

Patrícia Martins Casseb - Hassan

‘Efeito do Estresse nos Núcleos das Células
dos Túbulos de Malpighi de Triatomíneos’





Patricia Martins Casseb-Hassan

**“Efeito do estresse nos núcleos das células dos túbulos
de Malpighi de triatomíneos”**

**Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciências
Biológicas, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Genética, do Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas
da Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, UNESP**



812/98

São José do Rio Preto

1997



Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio
Preto da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".
UNESP, com auxílio bolsa da CAPES

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP, com auxílio bolsa da CAPES

Dedico à

Armando e Virgínia, meus pais

Armando e Flávia, meus irmãos

e Maurício, meu esposo.



*"Vida devotada a atividade criadora em ciência é vida feliz.
Nenhum outro modo de vida é igual ou superior em felicidade...
Eu creio que o trabalho científico, juntamente com outras
formas de trabalho criador, é o principal propulsor da evolução
do espírito humano. A evolução do espírito humano dá
significado à evolução humana e à evolução universal."
Th. Dobzhansky (1970)*

Dedico à
Armando e Virgínia, meus pais
Armando e Flávia, meus irmãos
e Maurício, meu esposo.

Agradecimentos

A Professora Doutora Maria Tereza Vilela de Azeredo-Oliveira, orientadora extremamente dedicada a este trabalho, que pelo constante incentivo, entusiasmo, compreensão, apoio e amizade tem contribuído para minha formação científica e pessoal, sou imensamente grata.

A Professora Doutora Hermione Elly Melara de Campos Biouca, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, que através de sua compreensão e colaboração, proporcionou condições para a realização deste trabalho.

*“Vida devotada a atividade criadora em ciência é vida feliz.
Nenhum outro modo de vida é igual ou superior em felicidade...”*

*Eu creio que o trabalho científico, juntamente com outras
formas de trabalho criador, é o principal propulsor da evolução
do espírito humano. A evolução do espírito humano dá
significado à evolução humana e à evolução universal.”*

Th. Dobzhansky(1970)

Ao Professor Doutor James Robert Coleman, do Departamento de Botânica, IBILCE - UNESP, pela valiosa contribuição e disponibilidade na correção do summary.

A todos Professores do Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, que contribuíram para meu desenvolvimento científico.

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira, orientadora extremamente dedicada a este trabalho, que pelo constante incentivo, entusiasmo, compreensão, apoio e amizade, tem contribuído para minha formação científica e pessoal, sou imensamente grata.

À Professora Doutora Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, que através de sua compreensão e colaboração, proporcionou condições para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Mary Massumi Itoyama, pelo incentivo constante, valiosas sugestões e sobretudo pela amizade e companheirismo, dispensados em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Doutores Sebastião Roberto Taboga do Departamento de Biologia, IBILCE, UNESP e Ivanira José Bechara do Departamento de Histologia do Instituto de Biociências, UNICAMP, pela análise detalhada da pró forma, contribuindo com valiosas sugestões.

Ao Professor Doutor James Robert Coleman do Departamento de Botânica, IBILCE, UNESP, pela valiosa contribuição e disponibilidade na correção do summary.

À todos Professores do Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, que contribuíram para meu desenvolvimento científico.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, À Professora Adriana Barbosa Santos do Departamento de Computação e Estatística, IBILCE, UNESP, pela colaboração e dedicação prestada na análise estatística dos dados experimentais desse trabalho.

Às minhas queridas amigas Ana Paula Marques Lima-Oliveira, Ana Regina Chaves e Regina Chaves, AOS funcionários do Departamento de Biologia, em especial a Laura Nascimento Almeida Pinheiro e Rosana Silistino de Souza, pelo auxílio e amizade dispensados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, Sr. João Luís Molina Gil e Sr. Bento Gregório de Jesus, pela atenção e eficiência proporcionados aos pedidos de triatomíneos da espécie *Rhodnius prolixus*, utilizados neste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Biologia Neusa Hissai Murai, Olga Brizotti Pelicer e Simone Carvalho Fernandez, pelos momentos de descontração e amizade no decorrer do curso.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, Nanci Queirós de Assis Pereira e Onilda N. de Oliveira pelo atendimento atencioso dispensado durante todo curso.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, pelo excelente atendimento.

