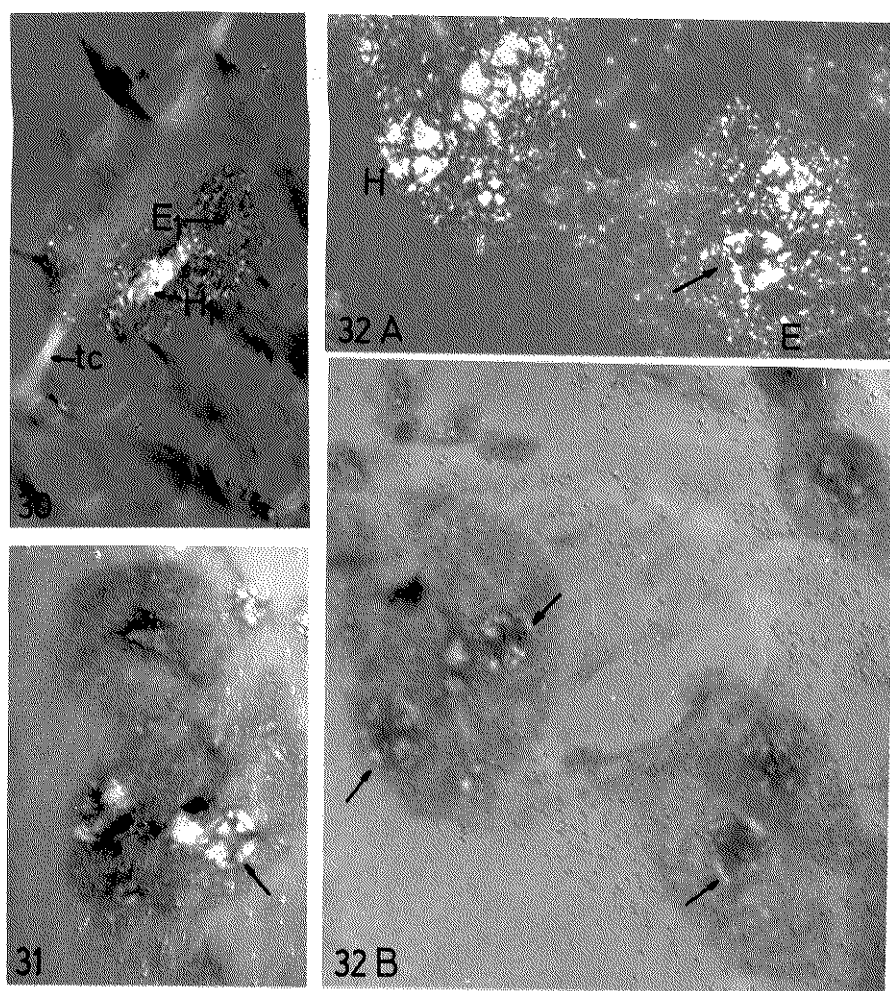
No material denaturado-renaturado segundo Arri-ghi e Hsu (1971) ou Vidal (Mello, 1973), corado com Giemsa, a birrefringência é pouco intensa e somente detectável quando se utiliza luz ultra-violeta.

Em alguns experimentos, os núcleos foram trata- dos com NaOH 0,014M ou solução 2SSC em separado e a seguir co- rados com azul de toluidina a pH 4,0. Verificou-se, então, que após qualquer um desses tratamentos isoladamente, os valores dos R.O. se apresentaram mais elevados do que os dos controles não tratados ou das cromatinas denaturadas-renaturadas.

NaOH	E_l	$59,6 \pm 4,6$	(n= 10)
	H_l	$60,2 \pm 5,3$	(n= 10)
2SSC	E_l	$51,9 \pm 2,4$	(n= 10)
	H_l	$72,9 \pm 8,0$	(n= 10)

Quanto ao sinal dos R.O. e à localização do pon- to de inflexão da curva de dispersão da birrefringência, em ge- ral não se notaram modificações.

Alguns núcleos, após tratamento pela NaOH ou so- lução 2SSC passaram a apresentar a região dos cromocentros en- tumescida e com o material cromatínico disposto de tal forma que, observados com analisador e polarizador cruzados, mostra-



- Fig. 30. Birrefringência de H_1 e E_1 após o processo de denatura
ção-reassociação segundo Vidal (Mello, 1973). Colora-
ção com azul de toluidina a pH 4,0. Nota-se também bir-
refringência de porções do tecido conjuntivo (tc) que
envolve os tubos de Malpighi. x 970
- Fig. 31. Núcleo tratado com NaOH 0,014M e corado com azul de to-
luidina a pH 4,0. A birrefringência da heterocromatina,
quando compensada, dá origem a uma imagem em forma de
cruz (seta). x970
- Fig. 32. Núcleos tratados por solução 2SSC e corados com azul
de toluidina a pH 4,0. A. Aspecto da birrefringência
total. B. compensação da birrefringência, salientando
na heterocromatina uma imagem em forma de cruz (setas).
x 1060. H= heterocromatina; E= eucromatina.

vam uma imagem birrefringente em cruz (Figs. 31 e 32). Nestes cromocentros, o sinal dos R.O. nos diferentes comprimentos de onda apresentou-se o inverso do comumente encontrado, porém os valores dos R.O. permaneceram os mesmos com relação aos dos outros núcleos sem esta característica de imagem.

Examinando-se os tubos de Malpighi submetidos à metilação entre polarizador e analisador cruzados, constatou-se que a birrefringência anteriormente detectada nas cromatinas fixadas em etanol acético desaparece. Por outro lado, em material fixado em formol a 10% não se verificam fenômenos de anisotropia nas cromatinas em estudo.

4. Alguns dados sobre as proteínas básicas e totais do complexo nucleoproteico nuclear.

Analisando-se as curvas espectrais para E_1 , E_s , H_1 e H_s após coloração com fast green alcalino segundo o método de Alfert e Geschwind (1953) modificado por Deitch (1966a), em todos os casos encontrou-se um pico localizado em $\lambda = 640\text{nm}$ (Fig. 33). Isto está de acordo com dados da literatura (Mello et al., 1976) ou mesmo dados não publicados referentes a soluções (Vidal, 1971- informação pessoal). Com base na análise dessas curvas escolheram-se os comprimentos de onda 580 e 610nm para se determinar os valores de transmitância segundo o método de duplo comprimento de onda. Para a estimativa das extinções por "varredura manual" foi escolhido $\lambda = 600\text{nm}$.

Os valores fast green-histonas em unidades arbitrárias para as heterocromatinas e eucromatinas em separado e

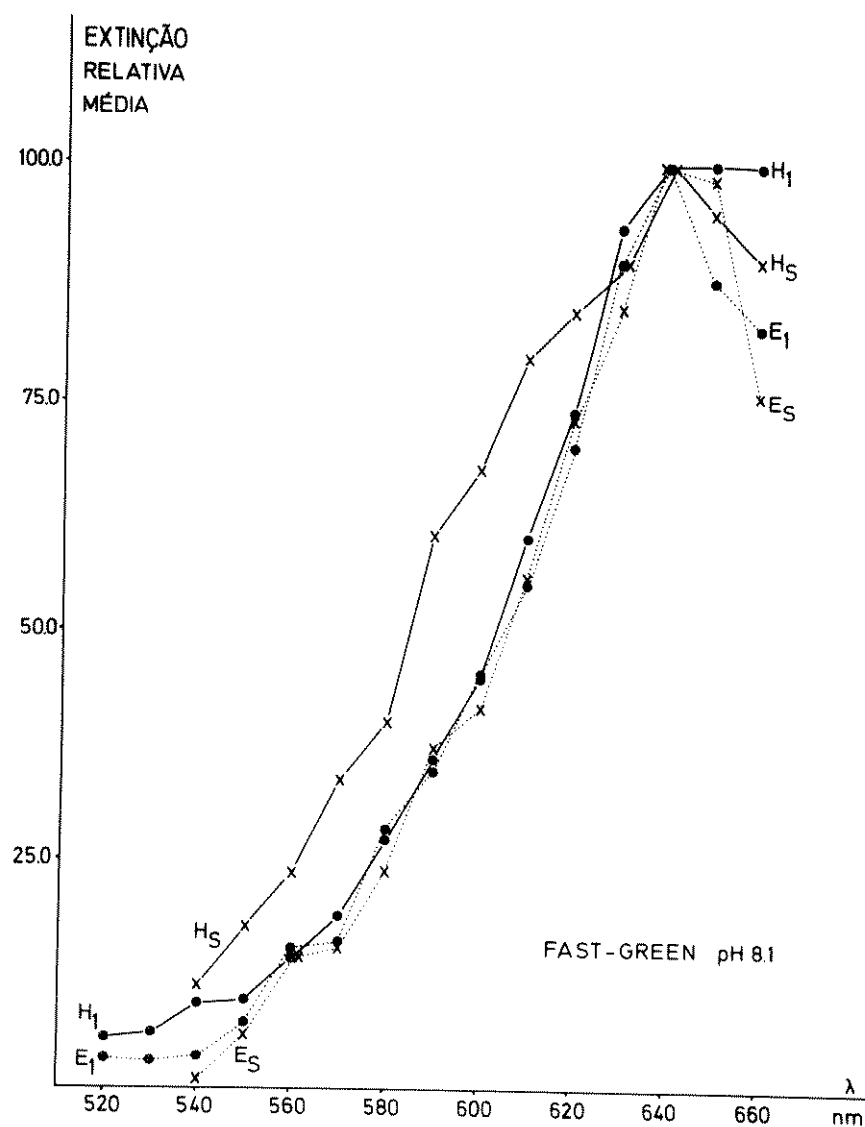


Fig. 33. Curvas espectrais dos diferentes tipos cromatínicos dos núcleos do epitélio dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans corados pelo fast green a pH 8,1 (n=5).

para os núcleos totais foram colocados em histogramas e podem ser observados na figura 34. Os valores referentes às eucromatinas foram encontrados como sendo superiores aos das heterocromatinas, porém não se observam diferenças significantes entre os histogramas de H_S e H_L e também entre os de E_S e E_L . Os dados obtidos para os núcleos totais após os dois métodos citofotométricos ("varredura manual" e duplo comprimento de onda) apresentaram-se também concordantes, considerando-se as dispersões das distribuições e a localização dos dados na escala de valores (Fig. 34).

Se o método do fast green a pH 8,1 for utilizado em preparações previamente desaminadas (Bloch, 1966), tanto as heterocromatinas como as eucromatinas não aparecerão coradas, indicando que a proporção de amino-ácidos arginina por lisina, de suas histonas, não é muito maior do que 1. Por outro lado, a riqueza de lisina em todas as cromatinas analisadas pôde ser evidenciada quando se submeteram os núcleos em questão à reação do fast green-eosina (Bloch, 1966): todas se coraram pela eosina e não pelo fast green.

Para o estudo do conteúdo relativo de histonas e proteínas nucleares totais após diferentes tempos da ação hidrolítica pelo HCl 0,1N, efetuou-se uma "varredura manual" nas cromatinas, medindo-se as extinções em $\lambda = 570\text{nm}$. Isto porque a análise das curvas espectrais evidenciou, a pH 2,7, extinções próximas do valor 2., nos comprimentos de onda de 580 a 660 nm, para as heterocromatinas. Uma vez que se pretendia comparar os valores fast green-histonas (pH 8,1) com os valores fast green-

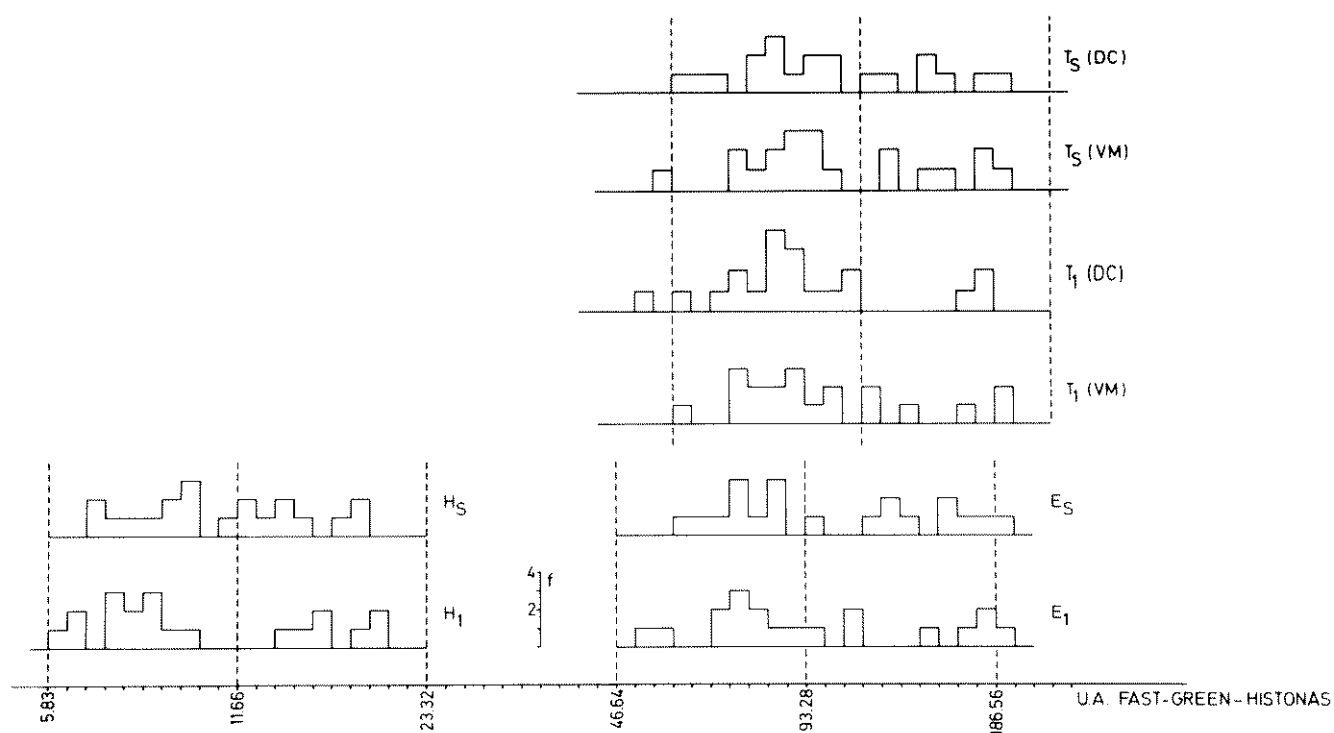


Fig. 34. Histogramas de frequência dos valores fast green-histonas das cromatinas em separado (H_s , H_1 , E_s e E_1) e dos núcleos totais (T_1 = núcleos com um único cromocentro; T_s = núcleos com vários cromocentros), estes últimos determinados após citofotometria segundo duplo comprimento de onda (DC) ou "varredura manual" (VM).

proteínas totais (pH 2,7) de heterocromatinas e eucromatinas e a estimativa das extinções necessitava ser realizada num mesmo comprimento de onda, escolheu-se, portanto, $\lambda = 570\text{nm}$.

Não se observa coloração nos núcleos tratados pelo fast green alcalino, quando estes são hidrolisados por períodos acima de 2h em HCl 0,1N (37°C). Nos núcleos submetidos à reação para proteínas totais, contudo, as diferentes cromatinas se coram mesmo após 3lh de tratamento pelo HCl (Figs. 35 e 36).

Os valores fast green-histonas e fast green-proteínas totais em unidades arbitrárias acham-se sumarizados na tabela XII. Os valores fast green-histonas para H_1 e E_1 em t_0 (controle) são sensivelmente menores do que os que se referem às proteínas totais respectivas. Os valores referentes às histonas de H_1 representam aproximadamente 26,2% dos das proteínas totais; os de E_1 equivalem a 15% dos das proteínas totais. De modo geral, os dados relativos às proteínas totais de E_1 e E_s não diferem significativamente, porém os de H_1 e H_s diferem estatisticamente ao nível de $P_{0,01}$, conforme pode ser comprovado através de testes t :

$$E_s \times E_1 \quad t = 0,46 < t_{0,60} = 0,53 \text{ (G.L. = 18)}$$

$$H_s \times H_1 \quad t_{0,001} = 3,92 > t = 3,65 > t_{0,01} = 2,88 \text{ (G.L. = 18)}$$

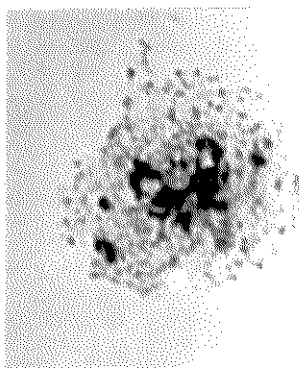


Fig. 35. Reatividade ao fast green a pH 2,7 nas cromatinas H_s e E_s de um núcleo fixado em etanol acético e hidrolisado 3lh em HCl 0,1N (37°C). x 820.

Após tempos de hidrólise tão longos como 31h são ainda encontradas proteínas (não histônicas) nas diferentes cromatinas (Tabela XII). A remoção das proteínas reativas ao fast green a pH 2,7 pela hidrólise com HCl 0,1N a 37°C (proteínas não histônicas) parece se verificar mais intensa e rapidamente nas eucromatinas do que nas heterocromatinas. Os valores fast green-proteínas totais médios após 31h de hidrólise pelo HCl em H_1 , H_s , E_1 e E_s representam, respectivamente, 42,2 % , 41,2%, 29,6% e 26,9% dos valores obtidos em t_0 . Nas eucromatinas verifica-se um decréscimo mais sensível nos valores fast green-proteínas totais já após 2h de tratamento pelo HCl 0,1N, do que nas heterocromatinas.

*

*

*

TABELA XII . Valores fast green-histonas e fast green-proteínas totais das cromatinas fixadas em etanol acético e hidrolisadas em HCl 0,1N (n= 5, para diferentes tempos de hidrólise ; n = 10, para t₀).

tempos	Fast green pH 8,1			Fast green pH 2,7		
	H ₁	E ₁	H ₁	E ₁	H _s	E _s
DE						
hidrólise	H ₁	E ₁	H ₁	E ₁	H _s	E _s
t ₀	9,38 ± 3,86	42,34 ± 5,45	35,82± 13,00	277,10 ±128,41	67,28± 24,09	252,21 ±112,16
2h	ausência		27,89± 7,36	99,68 ± 35,81	-	-
6h			31,44± 9,59	108,68 ± 49,69	73,12± 13,07	126,67 ± 60,42
13h40m	de		-	111,25 ± 42,13	-	-
18h			12,82± 4,70	153,62 ± 74,50	-	-
21h	coloração		-	76,40 ± 31,18	-	-
31h			15,13± 6,98	82,01 ± 33,91	27,75± 11,77	67,77 ± 13,69

D I S C U S S Ã O

Nas ninfas do Triatoma infestans os tubos de Malpighi, órgãos pertencentes ao seu sistema excretor, crescem por poliploidização de suas células epiteliais e não por divisão das mesmas (Mello, 1969, 1970, 1971, 1975, 1976). Nos núcleos dessas células observa-se desde o 1º instar ninfal a presença de corpos heterocromáticos (cromocentros). Nos estádios mais jovens praticamente apenas um padrão morfológico (e morfométrico) nuclear é encontrado com relação à heterocromatina : os núcleos contêm um único cromocentro, aproximadamente esférico, e localizado próximo ao centro da imagem nuclear (Mello, 1969, 1975, 1976). Já no 3º instar um outro padrão começa a se fazer notar: um ou dois núcleos por túbulo passam a apresentar vários corpos heterocromáticos. No 4º instar, então, essa alteração se estende a muitos núcleos (Mello, 1969, 1971). Passa a ser predominante o achado de núcleos com vários cromocentros na porção distal dos tubos de Malpighi, enquanto núcleos com um único cromocentro ocorrerão quase que exclusivamente na sua porção proximal. Esta última região pode ser facilmente identificada mesmo quando um túbulo se rompe de sua região de inserção no intestino posterior, uma vez que somente nela se observam esférulas de ácido úrico no lúmen do órgão, à semelhança do que acontece em outro triatomíneo, Rhodnius prolixus (Wigglesworth, 1931a). Uma ou duas células de um tipo poderão, eventualmente, serem encontradas em meio às do outro tipo, na vizinhança da região

limite entre a porção distal e a proximal dos tubos de Malpighi. Esses padrões gerais serão mantidos nos animais adultos jovens e velhos (Mello, 1975- dados não publicados). É de se salientar serem conhecidas diferenças em comportamento fisiológico e em ultra-estrutura citoplasmática, quando se comparam as células distais com as proximais dos tubos de Malpighi de alguns triatômíneos (Wigglesworth, 1931a,b, 1965; Wigglesworth e Salpeter, 1962; Mello e Dolder, 1976- manuscrito em preparação). Em Rhodnius prolixus as principais diferenças descritas residem nos conteúdos do lúmen do órgão, conteúdos citoplasmáticos das células epiteliais e tipo de bordo estriado dessas células. Assim, no lúmen da região proximal, verifica-se a presença de esférulas de ácido úrico, enquanto na distal isso não ocorre (Wigglesworth, 1931a). Quanto ao citoplasma, observam-se grânulos mineralizados com laminação concêntrica nas células da região distal, enquanto a zona proximal é livre de tais grânulos (Wigglesworth e Salpeter, 1962; Wigglesworth, 1965). Segundo Wigglesworth e Salpeter (1962), os grânulos do citoplasma das células distais, quando descarregados no lúmen e deslocados para o segmento proximal, poderiam vir a fornecer núcleos de cristalização para o ácido úrico. Quanto ao bordo estriado, a microscopia eletrônica contribuiu para que se distinguíssem diferenças no sentido de serem os elementos do bordo das células distais muito empacotados e próximos entre si ("honeycomb border"), enquanto os da porção proximal são bem mais separados e variados em estrutura ("brush border") (Wigglesworth e Salpeter, 1962; Wigglesworth, 1965). Além disso, sabe-se de experiências de fisiologia

que a região distal dos tubos de Malpighi dos triatomíneos é especializada na excreção de potássio, enquanto a proximal acha-se empenhada em mecanismo de reabsorção de água e potássio (Wigglesworth, 1931b). Porém não existe relato, nos trabalhos de Wigglesworth, quanto a diferenças significativas em estruturação nuclear, quando se comparam células das duas regiões. Isto provavelmente se deva ao fato do triatomíneo Rhodnius prolixus, estudado por esse autor, não apresentar cromocentros como os do Triatoma infestans nas células mencionadas (Mello, 1973- dados não publicados) nem nas da linhagem germinativa (Schreiber et al., 1972), com relação aos quais se pudesse estabelecer diferentes padrões nucleares. Não obstante, a ultra-estrutura citoplasmática das células epiteliais dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans é, no geral, semelhante à de Rhodnius prolixus, no que se refere às características diferenciais entre células distais e proximais (Mello e Dolder, 1976- manuscrito em preparação). É semelhante também à de outro triatomíneo, Panstrongylus megistus (Dolder e Mello, 1976- manuscrito em preparação), em que também não são observados cromocentros como os do Triatoma infestans nos núcleos das células dos tubos de Malpighi (Mello, 1975).

Pode-se levantar a hipótese de que as diferenças em "fenótipos" nucleares observadas nos tubos de Malpighi do Triatoma infestans estejam ligadas a diferentes funções realizadas pelas células respectivas. Sendo isso verdadeiro, e lembrando que a diversificação nuclear se manifesta em larga escala somente a partir do 4º estadio ninfal, é para se imaginar

que modificações nas funções das células distais se estabeleçam nessa época. Embora o tipo de alimento ingerido pelo inseto seja o mesmo durante toda sua vida, provavelmente os produtos excretados pela porção distal dos tubos de Malpighi e/ou seu mecanismo de eliminação de potássio e/ou outras funções se alterem ao longo do desenvolvimento do inseto. Tal evento envolveria, talvez, demanda de diferentes sistemas enzimáticos e de determinados genes funcionando para esse fim. Não existe, contudo, informação sobre uma provável alteração fisiológica nas células distais dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans em nenhuma época de sua vida. Mesmo estudos em nível de citoquímica para glicosaminoglicanas ácidas e neutras, proteínas totais e RNA não têm salientado diferenças para os citoplasmas das células distais e proximais, ao nível óptico (Mello e Viana, 1976-trabalho em andamento).

Que os corpos de cromatina condensada encontrados nos núcleos das células epiteliais dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans representam heterocromatina é deduzido dos fatos expostos a seguir. Há constância em sua ocorrência durante toda a vida ninfal e adulta do inseto, num estado compactado (Mello, 1969, 1971, 1975, 1976; dados não publicados, 1975). A replicação de seu DNA é mais lenta ou mesmo, em alguns estádios, inexistente com relação às das regiões eucromáticas (Mello, 1969, 1971, 1975, 1976). Não incorporam uridina tritiada (pelo menos em núcleos com um único cromocentro, estudados em diversos períodos do 3º e 4º instars), enquanto existe marcação na eucromatina respectiva (Mello, 1969, 1971). Além disso, a resposta ao mé-

todo de denaturação-renaturação de Arrighi e Hsu (1971), conforme observada no presente trabalho, e discutida mais para a frente, é sugestiva de que os cromocentros das células epiteliais dos tubos de Malpighi contenham heterocromatina constitutiva. A riqueza de seu DNA em bases AT (DNA satélite?repetitivo?) pode mesmo ser evidenciada quando se submete tal material a tratamento com quinacrina (Ellison e Barr, 1972; Pachmann e Rigler, 1972; Weisblum e deHaseth, 1972,1973; Comings et al., 1975): a fluorescência das heterocromatinas é muito intensa, ao contrário do que se observa nas eucromatinas (Mello e Vidal, 1976 - trabalho em andamento).

Também em células da linhagem germinativa masculina do Triatoma infestans (fases anteriores à espermiogênese) tem sido verificada a existência de heterocromatina, com replicação de DNA mais lenta do que a eucromatina e identificada como representando os três maiores cromossomos autossômicos (A, B e C)(Schreiber e Pellegrino, 1950; Schreiber et al.,1968, 1972). Deve-se mencionar, por outro lado, que em outros triatomíneos, como por exemplo Rhodnius prolixus, em que não se detectam cromocentros nos núcleos dos tubos de Malpighi (Mello, 1973- dados não publicados), também não se encontram cromossomos heterocromáticos ou cromocentros nas células da linhagem germinativa (Schreiber e Pellegrino, 1950;Schreiber et al.,1967, 1972). Tal fato parece ser sugestivo de que nos núcleos somáticos do Triatoma infestans os mesmos cromossomos A, B e C, heterocromáticos nas células germinativas, estejam fazendo parte dos cromocentros encontrados.

Segundo Schreiber e colaboradores (1972), a heterocromatização no Triatoma infestans representaria um mecanismo citológico de isolamento reprodutivo da espécie. Tal afirmativa se baseia nos resultados obtidos quando se cruza Triatoma infestans com Triatoma rubrovaria. Ambas espécies têm o mesmo número de cromossomos ($20+XY$), porém os três pares de autosomos A, B e C apresentam-se heterocromáticos apenas no Triatoma infestans (Schreiber e Pellegrino, 1950). Estas espécies se cruzam facilmente em ambas direções (Schreiber et al., 1967). Durante a meiose do F_1 , porém, os cromossomos A, B e C, heterocromáticos, provenientes do Triatoma infestans, não se pareiam com os homólogos, eucromáticos, do Triatoma rubrovaria. Com isso, as células da linhagem germinativa do híbrido não passam da metáfase I e a heterocromatização assume significado no isolamento reprodutivo da espécie (Schreiber e Pellegrino, 1950; Schreiber et al., 1967).

Com relação aos resultados do presente trabalho, constatou-se que as heterocromatinas dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans mostram diferenças, se comparadas às respectivas eucromatinas, no que concerne a algumas de suas propriedades citoquímicas e citofísicas. Estas propriedades se referem às respostas à reação de Feulgen, em algumas condições experimentais, padrões de basofilia e anisotropia, comportamento frente aos processos de denaturação-renaturação, conteúdo em proteína e respectiva cinética de remoção por hidrólise ácida. Em alguns experimentos encontraram-se diferenças mesmo entre eucromatinas (E_1 - de núcleos com um único cromocentro - e E_s - de núcleos

com vários cromocentros) ou heterocromatinas (H_1 -de núcleos com um único cromocentro- e H_2 - de núcleos com vários cromocentros), quando as comparações foram feitas entre células distais e proximais.

Os dados relativos à cinética de hidrólise pertinente à reação de Feulgen mostram diferenças, desde que o material tenha sido fixado em etanol acético. Essas diferenças se referem principalmente à porção descendente das curvas de hidrólise ajustadas à função de Bateman, à variação nos valores dos índices preconizados por Kiefer e colaboradores (1972) ao longo da hidrólise, ou mesmo à própria distribuição dos histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA após diferentes tempos de hidrólise. Também em material fixado em etanol acético observam-se os mesmos tipos de diferenças quando se comparam $E_1 \times E_2$.

Quando se computam valores Feulgen-DNA após diferentes tempos de hidrólise ácida e se obtêm curvas de hidrólise, pode-se estudar as características do avanço do procedimento hidrolítico numa cromatina em particular. A porção ascendente de uma curva de hidrólise, anterior ao seu tempo ótimo, para o qual se obtêm valores Feulgen-DNA máximos, corresponde à remoção gradual de purinas do DNA (Feulgen e Rossenbeck, 1924; DiStephano, 1948; Overend e Stacey, 1949; Tamm et al., 1952; Sandritter et al., 1965; Bachmann, 1968; Andersson e Kjellstrand, 1975). A porção descendente da curva de hidrólise corresponde à remoção de pirimidinas e desoxirribose, despolimerização e solubilização do ácido apurínico (Tamm et al., 1952; Sandritter et al., 1965; Andersson e Kjellstrand, 1975). Este

último fenômeno, contudo, em pequena porcentagem (não mais que 12% nos casos já estudados) pode se sobrepor ao processo de depurinação antes do tempo ótimo de hidrólise (Beaven et al., 1955 -apud Walker e Richards, 1959; Woods, 1957; Savage e Plaut, 1958; Sandritter et al., 1965; Taylor, 1958). Para minimizar tal sobreposição, tem sido aconselhado o uso de uma hidrólise ácida suave, com HCl 0,1N a 37°C (Sandritter et al., 1965), como a utilizada na presente investigação.

Segundo os presentes resultados, a porção da curva de hidrólise a apresentar menos variações, quando se compara heterocromatina x eucromatina, ou H_1 x H_s e E_1 x E_s , é a sua região ascendente, o que está de acordo com os dados de Bachmann (1968), Böhm (1968), James (1972) e Andersson e Kjellstrand (1975). As poucas variações detectadas se referem ao fim da parte ascendente - início do platô da curva, ou melhor dizendo, ao tempo de hidrólise para o qual os valores Feulgen-DNA passam a ser máximos. Estes serão atingidos primeiramente pelas eucromatinas (E_s e, a seguir, E_1) e só depois pelas heterocromatinas (H_s e, a seguir, H_1), em células fixadas em etanol acético.

Em material fixado em formol ou MFA no geral não se observa uma cinética diferencial de hidrólise para as hetero- e eucromatinas. Nota-se, porém, que o tempo de hidrólise correspondente aos valores Feulgen-DNA máximos das cromatinas fixadas em formol difere daquele do material fixado em MFA e também daqueles das hetero- e eucromatinas fixadas em etanol acético. O mesmo é válido quanto ao tempo a partir do qual se pode constatar a depurinação. A variação em tempos de hidrólise correspon-

dentes aos valores Feulgen-DNA máximos pode ser identificada, inclusive, pela análise dos conjuntos de histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA e pelas curvas de hidrólise não ajustadas à função matemática.

Conforme já mencionado, as diferenças mais marcantes detectadas quanto ao perfil das curvas de hidrólise (principalmente das curvas percentuais) se verificaram na sua porção descendente. Trata-se de variação no tempo de hidrólise a partir do qual os valores Feulgen-DNA começam a decrescer e a velocidade com a qual esses valores tendem a atingir a linha das abcissas (ordenadas: valores Feulgen-DNA; abcissas: tempos de hidrólise). Considerando-se a região respectiva da curva de hidrólise, tal evento corresponderia a variações quanto à despolimerização e solubilização do ácido apurínico frente à hidrólise ácida, para as mencionadas cromatinas (Tamm et al., 1952; Sandritter et al., 1965; Andersson e Kjellstrand, 1975). Após fixação em etanol acético, as eucromatinas se comportariam como menos resistentes à despolimerização do que as heterocromatinas (e também E_s menos resistente do que E_1 ; H_s menos resistente do que H_1). Do fato dessas diferenças serem verificadas apenas em material fixado em etanol acético, deduz-se que este influencie de algum modo a cinética diferencial de hidrólise, o que não aconteceria quando outros fixadores, como o formol a 10% e o MFA fossem utilizados. Segundo Dick e Johns (1967 e 1968), o fixador etanol-ácido acético 3:1 remove 7 a 8 % das histonas totais de desoxirribonucleoproteínas isoladas, predominantemente H_4 (atual denominação de f2a1) e algumas H_2A

(atual denominação de f2a2) e H3 (atual denominação de f3)(as histonas mais ricas em arginina). Após seu uso, porém, permanecem ainda quantidades substanciais de histonas. O formol, por outro lado, se prende às proteínas nucleares, formando um grande número de ligações covalentes, através de pontes metila, entre grupos amino, guanino, indol, fenil e sulfidril dos amino-ácidos, na estrutura secundária das proteínas (Mellon, 1958; Böhm et al., 1968). Com o seu uso há, por conseguinte, estabilização das estruturas proteicas, tornando-se difícil dissociá-las do DNA (Swift, 1955, 1966). A extração enzimática de DNA de núcleos, nos moldes convencionais, é mesmo impedida (Swift, 1955 e 1966) ou retardada (Greenwood e Berlyn, 1968) quando as células são fixadas em formol à temperatura ambiente. Em adição a esse conhecimento sabe-se que a hidrólise ácida com HCl, como a pertinente à reação de Feulgen, dissocia grande parte das proteínas complexadas ao DNA (Comings e Avelino, 1974). Retardando-se ou acelerando-se a dissociação (e remoção) dessas proteínas, é de se esperar que haja conseqüentemente menor ou maior acessibilidade do DNA à ação hidrolítica, seja em termos de depuração ou despolimerização. Deve-se frisar que o efeito da hidrólise na porção pirimídica do ácido é remover base e açúcar juntos, quebrando as ligações no grupo fosfato; a proximidade dessas quebras deve ser esperada como sendo afetada, portanto, pelo tipo ou quantidade de proteína aí presente (Tamm et al., 1952).

Que as proteínas associadas ao DNA desempenham papel na sua resposta à reação de Feulgen in situ é amplamente conhecido. A estequiometria da reação de Feulgen pode ser alte-

rada graças ao tipo de complexo nucleoproteico formado e tipo de proteína ligada ao DNA, o qual promoveria diferentes graus de enovelamento e condensação do filamento cromatínico (Sibata ni e Fukuda, 1953; Gledhill et al., 1966; Gledhill, 1966 e 1970; Noeske, 1969; Garcia, 1970). Em espermatozóides de touro , por exemplo, há forte evidência da influência da composição e ligação do componente proteico ao DNA na resposta à reação de Feulgen. Durante o processo de espermiogênese, Gledhill e colaboradores (1966) encontraram valores Feulgen-DNA drasticamente reduzidos em espermatozóides, quando comparados com os de espermátides; contudo, o conteúdo de DNA, determinado através de microespectrofotometria ao U.V. não apresentava modificações . Considerando-se existir substituição no tipo de proteína básica associada ao DNA durante a diferenciação de espermátides em espermatozóides, esses autores se inclinaram a aceitar tal fator como influenciando a resposta diversa à reação de Feulgen nessas células. Em touros com baixa fertilidade, por outro lado, cujos espermatozóides não salientam diferenças morfológicas visíveis com relação aos férteis, foi relatado um aumento de colorabilidade após reação de Feulgen (Parez et al., 1960; Gledhill, 1966). Preliminarmente foi aventada a hipótese de alterações no conteúdo de DNA dos espermatozóides não férteis (Parez et al., 1960). Contudo, Gledhill (1966), através de estudos citofotométricos ao UV e dados microinterferométricos de massa seca, também demonstrou não haver diferenças no conteúdo de DNA dos espermatozóides dos touros férteis e não férteis. Esses achados possibilitaram demonstrar alterações no complexo DNA-pro

teína em algumas formas de infertilidade de espermatozóides e não no conteúdo de DNA, como os resultados quantitativos após reação de Feulgen pareceriam indicar à primeira vista.

Tem sido também sugerido que as proteínas nucleares desempenhariam papel na promoção de curvas de hidrólise diferentes, estimadas após reação de Feulgen. Mesmo utilizando a hidrólise ácida convencional à quente, Agrell e Bergqvist(1962) puderam determinar que os núcleos de células em fases embrionárias jovens e os de células diferenciadas apresentam diferentes curvas de hidrólise, após reação de Feulgen. Estes autores postularam que os achados dependeriam de diferentes ligações do DNA a outras macromoléculas nucleares, as quais o "protegeriam" diferentemente. Segundo eles, os núcleos rapidamente proliferantes seriam caracterizados pela presença de alguns complexos (dois ou três) de DNA mais lábeis, os quais desapareceriam com o avanço da embriogênese e aumento de diferenciação. Tal afirmativa se baseou no achado de que no primeiro caso as curvas de hidrólise sugerem dois ou três picos, enquanto no último só um pico é detectável. Essas frações de DNA mais lábil poderiam estar ligadas a RNA e seriam mais lábeis à hidrólise ácida simplesmente por serem menos "protegidas" por proteína (Agrell e Bergqvist, 1962). O ponto de vista de que a labilidade do ácidoapurínico à hidrólise dependeria das ligações entre este e proteínas básicas ou não histônicas continuou a ser mantido por Agrell e Bergqvist numa publicação posterior, de 1967.

Também nesse sentido, em 1966, Eberhard e Mazia descreveram em ouriço do mar que a liberação de resíduos de de-

soxirribose pela hidrólise ácida é mais lenta em embriões jovens do que nos mais velhos. Porém essa diferença não é mais constatada quando os estudos são efetuados em DNA isolado das mesmas preparações e submetido aos mesmos tratamentos experimentais. Concluem, portanto, que a liberação de resíduos de desoxirribose seria uma função da ligação do DNA a proteínas, mais do que de uma propriedade intrínseca ao DNA. Também Bachmann, em 1968, considera preponderante o papel das proteínas que se complexam ao DNA na obtenção de curvas de hidrólise dissímiles.

Em hepatócitos diplóides e tetraplóides e em linfócitos de ratos velhos, as curvas de hidrólise apresentam uma porção ascendente abrupta e uma porção descendente que alcança a linha do zero de modo mais assintótico do que as de animais jovens. Também nesse caso foram as proteínas do complexo DNP consideradas como desempenhando papel na labilidade acentuada do DNA à medida que os animais envelhecem (Sprenger et al., 1971).

Também durante a espermatogênese do rato foram detectadas diferentes curvas de hidrólise (Brachet et al., 1968). Estas foram sugeridas como relacionadas aos processos de condensação do núcleo e transformações celulares que culminam na formação do espermatozóide, com substituição das proteínas básicas somáticas associadas ao DNA por outras proteínas, ricas em arginina. Estas últimas se complexam mais intimamente e estavelmente ao DNA do que as primeiras, alterando-lhe a capacidade de transcrição (Allfrey et al., 1963), promovendo modificação de uma série de características citoquímicas e citofísicas do DNA (Lison, 1955; Vidal e Mello, 1976 - manuscrito em preparação).

Já em 1955, Lison havia reportado modificações na basofilia bem como nos valores Feulgen-DNA durante a maturação do espermatozóide do rato, relacionando as primeiras com as alterações no complexo DNA-proteína.

Brachet e colaboradores (1968) encontraram diferenças em resistência à hidrólise ao longo do desenvolvimento embrionário de Pleurodeles waltlii, através de métodos citoquímicos e também bioquímicos, e confirmaram os achados de Agrell e Bergqvist (1962).

Sendo as proteínas complexadas ao DNA fator importante na sua resposta à reação de Feulgen, é de se supor que os métodos citológicos preparacionais (fixação e hidrólise) possam afetar o grau de acessibilidade do DNA à hidrólise, dissociando-as em maior ou menor grau, removendo-as ou não, alterando-lhes a conformação macromolecular e permitindo também despolimerização mais rápida ou lenta do ácido apurínico. De longa data se conhece que, em dependência da fixação a que os núcleos são submetidos, as intensidades máxima e pós-máxima de coloração pelo reativo de Schiff poderão variar (Bauer, 1932; Hillary, 1939; DiStephano, 1948; Swift, 1955; Deitch, 1966a; Böhm, 1968; Böhm et al., 1968; Mittermayer et al., 1971; Mello e Zanardi, 1976). Alguma variabilidade na forma das curvas de hidrólise após diferentes tipos de fixação foi também comprovada por Deitch e colaboradores (1968). No geral os valores Feulgen-DNA máximos são mais elevados em núcleos fixados em formol do que nos fixados em etanol-ácido acético (DiStephano, 1948; Swift, 1955; Deitch, 1966; Mello e Zanardi, 1976). A cromatina

fixada em MFA apresenta, contudo, valores muito mais elevados do que a fixada em formol (Böhm, 1968). Os achados do presente trabalho estão, portanto, de acordo com esses dados. E tal comportamento das cromatinas do Triatoma infestans em estudo, frente a esses fixadores, é sugestivo de maior grau de solubilização do DNA, sobreponível à depuração, em núcleos fixados em etanol-ácido acético. Este fenômeno seria facilitado pela dissociação de alguns tipos de proteínas promovida pelo etanol acético e pela hidrólise ácida (Comings e Avelino, 1974). Considerando-se as propriedades do formol (Mellon, 1958; Böhm et al., 1968), pode-se concluir que fixadores que o contêm, mantêm o complexo nucleoproteico mais estável com relação à dissociação de proteínas do DNA, durante um tempo de hidrólise mais longo do que o esperado em termos de fixação em etanol acético. No caso da fixação pelo MFA (metanol-formol-ácido acético), tem sido ela particularmente aconselhada para material que será submetido à reação de Feulgen, pois não favorece, no decorrer da hidrólise ácida, o aparecimento de erros de proporcionalidade quanto aos valores Feulgen-DNA, em núcleos com graus diversos de ploidia ou alguns diferentes complexos DNA-proteína (Böhm et al., 1968).

Admite-se, portanto, que o fato da depuração ser verificada primeiramente nas cromatinas do Triatoma infestans fixadas em etanol-ácido acético, se deva à rápida dissociação de parte das proteínas associadas ao DNA, promovida numa primeira etapa pelo fixador e a seguir pela hidrólise ácida. A ação desta última provavelmente ficaria facilitada pela pró-

pria atuação do fixador. Com isso o DNA seria mais facilmente exposto à ação hidrolítica. Dos três fixadores testados, o MFA retardou mais o início da depuração.

Quanto às diferenças relacionadas ao fenômeno de solubilização do ácido apurínico, da porção descendente da curva de hidrólise, pode-se sugerir que proteínas dissociadas e/ou removidas do DNA pelo fixador ou induzidas por este a assim se comportarem ao longo da hidrólise, possam influenciar tal fenômeno diferentemente, conforme se trate de heterocromatina ou eucromatina. Com base nesse raciocínio, a remoção de proteínas parece se verificar em maior escala nas eucromatinas (e em E_s com maior intensidade) ou por serem estes componentes de tipo ou conformação diferente ou por estarem presentes em quantidades diversas.

Considerando-se os relatos de Dick e Johns(1967, 1968) sobre a atuação do etanol-ácido acético nas desoxirribonucleoproteínas, as proteínas removidas das eucromatinas e heterocromatinas do Triatoma infestans pelo fixador poderão incluir histonas mais ricas em arginina (H3,H4 e H2A). Conforme as próprias reações citoquímicas o demonstraram, não há dúvida que ocorrem histonas nas hetero- e eucromatinas em estudo (reação positiva ao fast green alcalino)(Alfert e Geschwind, 1953 ; Deitch, 1966b). Em termos de valores fast green- histonas em unidades arbitrárias,não se observam mesmo diferenças marcantes entre amostras de populações H_1 e H_s ou E_1 e E_s . Se a reação ao fast green alcalino for precedida de desaminação, tanto as heterocromatinas como as eucromatinas não mais se coram , ao

contrário do que se verifica nos núcleos de espermatozoides de gafanhoto, usados como controle. Isto indica que a razão arginina/lisina nas cromatinas somáticas em estudo não é muito maior do que 1 (Bloch, 1966; Berlowitz et al., 1970). A sua riqueza em lisina é demonstrada, por outro lado, pela resposta à reação do fast green-eosina (Bloch, 1966). Ficou demonstrado também que as histonas das cromatinas dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans, não extraídas pelo etanol-ácido acético, podem ser totalmente removidas com tempos curtos de hidrólise ácida (reação negativa ao fast green alcalino a partir de 2h de tratamento pelo HCl 0,1N em H₁, H_S, E₁ e E_S). Não haveria, nesses termos, evidência de uma resistência diferencial dessas proteínas à hidrólise longa nem prova de que estas proteínas tivessem papel direto no diferente padrão da porção descendente das curvas de hidrólise de Feulgen. Se a remoção das proteínas histônicas pelo fixador mais hidrólise ácida se reflete nos tipos de curva de hidrólise obtidos, imagina-se que o seja na indução de uma depurinação precoce do DNA, se comparada com a verificada nos preparados fixados em formol ou MFA. A este fenômeno possivelmente se soma também solubilização parcial do ácido apurínico. Se existem diferenças em histonas nas cromatinas do Triatoma infestans ou se ainda permanece algum conteúdo de histonas não coradas pelo fast green por não terem sido descomplexadas do DNA pelo TCA (Garcia, 1969b; Sonnenbichler e Nobis, 1970), estas não puderam ser detectadas com a metodologia empregada.

Não deve ser esquecido, contudo, que as histonas não são as únicas proteínas presentes nos núcleos e, em parti-

cular, nas cromatinas. Nestas ocorrem também proteínas não histônicas, que incluem as proteínas acídicas, e cuja proporção varia de conformidade com o material estudado (DuPraw, 1969).

Com o fito de se detectar se ao longo do processo hidrolítico havia remoção de proteínas não histônicas em material fixado em etanol acético, efetuou-se reação para histonas e proteínas totais em material hidrolisado de modo semelhante ao utilizado para reação de Feulgen. Visou-se, com isso, melhor interpretar os resultados referentes à porção descendente das curvas de hidrólise. Tanto a reação para proteínas totais como para histonas envolveu o emprego de um mesmo corante (fast green FCF), um mesmo grupo cromofórico do corante e as medidas de extinção foram todas efetuadas num mesmo comprimento de onda de 570nm. Variou-se apenas o pH da solução corante, obtendo-se com isso a especificidade adequada e desejada para proteínas totais (Alvarez e Cowden, 1966; revisões em Singer, 1960; Pearse, 1961; e Deitch, 1966b). O método do fast green alcalino tira vantagem do p.I. alto das histonas e de sua habilidade resultante em se ligar a corantes aniônicos em intervalos de pH em que a maioria das outras proteínas falham em se corar (Alfert e Geschwind, 1953). Há raros relatos de pequenas sub-estimativas do conteúdo de histonas pelo método do fast green alcalino em dependência do estado funcional nuclear, principalmente relacionado a envelhecimento de linfócitos e maturação de leucócitos (Garcia, 1969a; Noeske, 1971). Não obstante, este método tem sido de grande aceitação para detecções qualitativas e quantitatiti

vas de proteínas básicas.