À CAPES, órgão financiador, que proporcionou condições para realização deste trabalho.



À Direção de Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, pela disposição das condições materiais para execução deste trabalho.

1. Introdução

Às minhas queridas amigas Ana Paula Marques Lima-Oliveira, Ana Regina Chinelato, Fátima de Souza, Lígia Márcia da Silveira Viana, Soraia Jardimetti-Gimenez e Valéria Cristina Rufo-Vetorazzi, que mostraram o verdadeiro significado da palavra amizade, proporcionando em cada momento, uma lição de vida

1.5- Estrutura nuclear e Impregnação por ions prata (revisão) 25

Às pessoas especiais da minha vida, Armando e Virgínia, meus pais, Armando e Flávia, meus irmãos e Maurício, meu esposo, que através de suas demonstrações de carinho, apoio e incentivo constante, permitiram que todos os obstáculos fossem vencidos, minha especial gratidão.

2.1- Espécie analisada, obtenção dos insetos e procedência 34

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

2.4- Dissecção dos insetos 37

2.5- Técnicas citológicas 37

2.5.1- Esmagamento e coloração pela orceína lacto-acética 37

2.5.2- Preparo do material para posterior impregnação pela prata 38

2.5.3- Coloração pela CEC 38

2.5.4- CEC no estudo da cromatina 38

2.5.5- CEC no estudo do nucléolo e RNA citoplasmático 39

2.6- Fotomicrografias 40

2.7- Cytometria 40

2.8- Análise estatística 41

ÍNDICE

1. Introdução

1.1- Estrutura e fisiologia dos túbulos de Malpighi.....	2
1.2- Efeito do jejum nas células dos túbulos de Malpighi de Triatomíneos.....	10
1.3- Influência da temperatura na fisiologia celular.....	15
1.4- Basofilia nuclear e Concentração Eletrolítica Crítica (CEC): conceitos básicos.....	18
1.5- Estrutura nucleolar e Impregnação por íons prata (revisão).....	25
1.6-Cariometria.....	31
1.7-Objetivos.....	32

2. Material & método

2.1- Espécie analisada, obtenção dos insetos e procedência.....	34
2.2- Manutenção.....	36
2.3- Estádio analisado, período de jejum e temperatura de estresse.....	36
2.4- Dissecção dos insetos.....	37
2.5-Técnicas citológicas.....	37
2.5 ₁ -Esmagamento e coloração pela orceína lacto-acética.....	37
2.5 ₂ -Preparo do material para posterior impregnação pela prata.....	38
2.5 ₃ -Coloração pela CEC.....	38
2.5 _{3.1} -CEC no estudo da cromatina.....	38
2.5 _{3.2} -CEC no estudo do nucléolo e RNA citoplasmático.....	39
2.6-Fotomicrografias.....	40
2.7-Cariometria.....	40
2.8-Análise estatística.....	41

3. Resultados

3.1-Estresse provocado pelo jejum.....	43
3.1 ₁ -Coloração: Orceína lacto-acética.....	43
3.1 ₂ -Impregnação pelo nitrato de prata.....	51
3.1 ₃ - Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC).....	64
3.1 _{3.1} - Estudo da cromatina.....	64
3.1 _{3.2} - Estudo do nucléolo e RNA citoplasmático (variante da CEC).....	95
3.2-Temperatura como fator de estresse.....	99
3.2 ₁ - Impregnação pelo nitrato de prata.....	99
3.2 ₂ - Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC).....	103