As curvas espectrais para ambas reações com fast green, quando passíveis de determinação no intervalo de comprimentos de onda utilizados, apresentaram um pico localizado em um mesmo comprimento de onda (640nm) e um perfil muito semelhante, com largas regiões de paralelismo. Desde que, a partir de 2h de tratamento pelo HCl 0,1N não mais se coram histonas pelo fast green, a coloração remanescente, após esse tempo, se deve às proteínas não histônicas (fast green a pH 2,7). Nesse sentido o método é válido para indiretamente se proceder a uma estimativa relativa das proteínas não histônicas presentes nas hetero- e eucromatinas do Triatoma infestans após tempos longos de hidrólise.

Anteriormente à hidrólise com HCl (t_0), os valores referentes às histonas não removidas pelo etanol acético são 26,2% dos valores referentes às proteínas totais em H_1 e 15% em E_1 . Do fato de não terem sido extraídas pelo fixador, estas histonas podem ser consideradas mais ricas em lisina do que em arginina (Dick e Johns, 1968; Comings e Avelino, 1974).

Hã, assim, forte sugestão de que proteínas não histônicas, não removidas pela fixação, estejam ocorrendo em maior porcentagem em E_1 do que em H_1 . Era mesmo de se esperar que mais proteínas não histônicas fizessem-se presentes nas eucromatinas do Triatoma infestans, levando-se em conta os relatos já existentes para outras eucromatinas ou cromatinas geneticamente ativas, comparadas a cromatinas condensadas, heterocromáticas ou definidas simplesmente em termos de inatividade gênica (Alfert, 1958; Burdick e Himes, 1969; Dolbeare e Koenig,

1968 ; Frenster , 1965; Himes et al., 1969; Kaye e McMaster-Kaye, 1966 ; Kleinsmith et al., 1966 ; Zirkin, 1970 e 1973).

O fato de proteínas não histônicas permanecerem, pelo menos em parte, resistentes a 3lh de tratamento pelo HCl 0,1N está de acordo com alguns relatos, e dentre estes, o de Sandritter e colaboradores (1965). Estes pesquisadores observaram que uma pequena porcentagem de proteínas não histônicas permanece não removível dos núcleos de linfócitos, mesmo após 27 h de hidrólise com HCl 0,1N a pH 1,2 (fast green a pH 2,1), enquanto após 3h do mesmo tratamento não mais se detecta a presença de histonas (fast green a pH 8,1).

As proteínas não removidas pela hidrólise com HCl foram, no passado, denominadas cromossominas (Stedman e Stedman, 1943 e 1947) ou residuais (Mirsky e Ris, 1947 e 1951). O fato de serem não histônicas foi primeiramente reportado por Mirsky e Pollister (1946).

Não obstante o HCl em concentrações de 0,1M e 0,25M ser usado em procedimentos de extração de histonas (Phillips, 1962; Dounce e Hilgartner, 1964), há relato de que algumas proteínas básicas poderiam vir a se comportar também como "proteínas residuais" e não serem extraídas (Harbers, 1969; Sonnenbichler e Nobis, 1970; Mello et al., 1976). Segundo Sonnenbichler e Nobis (1970), na cromatina do timo de vitelo, proporções variáveis de histonas tratadas por uma hidrólise suave com HCl tornam-se insolúveis, permanecendo ligadas ao DNA. Também, em núcleos interfásicos ou cromossomos mitóticos de Allium cepa

10 a 15% das proteínas básicas não são extraídas mesmo após 4h de hidrólise com HCl 4N a 26°C (comprovação citoquímica após reação com fast green alcalino (Mello et al., 1976)). No presente trabalho, porém, dada a reação negativa ao fast green alcalino a partir de 2h de hidrólise, pode-se admitir que as proteínas histônicas, reativas ao fast green alcalino, tenham sido totalmente removidas já nos primeiros momentos de hidrólise e que as proteínas não histônicas, coráveis a pH 2,7, tenham permanecido não extraíveis após longos tempos desse tratamento e sejam verdadeiras "proteínas residuais". Conforme já mencionado, se algum conteúdo de proteínas histônicas não se dissociou do ácido apurínico (se este não foi removido pelo TCA) e não se corou com o fast green, não pôde ter sua participação avaliada nos fenômenos estudados.

Com base nos dados da Tabela XII há indicação de remoção de parte das proteínas não histônicas ao longo da hidrólise ácida. Embora muitos considerem que o tratamento pelo HCl 0,1M remova seletivamente histonas, existem relatos de solubilidade de algumas proteínas não histônicas nesse ácido (Sadgopal e Bonner, 1970a,b). Os padrões de diminuição dos valores, em unidades arbitrárias, supostos como devidos à remoção das proteínas não histônicas, ao longo da hidrólise, mostram algumas variações, conforme se trate de hetero- e eucromatina. Sendo estas proteínas passíveis de extração, removidas com diferente velocidade e intensidade, haveria um favorecimento quanto a se verificarem diferentes exposições do ácido nucleico à ação despolimerizante e solubilizante do HCl. Muito embora os valores

fast green-proteínas totais em t_0 se refiram também às proteínas básicas, fazendo-se os devidos descontos relativos à participação destas últimas nos resultados totais e analisando-se os valores obtidos após 3lh de hidrólise, nota-se maior remoção de proteínas não histônicas em E_1 do que em H_1 , ao longo da hidrólise. Essa suscetibilidade de proteínas não histônicas serem parcialmente removidas pelo HCl e, desse modo, como consequência, surgirem diferenças em solubilidade do ácido apurínico, poderia ser promovida pela fixação em etanol acético. Deve-se recordar que não se verificam diferenças sensíveis nas porções descendentes das curvas de hidrólise das heterocromatinas e eucromatinas fixadas em formol ou MFA e submetidas à reação de Feulgen. Nesse sentido também, demonstrou-se recentemente que parte das proteínas não histônicas pode ser removida pela fixação em etanol-ácido acético 3:1 (Comings e Avelino, 1974; Sivak e Wolman, 1974).

Quanto às diferenças da porção descendente das curvas de hidrólise, principalmente entre E_1 e E_s , fixadas em etanol-ácido acético, estas talvez possam ser devidas mais à porcentagem de proteínas não histônicas removidas ou remanescentes nas mesmas, do que a variações em tipos ou conformações moleculares dessas proteínas e/ou maior presença de DNA complexo a RNA em E_s . Falam em favor destas duas últimas hipóteses os seguintes fatos: com referência aos dados da Tabela XII, parece existir maior conteúdo de proteínas totais em H_s se comparado a H_1 , porém E_1 e E_s não diferem. Após 3lh de hidrólise pelo HCl, continuam a ser verificadas as mesmas relações entre H_1-H_s e E_1-

-E_s. Por outro lado, os valores fast green-histonas são muito semelhantes, quando se compara E₁ x E_s e H₁ x H_s sem tratamento hidrolítico pelo HCl. O fato dos valores referentes às proteínas não histônicas de E₁ e E_s não diferirem e os de H₁ e H_s diferirem em certa proporção, após 3lh de hidrólise, não significa, porém, que mesmos tipos de proteínas acídicas tenham ficado presentes ou tenham sido removidos após fixação + hidrólise, nas cromatinas em estudo. Estas proteínas poderiam mesmo estar diferentemente complexadas ao ácido apurínico, dando-lhe diferente capacidade de resistência à solubilização.

Embora tenha sido demonstrada uma cinética de hidrólise diferencial, comparando-se as heterocromatinas com as eucromatinas das células epiteliais dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans fixados em etanol acético, e Kiefer e colaboradores (1972) não hajam encontrado diferenças nas curvas de hidrólise e índices a elas relacionados, nas hetero- e eucromatinas do Microtus agrestis, tais resultados não são conflitantes. Kiefer e colaboradores (1972) efetuaram fixação do material em MFA e as cromatinas do Triatoma infestans semelhantemente fixadas também não apresentaram diferenças. Kiefer e colaboradores (1972) propõem o cálculo, a partir de valores Feulgen-DNA, de índices heterocromatina/(eucromatina + heterocromatina) para os diferentes tempos de hidrólise. O fato da variação desses índices ser muito baixa, no Microtus agrestis, levou estes autores a considerar que não haveriam diferenças quanto à cinética de hidrólise nas cromatinas por eles analisadas. No caso do Triatoma infestans, as curvas de hidrólise percentuais de cro-

matinas fixadas em formol ou MFA tendem a mostrar pequenas diferenças de perfil em função do último tempo de hidrólise no qual os valores Feulgen-DNA foram pesquisados. Essas diferenças são também deduzidas a partir dos dados de Kiefer e colaboradores (1972)(hidrólise longa), porém, tanto no caso por eles estudado, como no do presente trabalho, passam a ser negligenciáveis quando se calculam as razões heterocromatina/(eucromatina + heterocromatina) x 100. No Triatoma infestans, a variação nos valores dessas razões, calculados a partir das curvas de hidrólise ajustadas, é mínima, quando se trata da fixação pelo formol ou MFA. No caso da fixação pelo etanol-ácido acético, há uma variação considerável desses valores, não só para $H_1/(E_1 + H_1)$ e $H_s/(E_s + H_s)$, mas também para $E_1/(E_s + E_1)$, sugerindo diferente comportamento frente à hidrólise não apenas para as heterocromatinas comparadas às respectivas eucromatinas, porém também para as eucromatinas dos dois tipos celulares comparados entre si. Quanto à razão $H_1/(H_s + H_1)$, mesmo calculada em material fixado em etanol acético, sua variação é também mínima, muito embora as curvas de hidrólise percentuais sugiram alguma diferença em sua porção descendente, principalmente considerando-se os valores Feulgen-DNA correspondentes aos tempos de hidrólise ao redor de 24-31h.

O diferente comportamento das cromatinas frente à hidrólise ácida, quando se varia a fixação, é deduzido mesmo a partir das curvas não ajustadas matematicamente e dos histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA. Nota-se, inclusive, que as curvas não ajustadas, de material fixado em etanol acéti

co, são as únicas a apresentarem dois picos, lembrando muito o comportamento das cromatinas estudadas por Agrell e Bergqvist (1962) e suposto, por esses autores, como sendo devido a diferentes labilidades do DNA à hidrólise ácida, em função da complexação do ácido nucleico com proteínas. Se se admitir a validade dessas curvas não ajustadas, é para se supor a existência de mais de um grau de labilidade do DNA à hidrólise, quando certas proteínas a ele complexadas são removidas, tanto para as heterocromatinas como para as eucromatinas. (Isto estaria de certa forma em acordo com as proposições de Rasch e Rasch(1973), inferidas através de estudos matemáticos, de que pelo menos 2 frações diferentes de complexos DNA-proteína, com diferentes tempos de degradação pela hidrólise ácida, poderiam ocorrer numa cromatina.) Além disso, esses padrões de labilidade difeririam, quando se comparasse heterocromatina vs. eucromatina. Deve-se também mencionar que curvas de hidrólise não ajustadas, das mesmas cromatinas do Triatoma infestans, fixadas em formol, porém hidrolisadas em HCl 4N à temperatura ambiente (25-26°C) passam a apresentar também dois picos (Mello, 1975- dados não publicados). Neste caso, com a ação de uma hidrólise mais drástica, parece ter-se podido evidenciar, mesmo num material fixado em formol, a existência de diferentes complexos DNP (desoxirribonucleo proteicos), com diferente resistência à hidrólise, nas hetero- e eucromatinas.

Numa curva de hidrólise ajustada à função de Bateman encontra-se apenas um pico (Böhm e Seibert, 1966), razão pela qual as curvas não ajustadas, com dois picos, passarão a

ter um perfil alterado, com apenas um ponto máximo, após o ajuste. Com esse ajuste, inclusive, há alteração em alguns casos, quanto ao valor dos tempos de hidrólise correspondentes aos dados Feulgen-DNA máximos. Porém esse ajuste, embora trabalhoso, é considerado útil e necessário para efeito de comparação entre curvas de hidrólise atípicas (Böhm e Seibert, 1966; Rasch e Rasch, 1973). É principalmente válido quando são estudados simultaneamente núcleos com diversos graus de ploidia submetidos à reação de Feulgen, como é o presente caso. Não se tem observado diferenças no perfil de curvas de hidrólise percentuais estimadas, em separado, para núcleos com graus diversos de ploidia (Böhm e Sandritter, 1966; Rasch e Rasch, 1973; Vahs, 1973), ou seja, elas espelham uma mesma cinética. Contudo, considerados em conjunto, núcleos com dois ou mais graus de ploidia diferentes poderão fornecer valores Feulgen-DNA com larga dispersão e intervalo de confiança e desvio padrão da média elevados, para cada tempo de hidrólise. No presente trabalho supõe-se que o perfil das curvas de hidrólise ajustadas à função do tipo da de Bateman, seja o que mais se adapta aos dados obtidos e ao tipo de reação citoquímica envolvida (Böhm e Seibert, 1966; Rasch e Rasch, 1973; Ballester, 1974- informação pessoal).

No caso dos tubos de Malpighi do 5º instar ninfal do Triatoma infestans, 50% dos núcleos com um único cromocentro apresentam grau de ploidia igual a $32n$ e 50% igual a $64n$ (os graus de ploidia são aqui definidos em termos de valores Feulgen-DNA comparados aos do 1º instar e às células germinativas masculinas (Mello, 1975 e 1976). Os núcleos com vários cro

nocentros, por outro lado, são em sua maioria 64n (portanto acima de 50% do total); são encontrados também núcleos 32n e, às vezes, em ninfas recém-mudadas para o 5º instar, núcleos 16n (no máximo 25%)(Mello, 1975 e 1976). Como no presente trabalho foram utilizadas ninfas com aproximadamente mesma idade (15 dias após a última muda), alimentadas em mesmos intervalos regulares de tempo, admite-se não terem sido incluídos núcleos 16n nas amostras analisadas. A própria observação dos histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA não indica a ocorrência de dispersões correspondentes a núcleos com três graus de ploidia dissímiles. Se muito maior frequência de núcleos 64n es tivesse incluída nas amostras de células distais do que nas de proximais, conseqüentemente os valores Feulgen-DNA seriam mais elevados para E_s e H_s , se comparados a E_1 e H_1 . Contudo, tal não se observou nos histogramas de frequência dos valores Feulgen-DNA. Portanto, imagina-se que as porcentagens de núcleos 32n e 64n nas amostras de núcleos com vários cromocentros estejam próximas daquelas dos núcleos com um só cromocentro. Essa homogeneidade em graus de ploidia para os dois tipos celulares é particularmente adequada no sentido de não se introduzir um parámetro cuja extensão em participação nas curvas de hidrólise talvez não pudesse ser quantificada, quando se pretendesse confrontar $H_1 \times H_s$ e $E_1 \times E_s$.

O fato de serem detectadas diferentes curvas de hidrólise para as hetero- e eucromatinas do Triatoma infestans, embora em condições especiais de fixação, sugere certa semelhança dos presentes achados com os de Mittermayer e colaboradores

(1971), muito embora estes autores tenham definido as "hetero - cromatinas" e "eucromatinas" de seu trabalho apenas em termos morfológicos de condensação.. Esses autores admitem ainda que , por simples compactação, induzida artificialmente in vitro, uma cromatina não condensada poderia passar a exibir o padrão de hidrólise de uma cromatina condensada. Isto poderia ser promovido também por mera alteração de tonicidade (Garcia,1969b; Sullivan e Garcia, 1970), a qual não deixa de modificar a relação de complexação DNA-proteínas. No caso do Triatoma infestans, porém, não se deve esquecer que as heterocromatinas não são definidas unicamente em termos de cromatina condensada, mas também em termos de ausência de transcrição, replicação tardia do DNA (Mello, 1969, 1971, 1975), riqueza em DNA repetitivo (conforme será discutido mais para a frente) e em bases AT do seu DNA (Mello e Vidal, 1976- trabalho em andamento). E realmente existem diferenças em proteínas (tipos e/ou grau de complexação com DNA ou DNP e/ou conformação molecular) quando se comparam as heterocromatinas com as eucromatinas e as próprias eucromatinas entre si, conforme ficou demonstrado no presente trabalho. No caso do Triatoma infestans, portanto, a remoção ou dissociação dessas proteínas é que tornaria possível o diferente comportamento das cromatinas frente à reação de Feulgen, encontrado em condições especiais de fixação e hidrólise.

Os resultados referentes à cinética de hidrólise podem ser considerados válidos, em termos de cuidados operacionais e técnicos de levantamento de dados citofotométricos e cariométricos, dentro dos limites de probabilidade de erros pres

supostos para cada metodologia. Os valores Feulgen-DNA de $H_1 + E_1$ e $H_s + E_s$ obtidos através de uma "varredura manual" mostram-se mesmo altamente correlacionados com os obtidos para núcleos totais pelo método de duplo comprimento de onda.

Também no presente trabalho foram analisadas as curvas de absorção de Feulgen nas diversas cromatinas e nas várias condições experimentais, visando-se detectar diferenças que pudessem ser correlacionadas aos achados de cinética de hidrólise.

Estudos das curvas de absorção de Feulgen in vitro e in situ têm salientado para ambas dois máximos distintos, um na região de $\lambda = 575\text{nm}$ (in vitro) ou 585nm (in situ) e outro em 550nm (Moses, 1951). Tem sido também observado que as extinções correspondentes aos dois máximos variam independentemente uma da outra, em função da presença de proteína, tempo de hidrólise e pH da solução hidrolítica (Moses, 1951).

Para Kasten (1956, 1957, 1958 e 1960), que estudou curvas espectrais de Feulgen em diversos tipos celulares de diferentes tecidos, órgãos e espécies in situ, elas apresentariam um máximo ao redor de $\lambda = 570-585\text{nm}$ (mais frequentemente 570nm) e um ombro secundário em $\lambda = 530-550\text{nm}$. As variações, quando detectadas, seriam observadas somente na região do ombro, como resposta a diferentes fixações e tempos de hidrólise. Isto estaria de acordo com achados anteriores de Swift (1953 e 1955), o qual verificou que à medida que o tempo de hidrólise aumenta, a curva de absorção, que inicialmente apresentava um único pico ao redor de $570-575\text{nm}$, desenvolve um ombro em $530-550\text{nm}$, até que, em tempos mais prolongados de hidrólise, este segundo máximo de

absorção se torna um pico tão pronunciado quanto o observado em $\lambda = 570\text{nm}$. Diferenças semelhantes nas curvas de absorção de Feulgen em função do tempo de hidrólise foram também constatadas por Ornstein (1956) e Mello e Zanardi (1976).

Segundo Alfert (1955), as curvas de absorção de núcleos submetidos à reação de Feulgen diferem se eles são fixados em Carnoy (máximo em 560nm) ou formol (máximo em 570nm). Kasten (1956), contudo, não confirma tais achados, relatando para núcleos de hepatócitos em ambas condições de fixação, picos em 580nm e leves variações em relação ao pico secundário.

Segundo Sibatani (1950, 1953), em solução, o máximo da curva espectral de Feulgen migra de $\lambda = 546\text{nm}$ para $575\text{--}580\text{nm}$, quando se adiciona um excesso de histona ao DNA. Segundo Hardonk e van Duijn (1964a) a adição de albumina de soro bovino ao DNA também deslocaria o máximo de absorção para comprimentos de onda mais longos. In situ, porém, não foram constatadas alterações nas curvas de absorção, após tratamento dos núcleos com pepsina ou H_2SO_4 , o que deveria promover a digestão das proteínas nucleares e remoção de histonas, respectivamente (Kasten, 1956). Deitch (1966a) critica o planejamento destes últimos experimentos, alegando que o efeito da presença de proteínas sobre as curvas de absorção de Feulgen talvez se manifestasse apenas se tais componentes houvessem sido removidos de núcleos não fixados, o que não foi realizado.

Em linhas gerais há, portanto, concordância entre os autores de que o prolongamento do processo hidrolítico ácido resulta num maior pronunciamento do ombro da curva espectral de Feulgen (Swift, 1953, 1955; Ornstein, 1956; Kasten ,

1956, 1960; Mello e Zanardi, 1976). Por outro lado, é ainda muito discutido o papel que a presença de proteínas nucleares poderia desempenhar na produção de diferentes perfis das curvas de absorção (Sibatani, 1950 e 1953; Moses, 1951; Swift, 1953 e 1955; Hardonk e van Duijn, 1964a,b; Deitch, 1966a).

No presente trabalho, como regra, as curvas de absorção apresentaram um pico na região de 565-575nm e um ombro em 520-530nm, à semelhança do que se tem relatado para outros materiais. Observou-se também que o ombro se tornava mais pronunciado à medida em que se prolongava a hidrólise. Este fenômeno foi, contudo, muito mais evidente nas heterocromatinas do que nas eucromatinas. Ao mesmo tempo observou-se que o pico da curva espectral das heterocromatinas se localizava em comprimentos de onda mais longos do que o das eucromatinas. Esta verificação foi também mais notória em tempos mais longos de hidrólise. Não se constatarem diferenças entre H_1 e H_S ou E_1 e E_S .

Mesmo em material diferentemente fixado foi encontrado o mesmo comportamento acima relatado. Houve apenas variação em termos dos tempos de hidrólise para os quais se constatarem alterações nos picos e ombros das curvas. Esta variação é para ser esperada, se for considerada a influência da fixação na cinética de hidrólise, já discutida.

Quanto às alterações no perfil da curva de absorção, à medida que avança a hidrólise, é possível que a remoção diferencial de proteínas nucleares pela ação do fixador mais hidrólise exerça algum papel na produção desses padrões dissimiles. Isto, partindo-se da idéia já discutida de que a remoção

de proteínas facilitaria em maior ou menor grau a ação hidrolítica do HCl sobre o DNA.

Com relação ao pronunciamento do ombro da curva de absorção espectral com o avanço da hidrólise, Deitch (1966a) sugere uma possível interpretação. Segundo ela, os dois pontos máximos da curva de absorção de Feulgen corresponderiam à ocorrência de moléculas do reativo de Schiff substituídas com um ou dois grupos aldeídos. O pico principal estaria relacionado com as moléculas mono-substituídas e o ombro com as di-substituídas. Com o avanço da hidrólise, o número de moléculas di-substituídas se tornaria maior à medida que purinas vicinais fossem eliminadas do DNA e as moléculas do reativo de Schiff se tornassem ligadas a dois aldeídos adjacentes. Consequentemente, o ombro da curva espectral se tornaria mais evidente.

Esta hipótese parece plausível, no caso em estudo, principalmente se for considerado que o maior pronunciamento do ombro da curva, para tempos longos de hidrólise, se verifica nas heterocromatinas, as quais, em termos da intensa fluorescência após tratamento por quinacrina (Mello e Vidal, 1976 - trabalho em andamento) e da resposta ao método de denaturação-renaturação de Arrighi e Hsu, parecem conter um DNA repetitivo rico em bases AT

Quanto à localização do pico de absorção das eucromatinas em comprimentos de onda mais curtos do que nas heterocromatinas, pelo menos no caso de fixação em etanol acético, pode ser que a presença de proteínas não histônicas, removidas diferentemente pela fixação mais hidrólise, tenha alguma influ

ência sobre tal fenômeno. Isto, se forem lembrados os achados de Sibatani (1950 e 1953) e Hardonk e van Duijn (1964a) sobre o papel da adição de proteína (histona e albumina, respectivamente) no deslocamento do máximo de absorção da curva espectral de Feulgen.

Passando-se agora à consideração dos achados de basofilia e anisotropia nucleares, deve-se de início definir a especificidade das reações utilizadas com o fito de se empreender tais observações.

Os fenômenos de basofilia e metacromasia obtidos quando da coloração por soluções de azul de toluidina têm sido utilizados para demonstração citoquímica qualitativa de glicosaminoglicanas ácidas, proteínas e ácidos nucleicos (Lison e Mutsaers, 1950; Lison, 1960). A basofilia é devida à ligação eletrostática de moléculas de um corante catiônico a moléculas aniônicas de um substrato. A basofilia é definida como metacromática para o caso do azul de toluidina, quando há deslocamento do pico principal da curva de absorção espectral, correspondente ao cromóforo, para um comprimento de onda mais curto (hipsochromismo) e simultaneamente um hipocromismo do pico anterior. É verificada nas seguintes condições: interação com substratos que apresentem sítios aniônicos disponíveis, aumento de concentração do corante, "salting out" e decréscimo de temperatura (Lison, 1933, 1935; Bergeron e Singer, 1958; Toepfer, 1970). Para o caso do azul de toluidina, há metacromasia quando o pico principal da curva de absorção desloca-se de 630nm para comprimentos de onda mais curtos (ao redor de 546nm, metacromasia γ ; ao redor de 590nm,

metacromasia β), com uma diminuição simultânea dos valores de extinção em 630nm (Bergeron e Singer, 1958; Toepfer, 1970).

A basofilia nuclear detectada com soluções de azul de toluidina a pH 4,0 e 3,4 admite-se que seja devida à presença de ácidos nucleicos (Lison e Mutsaers, 1950; Lison, 1960). As moléculas deste corante tiazínico se ligam eletrostaticamente aos grupos PO_3^- livres do DNA ou RNA, não ligados, portanto, a proteína (Lison e Mutsaers, 1950; Lison, 1955 e 1960; Davison e Butler, 1956). Tem-se também aventado a possibilidade de que as moléculas de corantes tiazínicos, como as do azul de toluidina e do azul de metileno possam adicionalmente se intercalar entre as bases do DNA, em solução (Miura e Ohba, 1967; Pal e Ghosh, 1973), à semelhança do que se acredita acontecer com as acridinas (Lehrman, 1961, 1963 e 1964; Armstrong et al., 1970). A responsabilidade dos grupos PO_3^- nos achados de basofilia metacromática do DNA in situ pode ser, porém, demonstrada, por exemplo, efetuando-se comparação do resultado das seguintes reações: 1. tratamento do material por uma solução de azul de toluidina a pH 3,4 adicionada de íons Ba^{++} ; 2. tratamento por uma solução de azul de toluidina a pH 3,4, adicionada de íons UO_2^{++} . A basofilia metacromática devida a radicais PO_3^- é anulada quando se utiliza a solução de azul de toluidina adicionada de UO_2^{++} , o que não acontece quando se emprega a solução com íons Ba^{++} , isto desde que a miliequivalência de ambos os íons seja baixa (Lison, 1960). Os cátions UO_2^{++} se ligam aos grupamentos PO_3^- do DNA, bloqueando-os e impedindo a ligação eletrostática de moléculas de azul de toluidina nesses sítios do substrato. O mesmo

não se verifica com os íons Ba^{++} , utilizados em mesma equivalência que os UO_2^{++} , pois a competição dos dois tipos de cátions com as moléculas do corante catiônico não se efetua com a mesma intensidade.

Uma evidência prática, mostrando o papel dos grupos PO_3^- do DNA nos achados de basofilia, foi a descoberta de que um bloqueio maior desses grupamentos por proteínas ricas em arginina, que substituem as histonas somáticas, durante a espermatogênese do rato e do gafanhoto Staurorhectus longicornis, altera sensivelmente os padrões de basofilia nuclear, após coloração com o corante tiazínico, ao mesmo tempo, porém, que o conteúdo de DNA permanece constante (Lison, 1955; Mello e Vidal, 1975). Nas abelhas, os espermatozoides apresentam uma proteína nuclear rica em lisina (Bloch, 1969), à semelhança das proteínas somáticas, complexada ao DNA, fazendo com que muitos fosfatos livres do DNA permaneçam disponíveis à ligação com o azul de toluidina; por conseguinte, os padrões de basofilia nuclear não se apresentam alterados nestes espermatozoides (Mello e Vidal, 1973).

O fenômeno de metacromasia, no caso da coloração pelo azul de toluidina, acha-se intimamente ligado ao empilhamento de moléculas do corante e proximidade entre elas (Davison e Butler, 1956; Bergeron e Singer, 1958; Toepfer, 1970). Quanto mais próximas entre si as moléculas do corante, formando dímeros, trímeros, polímeros, maior será a interação de seus elétrons π , refletindo-se sobre a localização do pico de absorção da curva espectral. Assim, à maior proximidade entre si das mo-

léculas de azul de toluidina, e a seu empilhamento mais perfeito, corresponderá um deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda mais curtos (efeito hipsocrômico). Se as moléculas se tornarem muito distantes umas das outras, o máximo de absorção se deslocará para comprimentos de onda longos (efeito batocrômico)(revisões em Bergeron e Singer, 1958; Toepfer, 1970). O achado, portanto, de curvas de absorção espectral de basofilia nuclear, com máximos localizados ao redor de 550-570nm é sugestivo de uma proximidade mais íntima, no substrato, de sítios de ligação disponíveis para o corante. Tratando-se de um substrato como o DNA, isto indicaria que muitos de seus PO_3^- , não complexados com histonas ou outras proteínas, estariam em sequência, próximos uns dos outros (Davison e Butler, 1956). Se existe intercalação de algumas moléculas de azul de toluidina no interior da hélice do DNA, entre os pares de bases, os padrões de basofilia "in situ" não o demonstram, pois os achados não se afastam do esperado em termos de estaqueamento de moléculas de corante ligadas aos grupos PO_3^- do DNA (Mello e Vidal, 1976). Talvez nessas condições, a intercalação seja em grande parte prejudicada por fatores tais como impedimentos conformacionais promovidos por proteínas, conforme já proposto por Miura e Ohba (1967). Deve-se também salientar que, se houvesse intercalação de moléculas de azul de toluidina no interior da dupla hélice do DNA, o pico característico da curva de absorção se localizaria em $\lambda = 648nm$ (Miura e Ohba, 1967). Por outro lado, quando uma curva de absorção de basofilia nuclear salienta um máximo em 630nm, como é o caso da cromatina de espermátides em estado avançado de ma-

turação e espermatozóides do gafanhoto Staurorhectus longicornis (dados n.p.) (Mello e Vidal, 1975) e do touro (Mello, 1975), sendo que em fases iniciais da espermatogênese os picos de absorção para as cromatinas indicavam uma metacromasia γ , deduz-se que os fosfatos do DNA disponíveis ao corante se tornaram pouco numerosos e afastados entre si. Isto tudo como função da relatada substituição em proteínas básicas complexadas ao DNA nesses materiais (Bloch, 1966; Gledhill et al., 1966; Gledhill, 1970).

Na análise de um padrão de basofilia leva-se em conta, portanto, o perfil da curva de absorção espectral, o comprimento de onda de seu pico e a ocorrência de ombros, mais do que os próprios valores de extinção isoladamente, os quais, em função da espessura do material algumas vezes não são comparáveis. Também para se definir um padrão de basofilia costuma-se proceder ao cálculo de um índice metacromático, que é a razão de extinções estimadas em dois comprimentos de onda : 530 e 630 nm ou 555 e 625nm (Wiame, 1947; Toepfer, 1970; Mello et al., 1973). O significado do índice metacromático é, portanto, definido em termos do próprio fenômeno de metacromasia.

Se as moléculas de azul de toluidina, planares em estrutura, se dispuserem de modo orientado (efeito estatístico total), devido à disposição ordenada do substrato a que se ligam, serão observados, em luz polarizada, fenômenos ópticos conhecidos como anisotropias (birrefringência e dicroísmo), no caso, extrínsecas. Os princípios físicos fundamentais da microscopia de polarização e sua aplicação a material biológico acham-se amplamente relatados na literatura especializada (Schmidt,

1938, 1958; Bartels, 1966; Bennett, 1967; Scheuner e Hutschenreiter, 1975). Resumidamente, pode-se generalizar que um meio e-xibe anisotropia (birrefringência ou dicroísmo) quando é estruturado por alguma sorte de arranjo assimétrico, e espacialmente orientado, de moléculas portadoras de cargas ressonantes, capazes de interagir com as oscilações de radiação eletromagnética incidente. Um meio assim caracterizado, transmitirá a luz polarizada com diferentes velocidades para diferentes direções de propagação, pois terá mais de um índice de refração e de um coeficiente de absorção.

A maioria dos objetos biológicos anisotrópicos são corpos uniaxiais, ou seja, possuem apenas um eixo óptico. Eixo óptico, em qualquer meio dielétrico homogêneo, é aquela direção paralela à qual um feixe de luz linearmente polarizado pode se propagar com velocidades iguais de transmissão, para todos azimutes de polarização do vetor elétrico do feixe. O índice de refração correspondendo à direção na qual a luz linearmente polarizada vibra paralela ao eixo óptico (raio extraordinário) é chamado n_e ; o índice relativo às vibrações de luz perpendiculares ao eixo óptico (raio ordinário) é denominado n_o . A birrefringência (B) é definida como sendo $B = n_e - n_o$. Num meio birrefringente, o índice de refração maior, seja n_e ou n_o , é denominado γ e corresponde ao eixo de transmissão lenta para a luz polarizada, ou seja, quando o vetor elétrico desta se encontra paralelo às ligações químicas orientadas do meio. Este eixo também se denomina direção γ . A transmissão é lenta porque os elétrons ressonantes do meio anisotrópico, nessa direção, pela a-

ção da luz transmitida, são deslocados de seus trajetos comuns de ressonância.

Ao se incidir uma frente de luz polarizada num objeto, o comprimento de onda da luz dentro do meio muda em função dos índices de refração desse meio. Em outras palavras, o comprimento de onda de um raio extraordinário oscilando na direção γ será menor com relação ao do raio ordinário. Por esta razão surgirá uma diferença de fase na frente de luz emergente, que dependerá não só da birrefringência ($n_e - n_o$), mas também da espessura (d) da preparação e é expressa através do que se denomina retardo óptico (R.O.), uma grandeza mensurável ao microscópio de polarização. $RO = d(n_e - n_o)$. Esta mensuração é feita por meio de compensadores especiais e sua unidade é dada em graus ou nanômetros.

O sinal da birrefringência poderá não ser o mesmo para diferentes comprimentos de onda de luz incidente, dependendo da dispersão de cada λ em relação aos índices de refração n_e e n_o .

O dicroísmo, por outro lado, é outra manifestação de anisotropia, e pode ser definido como uma absorção seletiva de luz polarizada. Quando o eixo das ressonâncias do meio anisotrópico estiver orientado paralelo ao vetor elétrico da luz plano polarizada, haverá absorção máxima.

Sabe-se ser o DNA uma macromolécula com propriedades ópticas especiais em função do arranjo ordenado de suas bases nitrogenadas pareadas e empilhadas. As bases se dispõem perpendicularmente ao eixo longo da macromolécula (configuração

B do DNA), promovendo assim fenômenos de birrefringência negativa ($n_o > n_e$; $\gamma = n_o$) (White e Elmes, 1952; Wilkins e Randall, 1953). Esta birrefringência, medida em diferentes comprimentos de onda do espectro visível não apresenta nenhuma inversão de sinal, ou seja, é sempre negativa. Este fenômeno é denominado dispersão normal da birrefringência. Porém, se moléculas de DNA forem coradas com uma solução de azul de toluidina, sensíveis modificações em seus padrões de anisotropia passarão a serem verificadas. Essas novas propriedades serão devidas agora ao empilhamento das moléculas de azul de toluidina, próximas e em sequência (ligadas aos grupos PO_3^- do DNA) e à interação de suas nuvens eletrônicas e orientação do seu eixo de ressonâncias. O grupo quinonadiimina das moléculas do corante se orienta estatisticamente de modo perpendicular ao eixo longo do DNA. O estaqueamento das moléculas de azul de toluidina, numa forma conjunta de hélice, faz com que a dispersão normal da birrefringência do DNA, no visível, se transforme numa dispersão anômala, ou seja, o sinal da birrefringência passará a se inverter a partir de um comprimento de onda a se determinar. Construída uma curva, portanto, com os valores dos retardos ópticos correspondentes a essa birrefringência nos diferentes comprimentos de onda, esta apresentará um ou mais pontos de inflexão. Ainda no caso do DNA complexado com moléculas de azul de toluidina, poderá ser constatado no visível também o fenômeno de dicroísmo, o qual, no DNA não corado, somente seria detectado no espectro infra-vermelho ou ultravioleta (Caspersson, 1940a,b; Sutherland, 1959; Thorrell e Ruch, 1951). O dicroísmo detectado em material corado a-

cha-se intimamente relacionado com os elétrons ressonantes das moléculas do corante e aos seus planos de vibração com relação ao vetor elétrico da frente de onda polarizada incidente. Em complexos DNA-histonas, por outro lado, 60 a 85% dos grupamentos fosfatos do DNA poderão estar bloqueados por histonas (Vendrely e Vendrely, 1966; DuPraw, 1969; Itzhaki, 1971), mas mesmo assim o número de fosfatos livres, permitindo acesso a moléculas de azul de toluidina é tal a ponto de serem exibidos fenômenos de dispersão anômala da birrefringência e dicroísmo linear. Algumas porções de DNA podem mesmo se achar envolvidas por histonas sem que haja ligação direta das mesmas ao ácido nucleico (Itzhaki, 1971). Exemplos de material em que se constatarem os fenômenos de anisotropia acima mencionados, nos complexos DNA-proteína, após coloração com solução de azul de toluidina: esfregaços nucleares de medula óssea (Romhányi, 1967), cromossomos mitóticos animais (Vidal, 1972b, c) e vegetais (Mello e Vidal, 1974), heterocromatina e eucromatina isoladas de hepatócitos (Vidal, 1972d), cromossomos politénicos (Vidal e Cassarteli, 1973), cromossomos meióticos (Mello e Vidal, 1975) e núcleos de espermatozoides de abelha, cuja proteína complexada ao DNA é do tipo somática, rica em lisina (Mello e Vidal, 1973; Mello, 1973). Em espermátides do gafanhoto, em que a proteína somática é substituída por outra, rica em arginina (Bloch e Brack, 1964; Bloch, 1966 e 1969) e que se complexa com muito maior número de grupos PO_3^- do DNA do que a anterior (DuPraw, 1969), o padrão de dispersão da birrefringência é aquele de fios de DNA puro, não corados (Mello e Vidal, 1976). Por simples tratamento dessas cé-

lulas com solução 2SSC, que remove algumas proteínas da cromatina, retornam as propriedades ópticas apresentadas pelos cromossomos meióticos respectivos (Mello e Vidal, 1976).

No presente trabalho, estudando-se as características de basofilia e anisotropia das heterocromatinas e eucromatinas do Triatoma infestans, observou-se intensa coloração das mesmas por soluções de azul de toluidina a pH 5,0, mesmo após tratamento por RNase. Essa coloração, contudo, não é unicamente devida à presença de DNA. A esse pH podem também se corar as proteínas nucleares (Lison, 1960). A pH 4,0 é possível se avaliar a participação de RNA na basofilia detectada. Após tratamento com RNase, exceto em H_1 , os picos das curvas de absorção espectral migram para comprimentos de onda mais longos e um ombro em comprimentos de onda mais curtos passa a se tornar visível. Há, portanto, diminuição em número e proximidade de grupos PO_3^{--} disponíveis a receberem as moléculas de corante, salientando que talvez houvesse presença de RNA, mesmo em H_S . Consequentemente, o índice metacromático de H_S , E_S e E_1 se torna $\approx 1,00$, enquanto o de H_1 continua $\neq 1,00$. Não se pode, contudo, excluir a possibilidade de que algum RNA citoplasmático, superposto à imagem do núcleo, tenha sido classificado como pertencente às diferentes cromatinas, no material não digerido, uma vez que o esmagamento foi muito delicado. No entanto, segundo esta hipótese, deveria ter sido encontrado também RNA em H_1 , o que não se verificou. O fato de não se comprovar alterações nas curvas espectrais de basofilia em H_1 , nesse pH, após tratamento pela RNase, estaria de acordo com as observações de ausência de

transcrição nessa cromatina (Mello, 1969). Segundo observações de Geitler (1938, 1939a,b), para diversos hemípteros, cromocentros semelhantes aos do tipo encontrado nas células proximais dos tubos de Malpighi de ninfas do 5º instar do Triatoma infestans albergariam em seu interior o nucléolo. Em todas observações de núcleos dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans efetuadas desde 1968 não se notou a presença de nucléolo (s), excluída a região do cromocentro (Mello - dados não publicados). Observações ao microscópio eletrônico (Mello e Dolder, 1976-trabalho em andamento) indicam a presença de nucléolo em íntima associação a H_1 ou a alguns dos cromocentros de H_S . Pode, assim, parecer estranho, à primeira vista, que um tratamento por RNase não haja afetado o padrão de basofilia de H_1 . Contudo, aventa-se a possibilidade da remoção de RNA do núcleo exigir maior tempo de digestão enzimática, por causa de impedimentos conformacionais (inclusive tipo de complexo RNA-proteínas) ou que a porcentagem de RNA real ou corado nesse nucléolo seja tão baixa a ponto de não alterar o padrão de basofilia do DNA. Melhores esclarecimentos a esse respeito poderão advir de experimentos futuros em que se planeja investigar a incorporação de uridina, actinomicina D e de alguns amino-ácidos marcados nessas cromatinas, segundo diversos tempos de incorporação e em diversas épocas de vida do inseto, ao nível de ultra-estrutura.

O achado de uma das curvas espectrais de H_1 (pH 4,0), semelhante a H_S , está de acordo com o fato de que o padrão heterocromático H_S provém de um H_1 (Mello, 1969 e 1971). Talvez nesse núcleo estivesse se processando alguma transformação

nesse sentido.

A remoção de RNA, mesmo das eucromatinas, não modifica, por outro lado, suas características de anisotropia, indicando que o padrão orientado das moléculas de azul de toluidina se deve à ligação destas aos grupos fosfatos livres do DNA. Tanto as heterocromatinas como as eucromatinas coradas com as soluções de azul de toluidina a pH 4,0 e 3,4, apresentam curvas de dispersão anômala da birrefringência com valores de retardos ópticos positivos para comprimentos de onda mais longos e negativos para comprimentos de onda mais curtos, à semelhança do que se observa em algumas outras cromatinas e em cromossomos mitóticos (Mello e Vidal, 1974).

A responsabilidade dos grupos PO_3^- do DNA nos padrões de basofilia nuclear do Triatoma infestans pode ser evidenciada nos experimentos em que se trataram os núcleos com solução do corante a pH 3,4 adicionada de cátions Ba^{++} ou UO_2^{++} em mesma miliequivalência. A basofilia metacromática do material (após tratamento por RNase) sofreu alguma modificação com a simples adição de Ba^{++} à solução corante, ou seja, o pico principal da curva espectral se deslocou para comprimentos de onda mais longos, houve diminuição nos valores de extinção correspondentes ao pico principal primitivo (mais evidenciado nas heterocromatinas H_1) e conseqüentemente o valor do índice metacromático passou a ser menor do que 1. Porém, após o tratamento pela solução adicionada de íons UO_2^{++} as alterações na basofilia foram muito mais drásticas, ou seja, houve total abolição da metacromasia e os picos de absorção passaram a se localizar ao re

dor de 620-640nm. Os índices metacromáticos decresceram significativamente, indicando que os padrões de basofilia nuclear metacromática se devem aos grupos PO_3^- do DNA. As alterações seguidas à adição de bário, no presente trabalho, se devem a alguma reação eletrostática entre parte dos cátions Ba^{++} e grupos fosfatos do DNA, diminuindo assim os sítios de ligação no DNA para as moléculas do azul de toluidina.

Pequenas diferenças entre as curvas de E_1 e E_s foram também detectadas após a reação com bário, ou seja, o pico principal de E_s é mais pronunciado e localizado numa região do espectro mais próxima do azul do que E_1 (E_s , 590nm; E_1 , 600-620nm). Além disso, os valores de extinção são comparativamente maiores, na região de metacromasia (550 a 570nm), em E_s . Consequentemente, os índices metacromáticos para as eucromatinas são significativamente diferentes, indicando que o bloqueio dos fosfatos do DNA por cátions Ba^{++} é maior em E_1 do que em E_s , ou que o número dos grupos fosfatos disponíveis, tanto ao bário como ao azul de toluidina é maior em E_s , talvez devido a diferente tipo de complexo DNA-proteína. Esta última hipótese estaria mais de acordo com os achados de curvas de hidrólise já relatados.

Quanto às propriedades anisotrópicas dessas cromatinas, observa-se que os retardos ópticos correspondentes à birrefringência da zona de transição das curvas de dispersão anômala da birrefringência, após coloração com azul de toluidina a pH 3,4, são mais elevados do que os correspondentes à coloração em pH 4,0. Provavelmente a pH 4,0 tenham se corado também algumas fosfoproteínas presentes, que assim poderiam mascarar

as propriedades anisotrópicas do DNA, as quais seriam mais evidentes a pH 3,4. Ou então as condições mais ideais para se efetuar ligações eletrostáticas, em que os grupos respectivos se tornariam melhor ionizáveis, se verificuem a pH 3,4. Neste pH, a análise das curvas de dispersão anômala da birrefringência salienta valores de retardo óptico para a zona de transição mais elevados em H_1 do que em E_1 e maiores em E_s do que em H_s . E_s , por sua vez, apresenta valores maiores do que os de E_1 e H_s menores do que os de H_1 . O fato de H_1 apresentar maiores retardos ópticos do que E_1 indica maior quantidade e proximidade das moléculas orientadas de corante em H_1 . Poder-se-ia supor que maiores R.O. estivessem relacionados, no presente caso, à maior espessura de cromatina corada em H_1 do que em E_1 , além do fato da primeira ser mais compacta do que a segunda. O fator espessura parece, contudo, não ter exercido influência preponderante na produção desses resultados diferentes, uma vez que os achados de basofilia indicam para H_1 um pico de absorção localizado num comprimento de onda mais curto do que para E_1 . Isto salienta a maior compactação de H_1 , com super-enrolamentos tais que poderiam promover a proximidade dos filamentos cromatínicos e consequentemente de conjuntos de grupos PO_3^- do DNA não ligados a proteína. Também as próprias proteínas das cromatinas ou sua ligação com o DNA, sendo diferentes, estariam desempenhando papel na produção de tais fenômenos. De fato, há sugestão de diferenças quanto às proteínas de E_1 e H_1 , permitindo a esta última maior resistência à hidrólise ácida do que à primeira, conforme ficou demonstrado no presente trabalho. Assim, os retardos

ópticos menores de E_1 seriam promovidos não só pelo seu menor grau de compactação em relação à H_1 , mas pelo tipo de complexos DNA-proteína envolvidos.

Quanto ao fato dos retardos ópticos de H_s serem menores do que os de E_s , deve-se em primeiro lugar considerar que H_s se origina a partir de H_1 , por fragmentação ou desagregação da massa cromatínica única, fenômeno esse que talvez pudesse igualar a propriedade anisotrópica de H_s a E_s (o que de fato acontece quando o material é corado com azul de toluidina a pH 4). H_s poderia ter mesmo regiões com alguma atividade gênica, as quais se complexadas a tipos de proteínas diferentes, poderiam ter o padrão anisotrópico primitivo de H_1 alterado. (Embora não tenha sido encontrada incorporação de uridina tritiada em H_1 , não foram ainda realizadas observações em H_s (Mello, 1969, 1971). Por outro lado, observações de Lakhotia e Jacob (1974), ao nível da microscopia eletrônica, esclarecem que, em porções periféricas de alguns cromocentros de insetos, como os de Drosophila melanogaster, pode-se detectar alguma atividade na heterocromatina, medida pela incorporação de uridina tritiada). Ao mesmo tempo, o DNA de E_s , sendo menos "protegido" por proteínas do que E_1 , H_1 e H_s , ou apresentando menor número de ligações ou ligações mais frouxas com as proteínas (é a fração cromatínica com menor resistência à hidrólise ácida nas condições experimentais relatadas no presente trabalho), deixaria muitos grupos fosfatos livres e em sequência, disponíveis para o corante se fixar ordenadamente. Essa situação de E_s em termos de complexos DNA-proteína poderia ser promovida por uma maior

atividade de transcrição nessa cromatina, havendo nela, por con seguinte, maior número de ligações DNA-RNA. Assim, os valores dos R.O. de E_s apresentar-se-iam maiores do que os de H_s e os de E_1 . O mesmo tipo de raciocínio pode ser válido para compara ções de anisotropia de $H_1 \times H_s$ e encontra base nos achados de basofilia (λ do pico das curvas de absorção de $H_s = 590\text{nm}$; λ para $H_1 = 570\text{nm}$).

A localização variada do ponto de inflexão das curvas de dispersão anômala da birrefringência conforme a croma tina considerada, após coloração com azul de toluidina a pH 3,4, não pôde ser correlacionada a nenhum fator em especial. Fios de DNA puro, cristalizados em lâmina e corados a pH 4,0 apresentam ponto de inflexão localizado entre $\lambda = 510$ a 530nm (Vidal, 1972d; Mello e Vidal, 1976). Em complexos DNP de materiais variados, a localização dos pontos de inflexão também não é a mesma. Esses tipos de variações são em geral considerados conjuntamente a pa drões de dicroísmo, podendo-se assim aventar hipóteses sobre espécies de orientação conformacional do substrato (Vidal, 1972a). No presente trabalho, porém, dadas as dificuldades técnicas devidas ao tamanho das regiões cromatínicas disponíveis para medi da, não se pôde estudar o fenômeno de dicroísmo.

Na consideração dos resultados referentes à baso filia e anisotropia, não se deve deixar de mencionar o papel da fixação e esmagamento na obtenção dos dados. Sendo utilizada em todos os casos fixação pelo etanol acético, é de se prever tam bém aqui, a remoção de parte das proteínas presentes nas croma tinas, pela ação do fixador. Partindo-se do relato de Dick e

Johns (1967 e 1968) é de se esperar que 7 a 8% das histonas sejam removidas, principalmente H4, H2A e H3 (denominação atual das histonas f2a1, f2a2 e f3, respectivamente). Também algumas proteínas não histônicas poderiam ser removidas com essa fixação (Comings e Avelino, 1974; Sivak e Wolman, 1974). A isso se soma, por outro lado, a ação do ácido acético a 45%, o qual, em bora usado muito rapidamente, durante o leve esmagamento efetuado, teria também a propriedade de remover algumas proteínas do núcleo, predominantemente as histonas H1 e H2A (denominação atual das histonas f1 e f2a2, respectivamente) (Dick e Johns, 1967 e 1968). Tem sido relatado que o ácido acético nessa porcentagem poderia remover até 55% das histonas totais. Isto, porém, foi estabelecido para desoxirribonucleoproteínas isoladas; menos proteína é provavelmente extraída de núcleos totais (Dick e Johns, 1968). Swift (1964), por exemplo, não encontrou efeito do ácido acético a 45% sobre a coloração pelo fast green alcali no em cromossomos politênicos de Drosophila. Mesmo Dick (1966-
apud Gorovsky e Woodard, 1967) observou que proteínas com carga positiva líquida ("net") (e determinadas por eletroforese em gel de acrilamida) não são extraídas com ácido acético a 45% de núcleos de Vicia, em condições para as quais ácidos inorgânicos diluídos extrairiam grandes quantidades de proteínas básicas.

No presente trabalho admite-se que algumas proteínas tenham sido removidas pela fixação e esmagamento. Se, ao invés de se utilizar etanol acético como fixador, for empregado formol a 10%, mesmo seguido por um esmagamento com ácido acético a 45%, não mais se constata anisotropia nas cromatinas, con-

forme se verificou num teste preliminar. (Isto seria uma função de uma preservação de proteínas e introdução de torções moleculares adicionais, dificultando o acesso dos grupos fosfatos do DNA às moléculas do corante(Mello,1973).) No entanto, mesmo após fixação em etanol acético, muitas proteínas permanecem não removidas dos núcleos.Pode-se evidenciar essa afirmação considerando-se os valores elevados de extinção, quando as cromatinas são coradas com soluções de azul de toluidina a pH 5,0. Variações em conteúdo, tipo, conformação e/ou complexação dessas proteínas não removidas, com o DNA, desempenhariam papel preponderante nos achados de basofilia e anisotropia.

Se as cromatinas fixadas em etanol acético forem metiladas antes da coloração com azul de toluidina a pH 4,0, as heterocromatinas se corarão intensamente, ao contrário das eucromatinas, porém o pico de absorção de suas curvas espectrais será localizado em mesmo comprimento de onda (570nm) e os respectivos índices metacromáticos serão encontrados dentro do mesmo intervalo de valores (1,19 a 1,26).

Sabe-se que a metilação elimina a basofilia devida às glicosaminoglicanas ácidas (AGAG) através de uma esterificação dos grupos carboxílicos das AGAG carboxiladas e de uma dessulfatação do radical sulfúrico das AGAG sulfatadas(Fischer e Lillie, 1954). Por conseguinte, a metilação atuaria sobre os grupos $-O-PO_3^-$ possivelmente da mesma forma que sobre os $-O-SO_3^-H^+$, ou seja, destruindo-os. No caso de ácidos nucleicos serem submetidos a uma metilação e a seguir tratados por uma solução de azul de toluidina a pH 4,0, apenas o que restasse de grupamentos

fosfatos hábeis, não destruídos, do DNA, reagiriam com o corante. Exclui-se essa resposta ao RNA, uma vez que a metilação, à seme_lhança de uma hidrólise simples com HCl a 1% em 60°C, remove tal componente (Lehy e Zeitoun, 1970).

Os resultados obtidos no presente trabalho, indi_cam, portanto, que a metilação efetuada no material fixado em e_tanol acético não foi drástica a ponto de destruir todos os gru_pos fosfatos do DNA (e talvez de fosfoproteínas). A metilação foi suficiente para promover depurinação do DNA, uma vez que o tratamento pelo reativo de Schiff, após esse procedimento, fornece uma resposta positiva. Os grupos PO_3^- , remanescentes do ácido apurínico, embora em sequência e proximidade (pico das cur_vas de absorção em $\lambda = 570\text{nm}$), não apresentam uma ordem tal que possibilite exibição de fenômenos anisotrópicos. Isto se deve à separação dos fios de DNA e perda de sua conformação helicoidal, promovidas pela ação hidrolítica da metilação.

Se os núcleos forem fixados em formol e for utilizado o mesmo tempo de metilação usado em material fixado em e_tanol acético, não chega a haver depurinação do DNA. Não ocorre mesmo desfosfatação evidente, uma vez que não há nem sequer remoção de proteínas complexadas ao DNA pela atuação do fixador, tanto nas heterocromatinas como nas eucromatinas. Por outro lado, também aqui não se detecta birrefringência, o que provavelmente se deva a escassez em grupos PO_3^- disponíveis ao corante, ordenadamente, seja em pequenas frações da molécula de DNA, seja em conjunto (basofilia não metacromática, pico em $\lambda = 610\text{nm}$;

índice metacromático: 0,50 a 0,55 para heterocromatina; eucromatina não chega a se corar).

Se as cromatinas do Triatoma infestans forem submetidas ao processo de denaturação-renaturação de Arrighi e Hsu (1971), observam-se, nas heterocromatinas, a resposta admitida por esses autores como sendo devida a DNA repetitivo. Tal evento fala muito em favor de que nesses cromocentros seja encontrada heterocromatina constitutiva. Também nessas mesmas heterocromatinas foi observada intensa fluorescência após tratamento por solução de quinacrina (Mello e Vidal, 1976- trabalho em andamento), o que é sugestivo de riqueza em bases AT no DNA das heterocromatinas (Weisblum e deHaseth, 1972,1973; Pachmann e Rigler, 1972; Michelson et al., 1972; Ellison e Barr, 1972; Selander e de la Chapelle, 1973; Comings et al., 1975) e que possivelmente corresponda ao DNA repetitivo identificado pelo método de Arrighi e Hsu (1971). Após esta última reação verificam-se alterações morfológicas, entumescimentos, principalmente nas eucromatinas, o que se deve à dissociação e remoção de material pela soda e pela solução 2SSC (Vidal, 1972; Comings et al., 1973). Não só remoção de proteína é detectada após esses tratamentos, mas também já foram demonstradas perdas parciais do próprio DNA, principalmente após fixação em ácido acético a 45% (Rasch e Rasch, 1972; Vidal, 1972 - informação pessoal; Comings et al., 1973).

A solução de Giemsa utilizada na etapa de coloração no método de Arrighi e Hsu (1971), é uma mistura de corantes, entre os quais se encontra um corante tiazínico semelhante ao

azul de toluidina. Após o método de denaturação-renaturação investigou-se, pois, a possível existência de anisotropia nas cromatinas. E, de fato, esta foi observada, embora seja muito fraca, o que provavelmente se deva à drasticidade do método, promovendo alterações estruturais nas cromatinas.

Utilizou-se também um método de denaturação-reassociação mais suave, segundo Vidal (1972b; Mello, 1973) e que é seguido de coloração por azul de toluidina. Pôde-se, desse modo, estudar as alterações nos padrões de basofilia e anisotropia de correntes dos processos de denaturação e reassociação. Observou-se que estes induziam deslocamento dos picos das curvas de absorção espectral para comprimentos de onda mais curtos, ou seja, correspondentes à metacromasia gama. Consequentemente, os índices metacromáticos se elevaram ligeiramente. Este fenômeno se deve à remoção de proteína, a qual se verifica mesmo nas condições experimentais menos drásticas do que as de Arrighi e Hsu (Vidal, 1972b). Observações semelhantes têm sido relatadas após denaturação-renaturação de ácidos nucleicos em solução (Bradley e Felsenfeld, 1959; Semmel e Hubbert, 1964- ambas citações apud Himes, 1967).

Um simples tratamento das cromatinas com solução 2SSC promove padrões de basofilia semelhantes aos dos núcleos denaturados-renaturados. Também o tratamento apenas com soda a 0,014M induz alterações nos padrões de basofilia, porém os índices metacromáticos detectados são menores do que os de material denaturado-reassociado, que por sua vez são menores do que os das cromatinas tratadas por soluções 2SSC.

Após o método de denaturação-reassociação de Vidal observa-se dispersão anômala da birrefringência com perfil não alterado com relação ao do controle não tratado. O sinal dos R.O. não muda e o ponto de inflexão da curva continua a ser verificado em $\lambda = 525\text{nm}$. Os R.O. são, contudo, iguais ou menores, em valor, do que os do controle. Em condições de perfeita orientação do DNA e disposição de seus grupos fosfatos, dever-se-ia esperar aumento dos valores dos R.O., uma vez que as proteínas fossem dissociadas de tais grupamentos. Contudo, além da remoção de proteínas, há denaturação do DNA, o que significa perda de sua estrutura em dupla hélice, e a seguir reassociação apenas parcial da dupla hélice, o que restaura um percentual de birrefringência teoricamente esperada. Podem ocorrer também perdas parciais de DNA (Vidal, 1972- comunicação pessoal). O tratamento apenas por NaOH não promoveu total denaturação do DNA, pois se o fizesse, não se detectaria mais birrefringência, o que não aconteceu. E também não foi drástico o suficiente para induzir remoção total de proteínas, pois a basofilia após esse tratamento continua salientando picos de absorção em comprimentos de onda longos. O achado de figuras birrefringentes em forma de cruz, algumas vezes, nas heterocromatinas, após esse tratamento ou após se submeter o material à ação da solução 2SSC parece indicar uma alteração na organização e orientação dos filamentos cromatínicos, com re-estruturação dos mesmos, o que encontra apoio também na observação de que o sinal dos R.O. das curvas de ADB se inverte nesses casos.

Do que foi explanado e discutido no presente trabalho, pode-se admitir que as heterocromatinas de células somá-

tivas do Triatoma infestans apresentem propriedades citoquímicas e anisotrópicas diferentes das exibidas pelas respectivas eucromatinas. O conjunto das diferentes respostas à reação de Feulgen, em termos de cinética de hidrólise, das reatividades ao fast green a pH 2,7 após hidrólise ácida pelo HCl, bem como os padrões de basofilia e anisotropia são altamente sugestivos de diferenças ao nível de proteínas, provavelmente não histônicas, entre $H_1 \times E_1$, $H_S \times E_S$ e também entre $E_1 \times E_S$ (não se excluindo também uma possível participação do RNA no processo).

Muito embora não tenham sido detectadas diferenças marcantes entre H_1 e H_S , através do estudo das curvas de hidrólise, via índices $H_1 / (H_S + H_1) \times 100$, os outros resultados, contudo, parecem sugerir que também ao nível proteico os dois tipos heterocromáticos possam diferir em alguma extensão.

Além disso, parte dos resultados levantados vieram contribuir para que se consolidasse o conceito de que nos cromocentros dos tubos de Malpighi do Triatoma infestans são encontradas heterocromatinas constitutivas.

O fato de existirem diferentes proteínas (não histônicas) nas hetero- e eucromatinas do Triatoma infestans en contraria também um apoio nas recentes suposições de que estes componentes possam capacitar os diversos tipos cromatínicos a adquirir diversos graus de condensação e a expressar diferentes atividades gênicas (Comings e Riggs, 1971; Zuckerkandl, 1974). Pouco se sabe ainda sobre as proteínas não histônicas, porém é cada vez maior a evidência de que estejam envolvidas na regulação da expressão gênica (Kruh et al., 1974; Stein et al., 1974).

As histonas realmente são os agentes inibidores da função do DNA (Huang e Bonner, 1962; Allfrey et al., 1963), porém, por exibirem uniformidade e falta de especificidade não são consideradas as responsáveis primárias pela regulação de transcrição gênica específica (Stein et al., 1974). Embora haja alguns raros relatos de que as proteínas não histônicas (acídicas) possam promover a inibição da síntese de determinadas proteínas, como por exemplo, da hemoglobina, ligando-se ao RNAm específico dessa proteína, de modo a inibir sua expressão (Kruh et al., 1969), no geral as proteínas não histônicas reduzem a inibição de transcrição, promovida pelas histonas, ligando-se a estas e descomplexando-as do DNA (Busch, 1965; Frenster, 1965; Wang, 1966; Kruh et al., 1974; Stein et al., 1974) ou modificando a configuração "supercoil" do complexo DNA-histonas, através de alteração em regiões α -hélice das histonas (Richards e Pardon, 1970). Parece que a fosforilação das proteínas cromossômicas não histônicas estaria envolvida na ativação gênica da cromatina para síntese de RNA (Stein et al., 1974).

Algumas proteínas cromossômicas não histônicas têm sido também demonstradas como sítios de reconhecimento de ligação para macromoléculas regulatórias (hormônios) (Noteboom e Gorski, 1965; Loeb e Wilson, 1965; Fanestil e Edelman, 1966; revisão em Stein et al., 1974) ou como enzimas de função geral (Stein et al., 1974). Outras têm sido sugeridas como estando implicadas na formação de géis nucleares e na própria estrutura cromossômica (Dounce e Hilgartner, 1964; Hilgartner, 1968; Mackay et al., 1968; Stellwagen e Cole, 1969), à semelhança do que

se tem também imputado a histonas (Wilkins et al., 1959; Cole, 1962; MacGillivray et al., 1962; Berlowitz, 1974).

Embora, por um lado, existam evidências de que as proteínas não histônicas não se liguem diretamente ao DNA, mas a histonas (Itzhaki, 1971), há, por outro lado, também evidências de que possam se ligar diretamente a ele, estabelecendo inclusive elos entre as moléculas deste componente (revisão em Frenster, 1969; Stein et al., 1974). Porém, devido à grande heterogeneidade das proteínas cromossômicas não histônicas, é bem provável que nenhum modelo único explique todos os dados experimentais de modo satisfatório e que estas proteínas formem diferentes complexos seja com o DNA ou com DNP e exerçam efeitos regulatórios em diferentes níveis e de diversas maneiras (Stein et al., 1974).

Segundo Comings e Riggs (1971) existiriam proteínas alostéricas ou "nucleostéricas", específicas à heterocromatina e à eucromatina, e que após ligação com o DNA sofreriam mudanças conformacionais possibilitando a complexação com outras moléculas proteicas, controlando assim a condensação cromatínica e função genética dos cromossomos. Estes autores propõem que essas proteínas específicas reconheceriam as áreas de DNA com sequência de bases repetitivas aí se ligando e seriam responsáveis por manter a heterocromatina em estado condensado. Zuckerkandl (1974), por outro lado, considera a heterocromatina constitutiva como uma entidade ativa, instrumental, em definir estados de diferenciação celular, graças a uma ligação mais intensa com moléculas "travadoras", 1, do que a eucromatina. Essas molé-

culas 1 tornariam os genes inacessíveis às moléculas regulado - ras, alterando a estrutura 4ária. do complexo DNP (dobramento da "supercoil"). Zuckerkandl (1974) supõe que essas moléculas 1, provavelmente proteínas não histônicas, se prenderiam nas se - quências de DNA satélite repetitivo.

As constatações do presente trabalho, sugestivas de diferenças em proteínas não histônicas nas hetero- e eu-cromatinas do Triatoma infestans, e determinadas ao nível cito-químico e citofísico, devem ser consideradas como um dos primei - ros passos no sentido de se esclarecer a natureza dos componen - tes dessas cromatinas, estabelecendo-se relações com detalhes estruturais do material e acompanhando-se as alterações nesses parâmetros aliadas às variações em fisiologia celular. Atualmen - te, ao mesmo tempo em que as células dos tubos de Malpighi e suas cromatinas em particular, estão sendo estudadas com mi - croscopia eletrônica de alta resolução (Mello e Dolder, 1976 - trabalho em andamento), busca-se estender as investigações cito - químicas desse material para o nível microquímico e bioquímico.

Embora se saiba que o padrão heterocromático H_s provém de um H_1 (Mello, 1969 e 1971), nada se conhece quanto à causa motivadora da divisão de um único cromocentro em vários outros e sua migração para porções mais afastadas do centro da imagem nuclear (Mello, 1976). Talvez haja alguma relação com o destino do nucléolo (s) e/ou ativação de alguns genes presentes na heterocromatina. Futuras pesquisas bioquímicas, ultra-estru - turais, rádio-autográficas e fisiológicas poderão trazer possi - velmente alguma luz nesse sentido.

C O N C L U S Õ E S

1. Algumas das propriedades citoquímicas e citofísicas quantitativas das heterocromatinas presentes nas células epiteliais dos tubos de Malpighi de ninfas do 5º instar do Triatoma infestans (Hemiptera, Reduviidae) diferem daquelas verificadas nas eucromatinas respectivas. Estas propriedades dizem respeito: 1. à cinética de hidrólise avaliada no material submetido à reação de Feulgen (quando as células são fixadas em etanol acético); 2. às curvas de absorção espectral de Feulgen; 3. às reações de basofilia; 4. à resposta ao método de denaturação-renaturação de Arrighi e Hsu(1971); 5. à resposta à reação para proteínas totais após tratamento hidrolítico idêntico ao pertinente à reação de Feulgen (células fixadas em etanol acético); 6. e às características de anisotropia em material corado com soluções de azul de toluidina. Frente a alguns dos testes utilizados puderam ser constatadas diferenças também entre eucromatinas das células distais do órgão, comparadas às das células proximais, o mesmo sendo válido para as respectivas heterocromatinas. (A partir do 4º instar ninfal instalam-se nos tubos de Malpighi diferentes padrões de heterocromatização, conforme se trate de células epiteliais proximais e distais. Nas proximais os núcleos apresentam um único cromocentro; nas distais, os núcleos mostram diversos cromocentros, originados a partir de um padrão idêntico ao dos núcleos de células proximais).

2. Em termos de cinética de hidrólise, as diferentes respostas à reação de Feulgen são exibidas principalmente na porção descendente das curvas de hidrólise ajustadas à função de Bateman, após cálculo de valores Feulgen-DNA percentuais ou de índices = $(\text{heterocromatina}/(\text{eucromatina} + \text{heterocromatina})) \times 100$, calculados com esses mesmos valores. Tais mencionadas respostas correspondem a diferentes velocidades de despolimerização e solubilização do ácido apurínico de cada tipo cromatínico. As eucromatinas se comportam como as menos resistentes à hidrólise ácida e dentre estas, E_s é menos resistente do que E_1 . Também o tempo de hidrólise para o qual os valores Feulgen-DNA são máximos varia para as diferentes heterocromatinas e eucromatinas.
3. A fixação a que se submete o material, preservando diferentemente as proteínas complexadas com o DNA, nessas cromatinas, influencia: 1. o tempo de hidrólise a partir do qual se verifica depuração; 2. o tempo para o qual se obtêm valores Feulgen-DNA máximos; 3. a velocidade de solubilização do ácido apurínico.
4. Em H_1 , E_1 , H_s e E_s há presença de histonas reativas ao fast green alcalino, as quais são totalmente removidas após curtos tempos de hidrólise ácida pelo HCl 0,1N a 37°C. Nas cromatinas fixadas em etanol acético encontram-se proteínas não histônicas resistentes a 31h de hidrólise ácida, havendo sugestão de que ocorram em maior porcentagem em E_1 do que em H_1 . Também os padrões de diminuição dos valores fast green - proteínas totais, em função do processo hidrolítico pelo HCl,

mostram variações conforme se trate de hetero- ou eucromatinas.

5. As respostas à reação de Feulgen e às reações para proteínas nucleares reativas ao fast green a pH 8,1 e 2,7 sugerem que proteínas não histônicas, removidas com diferentes velocidades e intensidades promovem diferente exposição do DNA à ação despolimerizante e solubilizante do HCl. Essas proteínas, portanto, diferem provavelmente em tipo, conformação, quantidades e/ou graus de complexação com o DNA, conforme a cromatina considerada. Também o fato de porções do DNA estarem sendo transcritas nas eucromatinas principalmente, torna-o mais suscetível à ação hidrolítica. As diferenças entre E_1 e E_s quanto à porção descendente das curvas de hidrólise parecem ser devidas mais a variações em tipos ou conformação das proteínas não histônicas (o que as tornaria diferentemente removíveis pelo HCl) e/ou presença de RNA, do que a diferenças em porcentagem de proteínas removidas ou remanescentes após fixação e hidrólise.
6. A basofilia das cromatinas consideradas, fixadas em etanol a cético e coradas com soluções de azul de toluidina apresenta dissemelhanças, principalmente devido à diferente disponibilidade de grupos fosfatos livres, do DNA, hábeis em se ligarem às moléculas de corante, e a diversos graus de proximidade dos mesmos. Embora os perfis das curvas de absorção de basofilia de H_1 e H_s difiram, houve caso de um dos perfis de H_1 ser semelhante aos de H_s , o que poderia estar relacionado à transição do tipo heterocromático H_1 para H_s . As diferenças

entre E_1 e E_s são melhor evidenciadas quando estas são coradas com solução de azul de toluidina a pH 3,4 adicionada de íons Ba^{++} . Conclui-se que o bloqueio dos grupos fosfatos do DNA por Ba^{++} (ou o número de fosfatos disponíveis a se ligar tanto ao bário como ao azul de toluidina) é maior em E_1 do que em E_s ; ambos poderiam ser explicados em termos de diferentes tipos de complexos DNA-proteína.

7. O perfil das curvas de dispersão anômala da birrefringência das hetero- e eucromatinas fixadas em etanol acético e coradas com azul de toluidina lembra o de outras cromatinas já estudadas e não se altera mesmo após o tratamento de denaturação-renaturação de Vidal. (Neste último caso, devido à reassociação parcial da dupla hélice do DNA denaturado e consequente diminuição de ordem molecular do mesmo, bem como à perda de porções das moléculas de DNA, os valores dos retardos ópticos podem ser menores do que os de controles não tratados. Isto apesar do tratamento promover também a dissociação de proteínas do DNA e teoricamente aumentar o número de grupos fosfatos livres hábeis em se ligarem às moléculas de azul de toluidina.). A presença de RNA nas eucromatinas (eventualmente nas heterocromatinas?) não influencia os achados de anisotropia.

8. Com base nos valores dos retardos ópticos da zona de transição das curvas de dispersão anômala da birrefringência das cromatinas coradas com azul de toluidina a pH 3,4, conclui-se que estes são maiores em H_1 do que em E_1 devido à maior compactação dos filamentos cromatínicos em H_1 , bem como aos

diferentes tipos de complexos DNA-proteína remanescentes após fixação e esmagamento. Os valores de E_s são maiores do que os de H_s possivelmente também pelo último motivo e porque em E_s pode haver maior porcentagem de DNA "desprotegido", não coberto por proteína, por estar sendo transcrito; o mesmo poderia ser válido para explicar porque os valores de E_s são maiores do que os de E_l . Também pelo motivo pelo qual os valores de H_l são maiores do que os de E_l , os de H_s são menores do que os de H_l .

9. Nos achados de basofilia e anisotropia, portanto, também variações em conteúdo, tipo e conformação de proteínas complexadas ao DNA (diferentemente removidas e preservadas pela fixação), desempenhariam papel preponderante no fornecimento de diferenças detectáveis entre hetero- e eucromatinas e também entre $H_l \times H_s$ e $E_l \times E_s$.
10. A análise de curvas de absorção espectral de Feulgen salientou a ocorrência de um ombro na região de $\lambda=520-530\text{nm}$, mais pronunciado nas heterocromatinas do que nas eucromatinas, após tempos longos de hidrólise. Este achado possivelmente se relaciona a um maior número de moléculas do reativo de Schiff di-substituídas com grupos aldeído nas heterocromatinas, por causa da presença nestas de maior número de purinas adjacentes. Isto estaria de acordo com outras evidências (resposta ao método de denaturação-renaturação de Arrighi e Hsu e intensa fluorescência com quinacrina), falando em favor da presença de heterocromatina constitutiva, com alta porcentagem de DNA repetitivo, nos cromocentros estudados. Não foram de-

tectadas nesse nível diferenças entre $H_1 \times H_S$ e $E_1 \times E_S$.

11. As prováveis diferenças em proteínas não histônicas verificadas nas heterocromatinas do Triatoma infestans em comparação às eucromatinas, deduzidas através dos presentes achados citoquímicos e citofísicos, estariam de acordo com o que se pode esperar e se conhece da função desses diferentes tipos cromatínicos em outras células estudadas. Nas eucromatinas é de se esperar que as proteínas não histônicas estejam mais ligadas à de-repressão e regulação gênica, embora possam talvez também fazer parte da estrutura cromatínica. Já nas heterocromatinas é de se esperar mais uma função estrutural para essas proteínas, tornando os filamentos cromatínicos mais compactados e regulando alguma eventual expressão gênica de possíveis regiões codificadoras que possam estar presentes ao lado de regiões de DNA satélite repetitivo.
12. Quanto a diferenças, também em proteínas, de E_1 em relação a E_S e possivelmente de H_S em relação a H_1 , pouco se pode concluir. Os tipos cromatínicos H_1 e E_1 se verificam em células da região proximal dos tubos de Malpighi, enquanto H_S e E_S se encontram nas células da região distal. O tipo heterocromático H_S se origina de um padrão H_1 , durante o 4º instar ninfal. Pode-se apenas especular que os níveis de transcrição nos dois tipos de eucromatina sejam diferentes e ligado a isso, variações em proteína poderiam ocorrer. Quanto às heterocromatinas, pode ser que em H_S algumas porções cromatínicas sejam codificadoras, por serem porções de DNA não satélite repetitivo, e se tornem ativas, quando da fragmentação do cro-

nocentro único em vários, alterando-se o estado estrutural de H_1 e possibilitando talvez a expressão de algum gene. Sabe-se que na região distal dos tubos de Malpighi há eliminação de K, enquanto na proximal há reabsorção de água e potássio, e apenas no citoplasma das células distais são encontradas concreções calcárias (originadas principalmente de mitocôndrias em degeneração) observadas ao microscópio e letrônico. Não há relato, porém, de diferenças de função nas células da região distal, em dependência do avanço no desenvolvimento ninfal. Dados adicionais fisiológicos se fazem necessários nesse sentido.

13. Os presentes achados, principalmente relacionados à diferente cinética de hidrólise, se mostraram promissores no sentido de que uma investigação semelhante futura, em células cujos núcleos apresentem alterações em heterocromatização, possa fornecer dados importantes, talvez mesmo em nível de citodiagnóstico.

*

*

*

S U M Á R I O

Com o objetivo de se efetuar um estudo comparativo entre as heterocromatinas (cromocentros) e eucromatinas de células epiteliais dos tubos de Malpighi do hemíptero Triatoma infestans Klug, estas foram investigadas ao nível citoquímico e citofísico quantitativo.

Foram verificadas diferenças entre tais cromatinas, explicadas com base na variação em proteínas, principalmente não histônicas (tipos, conformação molecular e/ou grau de complexação com o DNA) e algumas vezes relacionadas com a presença de RNA (transcrição). Essas diferenças foram deduzidas em função:

1. das respostas à reação de Feulgen, em termos de curvas de hidrólise (principalmente as diferentes velocidades de solubilização do ácido apurínico em condições especiais de fixação). As eucromatinas nesse caso são menos resistentes à hidrólise ácida do que as heterocromatinas;
2. da variação em velocidade de remoção (e em resistência) à hidrólise ácida, pertinente à reação de Feulgen, das proteínas reativas ao fast green a pH 2,7 (proteínas não histônicas removidas com diferentes velocidades e intensidades exporiam o DNA diferentemente à ação solubilizadora do HCl);
3. dos padrões de basofilia, que são um reflexo da disponibilidade e sequência de grupos fosfatos livres do DNA;
4. das propriedades anisotrópicas das cromatinas coradas com soluções de azul de toluidina.

Supõe-se que essas proteínas não histônicas es-

tejam envolvidas, nas eucromatinas, com os processos de de-re -
pressão e regulação gênica, enquanto nas heterocromatinas, rela-
cionadas com um papel estrutural e talvez mesmo com algum efei-
to em regulação gênica.

Foram também detectadas diferenças relativas ao
DNA nessas cromatinas, quando se analisam resultados obtidos a-
pós o procedimento de denaturação-renaturação de Arrighi e Hsu
e os perfis dos espectros de absorção de Feulgen no visível. A-
liadas a dados anteriores de fluorescência com quinacrina, es -
tas diferenças indicam a presença de DNA repetitivo,
rico em AT, nas heterocromatinas dos tubos de Malpighi do Tria-
toma infestans. Conclui-se, portanto, que nos cromocentros das
células epiteliais estudadas há heterocromatina constitutiva.

Diferenças também relacionadas a proteínas nu-
cleares foram encontradas quando se comparam eucromatinas pro-
venientes de células de diferentes regiões dos tubos de Malpi-
ghi; algumas vezes foi isso também comprovado nas heterocromati-
nas respectivas. Tal achado provavelmente se deva, nas eucroma-
tinas, a diversos graus de transcrição e, nas heterocromatinas,
à possibilidade de alguma atividade de transcrição nas células
distais dos tubos de Malpighi, por conter possivelmente regiões
codificadoras em meio às de DNA repetitivo, tornadas
ativas pelas modificações estruturais ocorridas nas heterocroma-
tinas dessas células a partir do 4º instar ninfal.

*

*

*

S U M M A R Y

With the object of finding differences between heterochromatins (chromocenters) and euchromatins in the Malpighian tubes of the blood-sucking bug Triatoma infestans , these chromatins were investigated with cytochemical and cytophysical procedures at a quantitative level.

The differences found are explained in terms of variations mainly involving non-histone proteins. Sometimes they are probably related to establishment of DNA-RNA complexes. These suppositions were based on:

1. responses to Feulgen's reaction (different rates of a-purinic acid breakdown and solubilization under special conditions of fixation). Euchromatins are less stable to acid hydrolysis than heterochromatins;

2. variation in stability of proteins reactive to fast green staining at pH 2.7 when subjected to the acid hydrolysis pertinent to Feulgen's reaction (non-histone proteins removed with varied rates and intensities would differently expose DNA to the solubilization mechanism promoted by HCl);

3. patterns of basophilia which reflect the availability and sequence of DNA phosphate groups unattached to proteins;

4. and anisotropic properties of the chromatins stained with toluidine blue solutions.

These non-histone proteins are intended to be associated, in euchromatins, with de-repression and genetic regulation processes, whereas, in heterochromatins, they are

probably playing a structural role, which, in addition, would affect genetic regulation.

Differences for these chromatins, involving DNA, were also found when results of Arrighi and Hsu's denaturation-renaturation experiments, and profiles of Feulgen's absorption curves in the visible spectrum are investigated. If previous data on quinacrine fluorescence are taken into account, these differences indicate that AT-rich repetitive DNA is present in the heterochromatins. The chromocenters of the epithelial cells of the Malpighian tubes in Triatoma infestans therefore contain constitutive heterochromatin.

Differences also related to nuclear proteins are supposed to occur, when euchromatins from cells of different regions in the Malpighian tubes are analyzed. Sometimes they are also valid for heterochromatins. This could be caused, in euchromatins, by several degrees or steps of transcriptional activities. In heterochromatins, on the other hand, some transcriptional activity may be assumed for the distal cells of the Malpighian tubes, if codifying zones were present among those of the repetitive DNA, and were activated by structural changes from the 4th nymphal stage on.

* *

*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrell, I. and H.A. Bergqvist. 1962. Cytochemical evidence for varied DNA complexes in the nuclei of undifferentiated cells. *J. Cell Biol.*, 15: 604-606.
- Agrell, I.P.S. and H.A. Bergqvist. 1967. Cytochemical studies on DNA complexes during cell multiplication and cell differentiation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 22: 189-198.
- Alfert, M. 1958. Variations in cytochemical properties of cell nuclei. *Exp. Cell Res. Suppl.*, 6: 227.
- Alfert, M. and I.I. Geschwind. 1953. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.*, 39: 991-999.
- Allfrey, V.G., V.C. Littau and A.E. Mirsky. 1963. On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 49: 414-421.
- Alvarez, M.R. and R.R. Cowden. 1966. Cytophotometric study of acid dye binding by proteins of isolated frog liver in relation to nuclear size. *Histochemie*, 7: 22-27.
- Andersson, G.K.A. and P.T.T. Kjellstrand. 1975. A study of DNA depolymerisation during Feulgen acid hydrolysis. *Histochem.*, 43: 123-130.
- Arber, W. and S. Linn. 1969. DNA modification and restriction. *Ann. Rev. Biochem.*, 38: 467-500.
- Armstrong, R.W., T. Kuruscev, and U.P. Strauss. 1970. The interaction between acridine dyes and deoxyribonucleic acid. *J. Amer. chem. Soc.*, 92: 3174-3181.
- Arrighi, F.E. and T.C. Hsu. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10: 81-85.
- Arrighi, F.E., T.C. Hsu, P. Saunders and G.F. Saunders. 1970. Localization of repetitive DNA in the chromosomes of Microtus agrestis by means of in situ hybridization. *Chromosoma*, 32: 224-236.
- Bachmann, K. 1968. A cytochemical kinetic investigation of the Feulgen hydrolysis of fixed chromatin. *Histochemie*, 16: 287-293.
- Baer, D. 1965. Asynchronous replication of DNA in a heterochromatic set of chromosomes in Pseudococcus obscurus. *Genetics*, 52: 275-285.

- Bartels, P.H. 1966. Principles of polarized light. In Introduction to Quantitative Cytochemistry (G.L.Wied, ed.), p. 519-538. Acad.Press Inc., N.Y. & London.
- Bateman, H. 1910. Proc. Cambridge phil. Soc., 15: 423 (apud Böhm, N. 1965. Cytophotometrische Messungen des DNS -Gehaltes feul-
gengefärbter Mäuseascites-Tumorzellen in verschiedenen Sta-
dien des Tumor -
wachstums bei variation der Hydrolysezeit. Tese de doutora-
mento. Justus Liebig Univ., Giessen.)
- Bauer, H. 1932. Die Feulgenische Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. Z.Zellforsch., 15: 225-247.
- Bennett, H.S. 1967. The microscopical investigation of biological materials with polarized light. In McClung's Handbook of Microscopical Technique, p.591-677. Hafner Publ.Co., N.York.
- Berendes, H.D. and H.G.Keyl. 1967. Distribution of DNA in heterochromatin and euchromatin of polytene nuclei of Drosophila hydei. Genetics, 57: 1-13.
- Bergeron, J.A. and M.Singer. 1958. Metachromasy: an experimental and theoretical reevaluation. J.Biophys.Biochem.Cytol., 4(4): 433-457.
- Berlowitz, L. 1974. Chromosomal inactivation and reactivation in mealy bugs. Genetics, 78: 311-322.
- Berlowitz, L., D.Pallotta and C.H.Sibley. 1969. Chromatin and histones: binding of tritiated actinomycin-D to heterochromatin in mealy bugs. Science, 164: 1527-1529.
- Berlowitz, L., D.Pallotta and P.Pawlowski. 1970. Isolated histone fractions and the alkaline fast green reaction. J.Histochem. Cytochem., 18(5): 334-339.
- Bloch, D.P. 1966. Cytochemistry of the histones. Protoplasmatologia, 5(3d): 1.56.
- Bloch, D.P. 1969. A catalog of sperm histones. Genetics(Suppl.), 61: 93-111.
- Bloch, D.P. and S.D.Brack. 1964. Evidence for the cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermiogenesis in the grasshopper Chortophaga viridifasciata (De Geer). J.Cell Biol., 22: 327-340.
- Böhm, N. 1965. Cytophotometrische Messungen des DNS-Gehaltes feul-
gengefärbter Mäuseascites-Tumorzellen in verschiedenen
Stadien des Tumorstwachstums bei Variation der Hydrolysezeit.
Doktorat-Dissertation. Justus Liebig-Universität, Giessen.

- Böhm, N. 1968. Einfluss der Fixierung und der Säurekonzentration auf die Feulgenhydrolyse bei 28°C. *Histochemie*, 14: 201-211.
- Böhm, N., E. Sprenger, G. Schlüter und W. Sandritter. 1968. Proportionalitätsfehler bei der Feulgen-Hydrolyse. *Histochemie*, 15: 194-203.
- Böhm, N. und H.-U. Seibert. 1966. Zur Bestimmung der Parameter der Bateman-Funktion bei der Auswertung von Feulgen-Hydrolysekurven. *Histochemie*, 6: 260-266.
- Böhm, N. and W. Sandritter. 1966. Feulgen hydrolysis of normal cells and mouse ascites tumor cells. *J. Cell Biol.*, 28: 1-7.
- Boyer, H.W. 1974. Restriction and modification of DNA: enzymes and substrates. *Fed. Proc.*, 33: 1125-1127.
- Brachet, J. et A.M. Preumont. 1966. Nouvelles techniques de détection des acides désoxyribonucléiques. Quelques résultats préliminaires. *Ann. Histochim.*, 11: 157-171.
- Brachet, J., N. Hulin and J. Guermant. 1968. Acid lability of deoxyribonucleic acids and cell differentiation. *Exptl. Cell Res.*, 51: 509-518.
- Bradley, D.F. and G. Felsenfeld. 1959. Aggregation of an acridine dye on native and denatured deoxyribonucleates. *Nature*, 184: 1920-1922.
- Breuer, M.E. and C. Pavan. 1955. Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma*, 7: 371-386.
- Bridges, C.B. 1916. Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. *Genetics*, 1: 107-163.
- Brosseau Jr., G.C. 1960. Genetic analysis of the male fertility factors on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 45(3): 257-274.
- Brown, S.W. 1966. Heterochromatin. *Science*, 151: 417-425.
- Brown, S.W. and H.S. Chandra. 1973. Inactivation system of the mammalian X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 70: 195-199.
- Brown, S.W. and V. Nur. 1964. Heterochromatic chromosomes in the coccids. *Science*, 145: 130-136.
- Brown, S.W. and W.A. Nelson-Rees. 1961. Radiation analysis of the lecanoid system. *Genetics*, 46: 983-1007.
- Burdick, C.J. and M. Himes. 1969. Nuclear proteins of hepatocyte and erythrocyte nuclei of frog liver. *Nature*, 221: 1150-1152.

- Burkholder, G.D. and M.G. Weaver. 1974. DNA-protein interactions in condensed and extended chromatin. *J. Cell Biol.*, 63(2):43a.
- Busch, H. 1965. Histones and other nuclear proteins. Acad. Press, N.Y.
- Caspersson, T. 1940a. Die Eiweissverteilung in den Strukturen des Zellkerns. *Chromosoma*, 1: 562-604.
- Caspersson, T. 1940b. Nukleinsäureketten und Genvermehrung. *Chromosoma*, 1: 605-619.
- Chandra, H.S. 1962. Inverse meiosis in triploid females of the mealy bug, *Planococcus citri*. *Genetics*, 47: 1441-1454.
- Chandra, H.S. and S.W. Brown. 1975. Chromosome imprinting and the mammalian X chromosome. *Nature*, 253: 165-168.
- Cole, A. 1962. A molecular model for biological contractility: implications in chromosome structure and function. *Nature*, 196: 211-214.
- Comings, D.E. 1967a. Histones of genetically active and inactive chromatin. *J. Cell Biol.*, 35: 699-706.
- Comings, D.E. 1971. Heterochromatin of the Indian muntjac: replication, condensation, DNA ultracentrifugation, fluorescent and heterochromatin staining. *Exptl. Cell Res.*, 67: 441-460.
- Comings, D.E. 1972a. Heavy shoulder DNA. *Exptl. Cell Res.*, 70: 259-263.
- Comings, D.E. 1972b. The structure and function of chromatin. *Adv. Human Genetics*, 3: 237-431.
- Comings, D.E. and A.D. Riggs. 1971. Molecular mechanisms of chromosome pairing, folding and function. *Nature New Biol.*, 233: 48-50.
- Comings, D.E., B.W. Kovacs, E. Avelino and D.C. Harris. 1975. Mechanisms of chromosome banding. V. Quinacrine banding. *Chromosoma*, 50: 111-145.
- Comings, D.E., E. Avelino, T.A. Okada and H.E. Wyandt. 1973. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Exptl. Cell Res.*, 77: 469-493.
- Comings, D.E. and E. Mattoccia. 1972a. DNA of mammalian and avian heterochromatin. *Exptl. Cell Res.*, 71: 113-131.
- Comings, D.E. and E. Mattoccia. 1972b. Evidence that heavy shoulder DNA may be localized to the microchromosomes of birds. *Exptl. Cell Res.*, 70: 256-259.
- Comings, D.E. and T.A. Okada. 1972. Architecture of meiotic cells

- and mechanisms of chromosome pairing. In Advances in cell and Molecular Biology (E.J. DuPraw, ed.). Acad. Press, N. York. Vol. 2.
- Comings, D.E. and E. Avelino. 1974. Mechanisms of chromosome banding. II. Evidence that histones are not involved. Exptl. Cell Res., 86: 202-206.
- Cooper, K.W. 1949. The cytogenetics of meiosis in Drosophila. Mitotic and meiotic autosomal chiasmata without crossing over in the male. J. Morph., 84: 81-122.
- Cooper, K.W. 1952. Studies on spermatogenesis in Drosophila. Am. Phil. Soc. Ybk., 146-147.
- Cooper, K.W. 1959. Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially Xh and Y) in Drosophila melanogaster, and the theory of "heterochromatin". Chromosoma, 10: 535-588.
- Davies, H.G. 1968. Electron-microscope observations on the organization of heterochromatin in certain cells. J. Cell Sci., 3: 129-150.
- Davison, P.F. and J.A.V. Butler. 1956. The chemical composition of calf thymus nucleoprotein. Biochim. Biophys. Acta, 21: 568 - 573.
- Deitch, A.D. 1966a. Cytophotometry of nucleic acids. In Introduction to Quantitative Cytochemistry (G.L. Wied, ed.). Acad. Press, N. York and London, p. 327-354.
- Deitch, A.D. 1966b. Cytophotometry of proteins. In Introduction to Quantitative Cytochemistry (G.L. Wied, ed.). Acad. Press, N. York and London. p. 451-468.
- Deitch, A.D., D. Wagner and R.M. Richart. 1968. Conditions influencing the intensity of the Feulgen reaction. J. Histochem. Cytochem., 16: 371-379.
- de la Torre, L. and G.W. Salisbury. 1964. Feulgen-DNA cytophotometry of bovine spermatozoa. J. Dairy Sci., 47: 284-292.
- Dick, C. and E.W. Johns. 1967. The removal of histones from calf thymus deoxyribonucleoprotein and calf thymus tissue with acetic acid containing fixatives. Biochem. J., 105: 46P.
- Dick, C. and E.W. Johns. 1968. The effect of two acetic acid containing fixatives on the histone content of calf thymus deoxyribonucleoprotein and calf thymus tissue. Exptl. Cell Res., 51: 626-632.
- DiStephano, H.S. 1948. A cytochemical study of the Feulgen nucleal reaction. Chromosoma, 3: 282-301.
- Dixon, W.J. and F.J. Massey. 1957. Introduction to statistical ana

lysis, 2nd ed. McGraw-Hill, New York.

Dolbeare, F. and H. Koenig. 1968. Isolation and characterization of diffuse chromatin from rat liver nuclei. J.Cell Biol., 39: 35a.

Dost, F.H. 1953. Der Blutspiegel. Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüssigkeit, Leipzig..

Dounce, A.L. and C.A. Hilgartner. 1964. A study of DNA nucleoprotein gels and the residual protein of isolated cell nuclei. Exptl. Cell Res., 36: 228

DuPraw, E.J. 1969. Cell and Molecular Biology. Acad. Press Inc., N.York and London.

Eberhard, A. and D. Mazia. 1966. Biochim.biophys.Res.Comm., 21: 465 (apud Brachet, J., N.Hulin and J.Guermant. 1968. Acid lability of deoxyribonucleic acids and cell differentiation. Exptl.Cell Res., 51: 509-518).

Eckhardt, R.A. and J.G. Gall. 1971. Satellite DNA associated with heterochromatin in Rhynchosciara. Chromosoma, 32: 407-427.

Ellison, J.R. and H.J.Barr. 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions: late replication and high AT content in Samoaia leonensis. Chromosoma, 36: 375-390.

Fanestil, D.D. and I.S. Edelman. 1966. Characteristics of the renal nuclear receptors for aldosterone. Proc. Natl.Acad. Sci,U.S. 56: 872- 879.

Ferreira, A.L., L.Lison and V.Valeri. 1967. Caryometric study of spermatogenesis in the rat. Z.Zellforsch., 76(1):31-55.

Feulgen, R. und H. Rossenbeck. 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Hoppe-Seylers Z. physiol.Chem., 135: 203-248.

Feulgen, R. und K. Voit. 1924. Ueber den Mechanismus der Nuklealfärbung.II. Mitteilung. Ueber das Verhalten der Kerne partiell hydrolysierter mikroskopischer Präparate zur fuchsin-schwefligen Säure nach vorausgegangener Behandlung mit Phenylhydrazin. Z.physiol.Chem., 136: 57-61.

Fischer, E.R. and R.D.Lillie. 1954. The effect of methylation on basophilia. J.Histochem.Cytochem., 2: 81-87.

Flamm, W.G., P.M.B.Walker and M.McCallum. 1969. Some properties of the single-strands isolated from the DNA of the nuclear satellite of the mouse (Mus musculus). J.Mol.Biol., 40:423-443.

- Frenster, J.H. 1965. Nuclear polyanions as de-repressors of synthesis of ribonucleic acid. *Nature*, 206: 680-683.
- Frenster, J.H. 1969. Biochemistry and molecular biophysics of heterochromatin and euchromatin. In *Handbook of Molecular Cytology* (A.Lima-de-Faria, ed.). North-Holland Publ. Co., Amsterdam-London. p.251-276.
- Gall, J.G., E.H.Cohen and M.L.Polan. 1971. Repetitive DNA sequences in Drosophila. *Chromosoma*, 33: 319-344.
- Garcia, A.M. 1969a. Studies on deoxyribonucleic acid in leukocytes and related cells of mammals. VI. The Feulgen-deoxyribonucleic acid content of rabbit leukocytes after hypotonic treatment. *J.Histochem.Cytochem.*, 17(1): 47-55.
- Garcia, A.M. 1969b. Studies on DNA in leukocytes and related cells of mammals. VII. The fast green-histone content of rabbit leukocytes after hypotonic treatment. *J.Histochem.Cytochem.*, 17: 475-481.
- Garcia, A.M. 1970. Stoichiometry of dye binding versus degree of chromatin coiling. In *Introduction to Quantitative Cytochemistry -II* (G.L.Wied, ed.). Acad. Press, N.Y. & London. p. 153-170.
- Garcia, A.M. and R.Iorio. 1966. Potential sources of error in two-wavelength cytophotometry. In *Introduction to Quantitative Cytochemistry* (G.L.Wied, ed.). Acad. Press, N.Y. & London. p. 215-237.
- Geitler, L. 1938. Die Entstehung der polyploiden somatischen Zellkerne bei Heteropteren durch wiederholte Chromosomenteilung ohne Spindelbildung und Kernteilung. *Naturwiss.*, 26: 722 - 723.
- Geitler, L. 1939a. Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. *Chromosoma*, 1: 1-22.
- Geitler, L. 1939b. Das Heterochromatin der Geschlechtschromosomen bei Heteropteren. *Chromosoma*, 1: 197-229.
- Gledhill, B.L. 1966. Studies on the DNA content, dry mass and optical area of ejaculated spermatozoal heads from bulls with normal and lowered fertility. *Acta vet.scand.*, 7: 166-174.
- Gledhill, B.L. 1970. Changes in nuclear stainability associated with spermateliosis, spermatozoal maturation, and male infertility. In *Introduction to Quantitative Cytochemistry-II* (G.L.Wied, ed.). Acad. Press, N.Y. & London. p. 125-151.
- Gledhill, B.L., M.P.Gledhill, R.Rigler Jr. and N.R.Ringertz. 1966.

- Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. Exptl. Cell Res., 41: 652-665.
- Gorovsky, M.A. and J. Woodard. 1967. Histone content of chromosomal loci active and inactive in RNA synthesis. J. Cell Biol., 33: 723-728.
- Gorovsky, M.A. and R.A. Eckhardt. 1970. Studies on the histones of mouse hetero- and euchromatin. J. Cell Biol., 47: 75a.
- Graner, E.A. 1952. Como aprender estatística. Comp. Melhoramentos, S. Paulo.
- Greenwood, M.S. and G.P. Berlyn. 1968. Feulgen cytophotometry of pine nuclei: effects of fixation, role of formalin. Stain Technol., 43: 111-117.
- Grumbach, M.M., A. Morishima and J.H. Taylor. 1963. Human sex chromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49(5): 581-589.
- Hannah, A. 1951. Localization and function of heterochromatin in Drosophila melanogaster. Adv. Genet., 4: 87-125.
- Harbers, E. 1969. Nucleinsäuren. Biochemie und Funktionen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Harbers, E. und W. Sandritter. 1968. Gesteigerte Heterochromatinisierung als pathogenetisches Prinzip. Dtsch. med. Wschr., 93: 269-271.
- Hardonk, M.J. and P. van Duijn. 1964a. Studies on the Feulgen reaction with histochemical model systems. J. Histochem. Cytochem., 12: 758-767.
- Hardonk, M.J. and P. van Duijn. 1964b. The mechanism of the Schiff reaction as studied with histochemical model systems. J. Histochem. Cytochem., 12: 748-751.
- Harris, H. 1970. Cell fusion. Harvard Univ. Press. Cambridge, Mass.
- Heitz, E. 1928. Das Heterochromatin der Moose I. Jahrb. wissensch. Bot., 69: 762-818.
- Heitz, E. 1931. Die Ursache der gesetzmassigen Zahl, Lage, Form und Grosse pflanzlicher Nukleolin. Planta, 12: 775-844.
- Heitz, E. 1932. Die Herkunft der Chromozentren. Planta (Berl.), 18: 571-636.
- Heitz, E. 1933a. Ueber totale und partielle somatische Heteropyknose, sowie strukturelle Geschlechtschromosomen bei Drosophila funebris. Z. Zellforsch., 19: 720-742.

- Heitz,E. 1933b. Die somatische Heteropyknose bei Drosophila melanogaster und ihre genetische Bedeutung.Z.Zellforsch., 20: 237-287.
- Heitz,E. 1934. Ueber α - und β -Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromomeren bei Drosophila. Ziol. Zbl.(Leipzig), 54: 588-609.
- Heitz,E. 1935. Chromosomenstruktur und Gene. Z. indukt.Abstamm.-u. Vererb.-Lehre, 70: 402-447.
- Hennig,W., I. Hennig and H.Stein. 1970. Repeated sequences in the DNA of Drosophila and their localization in giant chromosomes. Chromosoma, 32: 31-63.
- Hilgartner,C.A. 1968. The binding of DNA to residual protein in mammalian nuclei. Exptl. Cell Res., 49: 520 - 532.
- Hillary,B.B. 1939. Use of the Feulgen reaction in cytology.I.Effect of fixatives on the reaction. Botan.Gaz., 101: 276-309.
- Himes,M. 1967. An analysis of heterochromatin in maize root tips. J.Cell Biol., 35: 175-181.
- Himes,M., C.Burdick and D.Bakewicz. 1969. Nonhistone proteins of hematocyte and erythrocyte nuclei of frog liver. J.Cell Biol., 43: 53a.
- Hinton,T. 1942. A comparative study of certain heterochromatic region in mitotic and salivary gland chromosomes of Drosophila melanogaster. Genetics, 27: 119-127.
- Holliday,R. and J.E.Pugh. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. Science, 187: 226-232.
- Hsu,T.C.1962. Differential rate in RNA synthesis between euchromatin and heterochromatin. Exptl.Cell Res., 27: 332-334.
- Hsu,T.C. and F.E. Arrighi. 1971. Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. Chromosoma , 34: 243-253.
- Huang, C. 1971. Replication of euchromatin and heterochromatin in a mealybug. Chromosoma, 34: 230-242.
- Huang,R.C. and J.Bonner. 1962. Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis.Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.,48:1216-1222.
- Hughes-Schrader,S. 1935. The chromosome cycle of Phenacoccus(Coccidae).Biol.Bull., 69: 462-468.
- Hughes-Schrader,S. 1948. Cytology of Coccids (Coccoidea-Homoptera). Adv.Genet., 2: 127-203.
- Itzhaki,R.F. 1971. The arrangement of proteins on the deoxyribo-

- nucleic acid in chromatin. Biochem.J., 125: 221-224.
- James, J. 1972. DNA constancy and chromatin structure in some cell nuclei of Amphiuma. Histochem.J., 4: 181-192.
- Jones, K.W. 1970. Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. Nature, 225: 912-915.
- Jones, K.W. and F.W. Robertson. 1970. Localization of reiterated nucleotide sequences in Drosophila and mouse by in situ hybridization of complementary RNA. Chromosoma, 31: 331-345.
- Kasten, F.H. 1956. Stability of the Feulgen-deoxyribonucleic acid absorption curve in situ with variation in nuclear protein content and other factors. J.Histochem.Cytochem., 4: 462-470.
- Kasten, F.H. 1957. The Feulgen-deoxyribonucleic acid absorption curve in normal and tumorous tissues. J.Histochem.Cytochem., 5: 398-402.
- Kasten, F.H. 1958. The Feulgen-DNA absorption curve in situ. Histochemie, 1: 123-150.
- Kasten, F.H. 1959. Schiff-type reagents in cytochemistry. I. Theoretical and practical considerations. Histochemie, 1: 466-509.
- Kasten, F.H. 1960. The chemistry of Schiff's reagent. Intern.Rev. Cytol., 10: 1-100.
- Kaye, J.S. and R. McMaster-Kaye. 1966. The fine structure and chemical composition of nuclei during spermiogenesis in the house cricket. I. Initial stages of differentiation and the loss of nonhistone protein. J.Cell Biol., 31: 159-179.
- Khush, G.S., C.M. Rick and R.W. Robinson. 1964. Genetic activity in a heterochromatic chromosome segment of the tomato. Science, 145: 1432-1434.
- Kiefer, R., G. Kiefer und W. Sandritter. 1972. Feulgenhydrolysekinetik in Eu- und Heterochromatin. Histochemie, 30: 150-155.
- Kleinsmith, L.J., V.G. Allfrey and A.E. Mirsky. 1966. Phosphoprotein metabolism in isolated nuclei. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S., 55: 1182-1189.
- Klinger, H.R., H.G. Schwarzach and J. Weiss. 1967. DNA content and area of sex chromatin positive and negative nuclei during the cell cycle. Cytogenetics, 6: 1-19.
- Kruh, J., B. Dastugne, N. Defer, M. Kamiyama and L. Tichonicky. 1974. Chromosomal non histone proteins and nuclear protein kin -

- ases. Biochimie, 56: 995-1001.
- Kruh, J., L. Tichonicky et H. Wajcman. 1969. Action des proteines acides du noyau sur la synthese acellulaire de l'hemoglobine et sur les RNA. Biochim. Biophys. Acta, 195: 549-562.
- Lakhotia, S.C. and J. Jacob. 1974. EM autoradiographic studies on polytene nuclei of Drosophila melanogaster. II. Organization and transcriptive activity of the chromocentre. Exptl. Cell Res., 86: 253-263.
- Lee, J.C. and J.J. Yunis. 1970. Constitutive heterochromatin during early embryogenesis of Microtus agrestis. Exptl. Cell Res., 59: 339-341.
- Lee, J.C. and J.J. Yunis. 1971a. A developmental study of constitutive heterochromatin in Microtus agrestis. Chromosoma, 32: 237-250.
- Lee, J.C. and J.J. Yunis. 1971b. Cytological variations in the constitutive heterochromatin in Microtus agrestis. Chromosoma, 35: 117-124.
- Lehy, T. and P. Zeitoun. 1970. Influence of fixatives on the meta chromatic reaction to toluidine blue at pH 5; A₁ and A₂ cells of human endocrine pancreas. Stain Technol., 45(2): 63-70.
- Lerman, L.S. 1961. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. J. Mol. Biol., 3: 18-30.
- Lerman, L.S. 1963. The structure of the DNA-acridine complex. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.); 49: 94-102.
- Lerman, L.S. 1964. Acridine mutagens and DNA structure. J. cell. comp. Physiol. (Suppl. 1), 64: 1.
- Lessler, M.A. 1951. The nature and specificity of the Feulgen reaction. Arch. Biochem. Biophys., 32: 42-54.
- Lillie, R.D. 1954. Histopathologic technic and practical histochemistry. The Blakiston Co., Inc. N.York & London.
- Lima-de-Faria, A. 1952. Chromomere analysis of the chromosome complement of rye. Chromosoma, 5: 1- 68.
- Lima-de-Faria, A. 1959a. Differential uptake of tritiated thymidine into hetero- and euchromatin in Melanoplus and Secale. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6(3): 457-475.
- Lima-de-Faria, A. 1959b. Incorporation of tritiated thymidine into meiotic chromosomes. Science, 130: 503-504.
- Lima-de-Faria, A. 1969. DNA replication and gene amplification in

- heterochromatin. In Handbook of Molecular Cytology (A.Lima-de-Faria,ed.).North-Holland Publ.Co., Amsterdam-London, p. 277-325.
- Lima-de-Faria,A., B. Nilsson, D.Cave, A.Puga and H.Jaworska.1968. Tritium labelling and cytochemistry of extra DNA in Acheta. Chromosoma, 25: 1-20.
- Lima-de-Faria,A. and H.Jaworska. 1968. Late DNA synthesis in heterochromatin. Nature, 217 (5124): 138-142.
- Lima-de-Faria,A., M.Birnstiel and H.Jaworska. 1969. Amplification of ribosomal cistrons in the heterochromatin of Acheta. Genetics (Suppl.), 61(1): 145-159.
- Lindsley,D.L., C.W.Edington and E.S. von Halle. 1960. Sex-linked recessive lethals in Drosophila whose expression is suppressed by the Y chromosome. Genetics, 45(12): 1649-1670.
- Lison,L. 1933. Sur les phénomènes de métachromasie. Bull.Cl. sc. Acad.roy.Belg., 19: 1332.
- Lison,L. 1935. Études sur la métachromasie.Colorants métachromatiques et substances chromotropes.Arch.biol.(Liège), 46:599-668.
- Lison,L. 1955. Variation de la basophilie pendant la maturation du spermatozoïde chez le rat et sa signification histochemique. Acta histochem., 2: 47-67.
- Lison,L. 1960. Histochimie et Cytochimie Animales. Gauthier-Villars, Paris.
- Lison,L. and W. Mutsaars. 1950. Metachromasy of nucleic acids. Quart.J.microsc.Sci., 91: 309-313.
- Loeb, P.M. and J.D. Wilson. 1965. Intracellular localization of testosterone, 1-2-H³ in the preen gland of the duck. Clin. Res., 13: 45
- Longley,J.B. 1952. Effectiveness of Schiff variants in the periodic-Schiff and Feulgen nucleal technics. Stain Technol., 27: 161-169.
- Lorick,G. 1970. Differential DNA synthesis in heterochromatic and euchromatic chromosome sets of Planococcus citri. Chromosoma, 32: 11-30.
- Lyon,M.F. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse(Mus musculus L.), Nature, 190: 372-373.
- Lyon,M.F. 1962. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. Amer.J.Human Genet., 14: 135-148.

- Lyon, M.F. 1963. Attempts to test the inactive-X theory of dosage compensation in mammals. *Genet. Res. Cambridge*, 4: 93-103.
- Lyon, M.F. 1968. Chromosomal and subchromosomal inactivation. *Ann. Rev. Genet.*, 2: 31-52.
- Lyon, M.F. 1974. Gene and chromosome inactivation. *Genetics*, 78: 305-309.
- MacGregor, H.C. and J. Kezer. 1971. The chromosomal localization of a heavy satellite DNA in the testis of Plethodon c. cinereus. *Chromosoma*, 33: 167-182.
- Mackay, M., C.A. Hilgartner and A.L. Dounce. 1968. Further studies of DNA - nucleoprotein gels and residual protein of isolated cell nuclei. *Exptl. Cell Res.*, 49: 533-557.
- Mattoccia, E. and D.E. Comings. 1971. Buoyant density and satellite composition of DNA of mouse heterochromatin. *Nature New Biol.*, 229: 175-177.
- Mello, M.L.S. 1969. Contribuição ao estudo da poliploidia somática em alguns órgãos de insetos. Tese de doutoramento. Fac. de Medicina de Ribeirão Preto, USP. 74p.
- Mello, M.L.S. 1970. Somatic polyploidy in insects. *Ciência e Cultura*, 22(4): 348-350.
- Mello, M.L.S. 1971. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of Triatoma infestans (Reduv., Hemiptera). *Cytologia*, 36: 42-49.
- Mello, M.L.S. 1973. Influence of some cytochemical methods on birefringence of the honey bee sperm nuclei. *Acta histochem.*, 47: 266-272.
- Mello, M.L.S. 1975. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Rev. Bras. Pesquisas Méd. Biol.*, 8(2): 101-107.
- Mello, M.L.S. 1976. Valores Feulgen-DNA e algumas propriedades matemáticas da imagem nuclear digitalizada de células do Triatoma infestans Klug (Hemiptera, Reduviidae). Campinas (SP), 56p.
- Mello, M.L.S., A.C. Caseiro Filho e A.C. de Carvalho. 1976. A hidrólise ácida e a remoção de proteínas básicas de núcleos interfásicos e de cromossomos mitóticos. *Rev. Bras. Biol.*, 36 (1)(no prelo).
- Mello, M.L.S. e B.C. Vidal. 1972. Algumas observações sobre a basofilia nuclear nas glândulas de seda de Melipona quadrifasciata (Hym., Apoidea). Homenagem a W.E. Kerr pelos 50 anos (Rio Claro, SP); 225-236.

- Mello, M.L.S. and B.C. Vidal. 1973. Linear dichroism and anomalous dispersion of birefringence on sperm heads. *Acta histochem.*, 45: 109-114.
- Mello, M.L.S. and B.C. Vidal. 1974. Optical properties of plant chromosomes during mitosis. *Cytologia*, 39: 315-320.
- Mello, M.L.S. and B.C. Vidal. 1975. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper. *In* *Invertebrate Reproduction* (K.G. Adiyodi & R.G. Adiyodi, ed.). Calicut Univ. Press, p.10.
- Mello, M.L.S. and B.C. Vidal. 1976. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper *Staurorhectus longicornis* Giglio-Toss. *Proc. Int. Symp. Invert. Reprod. Physiol.* (no prelo).
- Mello, M.L.S., B.C. Vidal and G. Schlüter. 1973a. Digital image analysis and anisotropical properties of condensed chromatin. *Genetics*, 74(Suppl.): 180.
- Mello, M.L.S., B.C. Vidal e L. Valdrighi. 1973b. Análise histofotométrica da basofilia em feixes de colágeno do periodonto de rato. *Rev. Brasil. Biol.*, 33(2): 179-182.
- Mello, M.L.S. and V.A. Zanardi. 1976. Feulgen-DNA plug and two-wave length cytophotometry of bull spermatozoa. *Mikroskopie* (no prelo).
- Mellon, E.F. 1958. Aldehyde tannage. *In* *Chemistry and technology of leather* (F.O. Flathery, W.T. Roddy & R. Lollar, eds.), p. 66-97. London: Chapman & Hall.
- Mendelsohn, M.L. 1958. The two-wavelength method of microspectrophotometry. II. A set of tables to facilitate the calculations. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4(4): 415-424.
- Mendelsohn, M.L. 1966. Absorption cytophotometry: comparative methodology for heterogeneous objects, and the two-wave length method. *In* *Introduction to Quantitative Cytochemistry* (G.L. Wied, ed.). Acad. Press, New York and London. p. 201-214.
- Meselson, M., R. Yuan and J. Heywood. 1972. Restriction and modification of DNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 447-466.
- Michelson, A.M., C. Monny and A. Kovoov. 1972. Action of quinacrine mustard on polynucleotides. *Biochimie*, 54: 1129-1136.
- Mirsky, A.E. and A.W. Pollister. 1946. Chromosomin: a desoxyribose nucleoprotein complex of the cell nucleus. *J. Gen. Physiol.*, 30: 117-148.
- Mirsky, A.E. and H. Ris. 1947. The chemical composition of isolated chromosomes. *J. Gen. Physiol.*, 31: 7-18.

- Mirsky, A.E. and H. Ris. 1951. The composition and structure of isolated chromosomes. *J. Gen. Physiol.*, 34: 475-492.
- Mittermayer, C., H. Madreiter, B. Lederer and W. Sandritter. 1971. Differential acid hydrolysis of euchromatin and heterochromatin (biochemical, histochemical and morphological studies). *Beitr. Path.*, 143: 157-171.
- Miura, A. and Y. Ohba. 1967. Structure of nucleohistone. III. Interaction with toluidine blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 145: 436-445.
- Moses, M.J. 1951. Absorption spectrum of the Feulgen-nucleal complex in vitro and in situ. *J. Natl. Cancer Inst.*, 12: 257.
- Müller, H.A. 1966. Die Chromozentren in der Leberzellkernen der Maus unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Erg. allg. Path. Ant.*, 47: 147-185.
- Muller, H.J. 1918. Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. *Genetics*, 3: 422-499.
- Muller, H.J., D. Rafael, S.M. Gershenson and A.A. Prokofieva-Belgova. 1937. A further analysis of loci in the so-called "inter region" of the X chromosome of Drosophila. *Genetics*, 22: 87-93.
- Muller, H.J. and T.S. Painter. 1932. The differentiation of the sex chromosomes of Drosophila into genetically active and inert regions. *Z. indukt. Abstamm. u. Vererb.-Lehre*, 62: 316-365.
- Noeske, K. 1969. Diskrepanzen von Feulgen-Wert und DNS-Gehalt. *Histochemie*, 20: 322-327.
- Noeske, K. 1971. Stöchiometrische Probleme der quantitativen Fast-green-Zytophotometrie bei der Histonbestimmung. *Histochemie*, 27: 243-252.
- Noteboom, W.D. and J. Gorski. 1965. Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111: 559-568.
- Nur, U. 1966. Nonreplication of heterochromatic chromosomes in a mealy bug, Planococcus citri (Coccoidea: Homoptera). *Chromosoma*, 19: 439-448.
- Nur, U. 1967. Reversal of heterochromatization and activity of the paternal chromosome set in the male mealy bug. *Genetics*, 56: 375-389.
- Ohno, S., H.P. Klinger and N.B. Atkin. 1962. Human oögenesis. *Cytogenetics*, 1: 42-51.

- Ohno, S., W.D.Kaplan and R.Kinosita. 1959. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of Rattus norvegicus. Exptl.Cell Res., 18: 415-418.
- Ohno, S., W.D.Kaplan and R.Kinosita. 1961. X-chromosome behaviour in germ and somatic cell of Rattus norvegicus. Exptl. Cell Res., 22: 535-544.
- Ornstein, L. 1952. The distributional error in microspectrophotometry. Lab. Invest., 1: 250-262.
- Ornstein, L. 1956. Discussion following the paper of Kasten. J. Histochem.Cytochem., 4: 442-443.
- Overend, W.G. and M.Stacey. 1949. Mechanism of the Feulgen nuclear reaction. Nature, 163: 538-540.
- Pachmann, U. and R.Rigler. 1972. Quantum yield of acridines interacting with DNA of defined base sequence. Exptl. Cell Res., 72: 602-608.
- Pal, M.K. and A.K.Ghosh. 1973. Stoichiometry of metachromatic dye binding by deoxyribonucleic acid. Histochemie, 36: 29-33.
- Pallotta, D., L.Berlowitz and L.Rodriguez. 1970. Histones of genetically active and inactive chromatin in mealy bugs. Exptl. Cell Res., 60: 474.
- Pardue, M.L. and J.G.Gall. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science, 168: 1356-1358.
- Parez, M., J.P.Petel et C.Vendrelly. 1960. Sur la teneur en acide désoxyribonucléique des spermatozoïdes de taureaux présentant différents degrés de fécondité. C.R.Acad.Sci.(Paris), 251: 2581-2583.
- Patau, K. 1952. Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. Chromosoma, 5: 341-362.
- Pavan, C. 1946. Two types of heterochromatin in Drosophila nebulosa. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 32(5): 137-145.
- Pavan, C. 1966. Estrutura e função dos cromossomos. In Elementos de Genética (C.Pavan & A.Brito da Cunha, eds.). Comp.Edit. Nac., S.Paulo, p.118-157.
- Pavan, C. and M.E.Breuer. 1952. Polytene chromosomes in different tissues of Rhynchosciara. J.Hered., 43: 150-157.
- Pavan, C. and M.E.Breuer. 1954. Polytene chromosomes of Rhynchosciara milleri sp.n. (Diptera, Mycetophilidae). Rev. bras. Biol., 15: 329-339.
- Pearse, A.G.E. 1961. Histochemistry. Littele, Brown & Co., Boston. p.998.

- Phillips, D.M.P. 1962. The histones. *Progr. Biophys. Chem.*, 12: 213-280.
- Rae, P.M. 1970. Chromosomal distribution of rapidly reannealing DNA in Drosophila melanogaster. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 67: 1018-1025.
- Rasch, E.M. and R.W. Rasch. 1972. Loss of Feulgen staining by prolonged SSC treatment of chicken blood cell nuclei. *J. Cell Biol.*, 55: 212a.
- Rasch, R.W. and E.M. Rasch. 1973. Kinetics of hydrolysis during the Feulgen reaction for deoxyribonucleic acid. A reevaluation. *J. Histochem. Cytochem.*, 21(12): 1053-1065.
- Richards, B.M. and J.F. Pardon. 1970. The molecular structure of nucleohistone (DNH). *Exptl. Cell Res.*, 62: 184-196.
- Romhányi, G. 1967. Submicroscopic structure of interphase nuclei as revealed by topochemical staining reactions. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.*, 15: 131-145.
- Ruch, F. 1966. Determination of DNA content by microfluorometry. In *Introduction to Quantitative Cytochemistry* (G.L. Wied, ed.). Acad. Press, N.Y. & London, p. 281-294.
- Ruch, F. and A. Rosselet. 1970. A cytochemical study of euchromatin and heterochromatin in roots of Rhoeo discolor. *Exptl. Cell Res.*, 62: 219-227.
- Sadgopal, A. and J. Bonner. 1970a. Chromosomal proteins of interphase HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 207: 206-226.
- Sadgopal, A. and J. Bonner. 1970b. Proteins of interphase and metaphase chromosomes compared. *Biochim. Biophys. Acta*, 207: 227-239.
- Sager, R. and R. Kitchin. 1975. Selective silencing of eukaryotic DNA. *Science*, 189: 426-433.
- Sandritter, W. 1966. Methods and results in quantitative cytochemistry. In *Introduction to Quantitative Cytochemistry* (G. L. Wied, ed.). Acad. Press, N.Y. and London, p. 159-182.
- Sandritter, W., K. Jobst, L. Rakow und K. Bosselmann. 1965. Zur Kinetik der Feulgenreaktion bei verlängerter Hydrolysezeit. Cytophotometrische Messungen im sichtbaren und ultravioletten Licht. *Histochemie*, 4: 420-437.
- Sandritter, W. und N. Böhm. 1964. Atypische Hydrolysekurven bei der Feulgenreaktion von Mäuseascitestumorzellen. *Naturwiss.*, 51: 273-274.

- Saphir, S.R. 1930. Genetic and cytological examination of the phenomenon of primary nondisjunction in Drosophila melanogaster. Genetics, 5: 459-487.
- Savage, R.E. and W. Plaut. 1958. The effect of HCl hydrolysis on the retention of thymidine in DNA. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4: 701-706.
- Scarano, E. 1967. In Comprehensive Biochemistry (M. Florkin and E.H. Stotz, eds.). Elsevier, New York, vol. 28: 55.
- Scheuner, G. and J. Hutschenreiter. 1975. Das Auftreten von Metachromasie, Doppelbrechung und Dichroismus durch die Toluidinblaureaktion. Progr. Histochem. Cytochem., 7(2): 1-69.
- Schiemer, H.G. 1962. Fehlerberechnungen für Trockengewichtsbestimmungen mit dem Bakerschen Interferenzmikroskop. Ann. Histochem. (Suppl.), 2: 25-36.
- Schiff, H. 1866. Eine neue Reihe organischer Diamine. Justus Liebigs Ann. Chem., 140: 92-137.
- Schmid, W. and M.F. Leppert. 1969. Rates of DNA synthesis in heterochromatic and euchromatic segments of the chromosome complements of two rodents. Cytogenetics, 8: 125-135.
- Schmidt, W.J. 1938. Polarisationsoptische Analyse des submikroskopischen Baues von Zellen und Geweben. In Hdb. Biol. Arbeitsmeth. (E. Abderhalden, Hrsg.), Abt. V/10, p. 435-665. Urban und Schwarzenberg, Berlin und Wien.
- Schmidt, W.J. 1958. Anwendung der Polarisationsmikroskopie in der Histochemie. In Handbuch der Histochemie (W. Grauman & K. Neuman, ed.), Vol. I/1, p. 171-191. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Schrader, F. 1921. The chromosomes of Pseudococcus nipae. Biol. Bull., 40: 259-270.
- Schreiber, G., A.R. Bogliolo and A.C. de Pinho. 1972. Cytogenetics of Triatominae: caryotype, DNA content, nuclear size and heteropycnosis of autosomes. Rev. Brasil. Biol., 32(2): 255-263.
- Schreiber, G., F.P. Silva, E.S. Resende, T.M. Cavenaghi and H.C. Carvalho. 1968. DNA synthesis in the spermatogenesis of Triatomids. Rev. Bras. Pesquisas Méd. Biol., 1: 245-252.
- Schreiber, G., H.C. Carvalho and H.N. Espínola. 1967. Genetics of Triatoma and other vector species. In Genetics of Insect Vectors of Disease (J.W. Wright & R. Pal, ed.). Elsevier, Amsterdam. 441-456.
- Schreiber, G. e J. Pellegrino. 1950. Eteropiconosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione. Sci. Genet., 3: 215-226.
- Schultz, J. 1947. The nature of heterochromatin. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 12: 179-191.
- Selander, R.-K. and A. de la Chapelle. 1973. The fluorescence of quinacrine mustard with nucleic acids. Nature New Biol., 245: 240-243.

- Semmel, M. and J. Hubbert. 1964. The interaction of basic dyes with ribonucleic acid. Arch. Biochem. Biophys., 108: 158-168.
- Shen, T.H. 1932. Zytologische Untersuchungen über Sterilität bei Männchen von Drosophila melanogaster und bei F₁ Männchen der Kreuzung zwischen D.simulans Weibchen und D.melanogaster. Z.Zellforsch., 15: 547-580.
- Sibatani, A. 1950. Effects of histone and other proteins on the Feulgen reaction. Nature, 166: 355-356.
- Sibatani, A. 1953. Feulgen reaction and quantitative cytochemistry of desoxypentose nucleic acid. 3. Effects of histone on the Feulgen reaction in vitro. J.Biochem.Tokyo, 40: 119-134.
- Sibatani, A. and M. Fukuda. 1953. Feulgen reaction and quantitative cytochemistry of desoxypentose nucleic acid. I. Estimation of the loss of tissue DNA caused by fixation and acid hydrolysis. Biochim. Biophys. Acta, 10: 93-102.
- Sieger, M., F. Pera and H.G. Schwarzacher. 1970. Genetic inactivity of heterochromatin and heteropycnosis in Microtus agrestis. Chromosoma, 29: 349-364.
- Sieger, M., G. Garweg and H.G. Schwarzacher. 1971. Constitutive heterochromatin in Microtus agrestis: binding of actinomycin-D and transcriptional inactivity. Chromosoma, 35: 84-98.
- Singer, M. 1950. The binding of acid and basic dyes by protein. Int.Rev.Cytol., 1: 211-255.
- Sivak, A. and S.R. Wolman. 1974. Chromosomal proteins in fixed metaphase cells. Histochem., 42: 345-349.
- Sonnenbichler, J. and P. Nobis. 1970. The so-called non-histones from acid-treated calf thymus chromatin. Europ.J.Biochem., 16: 60-65.
- Sprenger, E., N. Böhm, M. Schaden und W. Sandritter. 1971. Zur Kinetik der Feulgen-Hydrolyse bei Zellen junger und alter Ratten. Beitr.Path., 143: 59-69.
- Stedman, E. and E. Stedman. 1943. Chromosomin, a protein constituent of chromosomes. Nature, 152: 267.
- Stedman, E. and E. Stedman. 1947. The chemical nature and functions of the components of cell nuclei. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol., 12: 224-236.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics with special reference to the biological sciences. McGraw-Hill, New York.
- Stein, G.S., T.C. Spelsberg and L.J. Kleinsmith. 1974. Nonhistone chromosomal proteins and gene regulation. Science, 183: 817-824.

- Stellwagen, R.H. and R.D. Cole. 1969. Chromosomal proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 38: 951-990.
- Stern, C. 1929. Untersuchungen über Aberrationen des Y-chromosom von Drosophila melanogaster. *Z. indukt. Abst. Vererb.*, 51: 253-353.
- Sullivan, P.A. and A.M. Garcia. 1970. *Acta Cytol.*, 14: 104 (apud Mittermayer, C., H. Madreiter, B. Lederer and W. Sandritter. 1971. Differential acid hydrolysis of euchromatin and heterochromatin. *Beitr. Path.*, 143: 157-171.)
- Sutherland, G.B.B.M. 1959. Application of infrared spectroscopy to biological problems. In *Biophysical Science - A study program*. p. 118-122. J.L. Oncley, New York.
- Swift, H. 1950. The deoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *Physiol. Zool.*, 23: 169-198.
- Swift, H. 1953. Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Int. Rev. Cytol.*, 2: 1-76.
- Swift, H. 1955. Cytochemical techniques for nucleic acids. In *The Nucleic Acids* (E. Chargaff & J.N. Davidson, eds.). Acad. press, N.York.
- Swift, H. 1964. In *The Nucleohistones* (J. Bonner and P. Ts'o, ed.). Holden-Day, Inc., San Francisco. p. 169.
- Swift, H. 1966. The quantitative cytochemistry of RNA. In *Introduction to Quantitative Cytochemistry* (G.L. Wied, ed.). Acad. Press, N.York & London. p. 355-386.
- Tamm, C. and E. Chargaff. 1953. Physical and chemical properties of the apurinic acid of calf thymus. *J. biol. Chem.*, 203: 689-694.
- Tamm, C., M.E. Hodes and E. Chargaff. 1952. The formation of apurinic acid from the deoxyribonucleic acid of calf thymus. *J. biol. Chem.*, 195: 49-63.
- Tanaka, R. 1965. H^3 -thymidine autoradiographic studies of the heteropycnosis, heterochromatin and euchromatin in Spiranthes sinensis. *The Bot. Magazine, Tokyo*, 78: 50.
- Tanaka, R. 1969. Speciation and karyotypes in Spiranthes sinensis. *J. Sci. of Hiroshima Univ. Ser. B.*, 12: 165.
- Tatuno, S., R. Tanaka and M. Masubuchi. 1970. Early DNA synthesis in the X-chromosome of Pellia neesiana. *Cytologia*, 35: 220-226.
- Taylor, J.H. 1958. Incorporation of phosphorus-32 into nucleic acids and proteins during microgametogenesis of Tulbaghia. *Am. J. Botany*, 45: 123-131.
- Teorell, T. 1937. *Arch. int. Pharmacodyn. Therap.*, 57: 205 (apud Böhlm, N. 1965. Cytophotometrische Messungen des DNS-Gehaltes feul-

gegefärbter Mäuseascites Tumorzellen in verschiedenen Stadien des Tumorwachstums bei variation der Hydrolysezeit. Tese de doutoramento. Justus Liebig Univ., Giessen).

- Thorell, B. and F. Ruch. 1951. Molecular orientation and light absorption. *Nature*, 167: 815.
- Vahs, W. 1973. Die Bedeutung der Hydrolyse-Art in der Feulgen-Cytophotometrie von Kernen mit unterschiedlichen Ploidiegraden. *Histochemie*, 33: 341-348.
- van Slyke, D. D. 1911. A method for the quantitative determination of aliphatic amino groups. *J. Biol. Chem.*, 9: 185 -207.
- Vendrely, R. and C. Vendrely. 1966. Biochemistry of histones and protamines. *Protoplasmatologia*, 5(3c): 1-88.
- Vidal, B. C. 1972a. Anormal dispersion of birefringence, linear dichroism and relationship with ORD (Extrinsic Cotton Effect). *Histochemie*, 30: 102-107.
- Vidal, B. C. 1972b. Banding and anisotropic staining of chromosomes. *Beitr. Path.*, 146: 285-288.
- Vidal, B. C. 1972c. Birefringence measurements on toluidine blue-stained chromosomes during mitosis. *Ann. Histochem.*, 17: 145-150.
- Vidal, B. C. 1972d. Doppelbrechungsdispersion und Lineardichroismus von Eu- und Heterochromatin nach Färbung mit Toluidinblau. Nachweis eines Cotton-Effektes. *Beitr. Path.*, 145: 269-285.
- Vidal, B. C. and C. Casartelli. 1973. Macromolecular orientation in polytene chromosomes as measured by staining and anisotropical phenomena. *Genetics (Suppl.)*, 74(2): s285.
- Walker, P. M. B. 1971a. Origin of satellite DNA. *Nature*, 229: 306-308.
- Walker, P. M. B. 1971b. "Repetitive" DNA in higher organisms. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 23: 147-190.
- Walker, P. M. B. and B. M. Richards. 1959. Quantitative microscopical techniques for single cells. In *The Cell* (J. Brachet and A. E. Mirsky, eds.). Vol. I, p. 91-138. Acad. Press, N. York.
- Wang, T. Y. 1966. The chromatin and nucleolar acidic proteins: isolation, characteristics and roles in nuclear metabolism. In *The cell nucleus* (M. G. Ord, L. A. Stokes, H. M. Klouwen & I. Betel, eds.). Taylor & Francis, Ltd., London.
- Weisblum, B. and P. L. deHaseth. 1972. Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate-rich regions in DNA. *Proc. natl. Acad. Sci.*, 69: 629-632.
- Weisblum, B. and P. L. deHaseth. 1973. Nucleotide specificity of the quinacrine staining reaction for chromosomes. *Chromosomes Today*, 4: 35-51.

- White, J.C. and P.C. Elmes. 1952. Fibres of human sodium deoxyribonucleate and nucleoprotein studied in polarized light by a simple method. *Nature*, 4291: 151-152.
- Wiame, J.M. 1947. The metachromatic reaction of hexametaphosphate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 69(2): 3146-3147.
- Wigglesworth, V.B. 1931a. The physiology of excretion in a blood-sucking insect, Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae). II. Anatomy and histology of the excretory system. *J. exp. Biol.*, 8: 428-442.
- Wigglesworth, V.B. 1931b. The physiology of excretion in a blood-sucking insect, Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae). III. The mechanism of uric acid excretion. *J. exp. Biol.*, 8: 443-451.
- Wigglesworth, V.B. 1965. The principles of insect physiology. Methuen & Co. Ltd., London.
- Wigglesworth, V.B. and M.M. Salpeter. 1962. Histology of the Malpighian tubules in Rhodnius prolixus Stal (Hemiptera). *J. Ins. Physiol.*, 8: 299-307.
- Wilkins, M.H.F., G. Zubay and H.R. Wilson. 1959. X-ray diffraction studies of the molecular structure of nucleohistone and chromosomes. *J. Mol. Biol.*, 1: 179-185.
- Wilkins, M.H.F. and J.T. Randall. 1953. Crystallinity in sperm heads, molecular structure of nucleoprotein in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, 10: 192.
- Woods, P.S. 1957. A chromatographic study of hydrolysis in the Feulgen nucleal reaction. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3: 71-88.
- Yasmineh, W.G. and J.J. Yunis. 1969. Satellite DNA in mouse autosomal heterochromatin. *Biochem. biophys. res. comm.*, 35(6): 779-782.
- Yasmineh, W.G. and J.J. Yunis. 1970. Localization of mouse satellite DNA in constitutive heterochromatin. *Exptl. Cell Res.*, 59: 69-75.
- Yasmineh, W.G. and J.J. Yunis. 1971a. Satellite DNA in calf heterochromatin. *Exptl. Cell Res.*, 64: 41-48.
- Yasmineh, W.G. and J.J. Yunis. 1971b. Repetitive DNA of Microtus agrestis. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 43: 580-587.
- Yunis, J.J., L. Roldan, W.G. Yasmineh and J.C. Lee. 1971. Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. *Nature New Biol.*, 231: 532-533.
- Yunis, J.J. and W.G. Yasmineh. 1970. Satellite DNA in constitutive heterochromatin of the guinea pig. *Science*, 168: 263-265.

- Yunis, J.J. and W.G. Yasminch. 1971. Heterochromatin, DNA, and cell function. *Science*, 174: 1200-1209.
- Zirkin, B.R. 1970. The protein composition of nuclei during spermiogenesis in the Leopard frog, Rana pipiens. *Chromosoma*, 31: 231.
- Zirkin, B.R. 1973. A cytochemical study of the non-histone protein content of condensed and extended chromatin. *Exptl. Cell Res.*, 78: 394-398.
- Zirkin, B.R. and S.K. Kim. 1972. Fine structure of fibers in thin sections of condensed chromatin. *Exptl. Cell Res.*, 75: 490-496.
- Zuckerlandl, E. 1974. A possible role of "inert" heterochromatin in cell differentiation. Action of and competition for "locking" molecules. *Biochimie*, 56: 937-954.

*

*

*

APÊNDICE 1

AJUSTE DE DADOS À FUNÇÃO DE BATEMAN

Transcrevem-se abaixo os passos principais do ajuste de dados à função de Bateman, segundo Ballester(1975-manuscrito em preparação):

"A função de Bateman (1910) pode também ser escrita

$$y = a \{e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}\} \quad (\text{Böhm e Seibert, 1966})$$

Suas propriedades são as seguintes:

1. Do fato de não admitir valores negativos, deduz-se facilmente que

$$a > 0; k_1 \geq 0; k_2 \geq k_1$$

2. Alcança o máximo no ponto

$$t_m = \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{k_2 - k_1}$$

e aplicando-se o teorema do valor médio, resulta que

$$t_m \leq \frac{1}{k_1}$$

3. O seu único ponto de inflexão é alcançado

em

$$t_i = 2t_m$$

de onde analogamente resultam

$$y'(0) = a(k_2 - k_1) \text{ pendente na origem}$$

$$y = a \cdot e^{-k_1 t} \{1 - e^{-(k_2 - k_1)t}\}$$

De forma que o parâmetro k_1 será o responsável pelo comprimento da curva sobre o eixo dos Y, o parâmetro a pela altura da curva (comprimento sobre o eixo dos X) e o parâmetro k_2 produz um incremento de $y'(0)$ e uma convergência a zero mais lenta.

O modelo matemático mais simples da função de

Bateman terá a seguinte forma:

$$y = a \{e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}\} + \epsilon,$$

em que o elemento aleatório ϵ se supõe com uma distribuição $N(0, \sigma^2)$.

Avaliando-se os parâmetros pelo método de máxima verossimilhança e chamando

$$Q = \sum_i (y_i - \hat{a} \{e^{-\hat{k}_1 t} - e^{-\hat{k}_2 t}\})^2 \text{ ao resíduo}$$

quadrático, teremos

$$(1) \quad \hat{\sigma}^2 = \frac{Q}{n}$$

$$(2) \quad \frac{\delta Q}{\delta a} = 0$$

$$\frac{\delta Q}{\delta k_1} = 0$$

$$\frac{\delta Q}{\delta k_2} = 0$$

O sistema (2) corresponde a soluções dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados. Resolvido o sistema formado por essas equações, a equação (1) nos dará um valor estimativo de σ^2 .

O sistema (2) é resolvido pelo método indicado por Hartley (1961) e que consiste numa modificação de um método inicial de Gauss para a estimativa de parâmetros numa regressão não linear geral.

As condições sob as quais o método de Hartley é convergente são testadas mediante uma tabulação prévia da função residual Q , para variações suficientemente amplas dos

parâmetros.

A primeira solução para iniciar o processo iterativo indicado por Hartley foi encontrada da seguinte maneira:

A função é

$$y = a \{ e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \} = a \cdot e^{-k_1 t} \{ 1 - e^{-(k_2 - k_1)t} \},$$

$$\text{onde } k_2 - k_1 > 0$$

No entanto, a tabulação dos resíduos Q indicou para $k_2 - k_1 > 1$ valores relativamente muito grandes de Q.

Portanto, fazendo variar $k_2 - k_1$ entre 0 e 1 umas 100 vezes, vão sendo obtidas outras tantas funções

$$\frac{y}{1 - e^{-(k_2 - k_1)t}} = a \cdot e^{-k_1 t}$$

e para cada uma delas uma linearização, tomando-se logaritmos, seguida de um processo de Newton-Raphson, dá as estimativas de a, k_1 que junto ao valor $k_2 - k_1$ proporcionam os três parâmetros a partir dos quais se calcula o resíduo $\underline{a}$ e toma-se como solução inicial a correspondente ao mínimo resíduo assim encontrado.

O método de Hartley leva esta solução inicial a uma solução final aproximada da verdadeira com uma margem de erro arbitrariamente pequena.

Resumindo:

$$\text{Faz-se variar } k_2 - k_1 = \frac{1}{n} \text{ para}$$

$$n = 100, 99, \dots, 2, 1$$

Para cada $k_2 - k_1$, estima-se a, k_1 através de

$$\ln \left(\frac{y}{1 - e^{-(k_2 - k_1)t}} \right) = \ln a - k_1 t, \text{ que é}$$

um ajuste linear.

É um processo de Newton-Raphson que produz as soluções de mínimos quadrados da função

$$\frac{y}{1 \cdot e^{-(k_2 - k_1)t}} = a e^{-k_1 t}$$

e para esses parâmetros assim resultantes calculamos

$$a = \Sigma \{ y_i - a(e^{-k_1 t_i} - e^{-k_2 t_i}) \}^2$$

Com os parâmetros a^0 , k_1^0 , k_2^0 , que tornam Q mínimo, iniciamos o processo de Hartley. Chamando

$$f(a, k_1, k_2; t) = a \{ e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \}, \text{ faz-se}$$

$$f(a^1, k_1^1, k_2^1; t) = f(a^0, k_1^0, k_2^0; t) + \left(\frac{\delta f}{\delta a} \right)_0 \cdot \Delta a +$$

$$+ \left(\frac{\delta f}{\delta k_1} \right)_0 \cdot \Delta k_1 + \left(\frac{\delta f}{\delta k_2} \right)_0 \cdot \Delta k_2,$$

que é um ajuste linear múltiplo e que permite calcular Δa , Δk_1 , Δk_2 e uma nova solução:

$$a^1 = a^0 + \Delta a \cdot \lambda$$

$$k_1^1 = k_1^0 + \Delta k_1 \cdot \lambda$$

$$k_2^1 = k_2^0 + \Delta k_2 \cdot \lambda$$

sendo $\lambda \in \{0, 1\}$ tal que o valor de

$$Q(a^1, k_1^1, k_2^1) < Q(a^0, k_1^0, k_2^0)$$

O processo continua até que

$$\frac{\Delta a}{a}, \frac{\Delta k_1}{k_1}, \frac{\Delta k_2}{k_2} \text{ sejam inferiores a uma cota prefixada ;}$$

seja 0.01, por exemplo.

Finalmente, a obtenção dos parâmetros $\hat{a}$, $\hat{k}_1$, $\hat{k}_2$

além de proporcionar a função que melhor se ajusta ao conjunto de pontos, permite estimar $\hat{\sigma}^2$ e simular o processo: prever valores de y para tempos não testados experimentalmente".

Referências bibliográficas

- Bateman, H. 1910. Proc. Cambridge phil.Soc., 15 : 423 (apud Böhm, N. 1965. Cytophotometrische Messungen des DNS- Gehaltes feulgengefärbter Mäuseascites-Tumorzellen in verschiedenen Stadien des Tumorwachstums bei Variation der Hydrolysezeit. Tese de doutotamento. Justus Liebig-Univ., Giessen).
- Böhm, N. und H.-U. Seibert. 1966. Zur Bestimmung der Parameter der Bateman-Funktion bei der Auswertung von Feulgen-Hydrolysekurven. Histochemie, 6 : 260-266.
- Hartley, H.O. 1961. The modified Gauss-Newton Method for the fitting of non-linear regression functions by least squares. Technometrics, 3(2).

* *

*