4. Discussão

4.1-Jejum como fator de estresse.....	117
4.1 ₁ -Coloração: Orceína lacto-acética.....	117
4.1 ₂ - Coloração: Impregnação por íons prata.....	122
4.1 ₃ - Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC).....	127
4.1 _{3.1} -Variante da CEC - Nucléolo e RNAs citoplasmáticos.....	130
4.2-Temperatura como fator de estresse.....	132
4.2 ₁ - Coloração: Impregnação por íons prata.....	132
4.2 ₂ - Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC).....	137

5. Conclusões

5.1-Ausência de alimentação.....	140
5.2-Alterações de temperatura (choques hipo e hipertérmicos).....	140

6. Resumo.....	143
----------------	-----

7. Summary.....146

8. Referências Bibliográficas.....149

1. Introdução



destas células presentes na hemolinfa e pela retenção ou reabsorção de substâncias úteis ao organismo (Wigglesworth, 1965).

Os triatomíneos possuem grande importância médico-sanitária por serem transmissores do *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas. Disseminada hoje por grandes extensões do Brasil e de outros países latinos-americanos, a doença de Chagas representa sem dúvida um importantíssimo e grave problema de saúde pública, não somente pelos elevados índices de prevalência como pelos danos que causa à população em termos de morbidade e mortalidade. Acresce ainda considerar que a doença humana apresenta limitações e dificuldades aos tratamentos específicos e sintomáticos, o que se agrava pela precariedade geral da vida dos contingentes humanos mais expostos à infecção. Neste particular, a doença de Chagas situa-se entre as entidades vinculadas ao subdesenvolvimento sócio-cultural e suas causas correlacionando-se estreitamente às péssimas condições de morada, ao subemprego, à falta de terra e de bens de produção. Resta lembrar que a própria doença agrava e ajuda a perpetuar esse panorama ao reduzir e limitar a qualidade de vida de significativa parcela de chagásicos, com repercussões inevitáveis em sua família e seu grupo social.

Além dos aspectos de interesse sanitário básico a respeito desses insetos hematófagos, vários trabalhos na literatura enfocam os efeitos de diferentes tipos de condições ambientais durante o desenvolvimento de algumas espécies de triatomíneos (Dias, 1988; Tavares & Azeredo-Oliveira, 1996).

1.1- Estrutura e fisiologia dos túbulos de Malpighi

Os túbulos de Malpighi são órgãos excretores de insetos e de outros artrópodes terrestres. A função desse sistema excretor é manter no animal um meio interno constante, através da eliminação ou segregação de substâncias

desnecessárias presentes na hemolinfa, e pela retenção ou reabsorção de constituintes úteis ao organismo (Wigglesworth, 1965).

*Algumas alterações comportamentais, fisiológicas e estruturais provocadas pelo jejum e mudanças de temperatura já foram estudadas nos túbulos de Malpighi dos triatomíneos, que possuem características celulares especiais qualificando esses órgãos como excelentes modelos biológicos.

*Os túbulos de Malpighi estão presentes em aproximadamente todos os insetos e possuem um papel importante no sistema excretor onde sua principal função é controlar a excreção de sal e água da hemolinfa. O inseto hematófago *Rhodnius prolixus* Stål, possui quatro túbulos de Malpighi cada um com 4-4,5 cm de comprimento e com diâmetro externo e interno de 90µm e 65µm, respectivamente (McElwain, 1984).

Os túbulos de Malpighi localizam-se na hemocoele, com extremidade proximal usualmente presa à junção entre os intestinos médio e posterior. Os túbulos são capazes de peristalse e podem apresentar alguns movimentos dentro da hemocoele. As extremidades de alguns deles estão em contato com os corpos adiposos e a parede intestinal.

Os túbulos de Malpighi de *Rhodnius* desembocam em uma grande bolsa retal. Como em muitos hemípteros, o reto compreende todo intestino posterior. É um saco piriforme, capaz de considerável distensão. Cada túbulo de Malpighi associa-se ao reto nas regiões superiores e anteriores através de ampolas, que formam uma roseta ao redor da extremidade do intestino médio. Neste ponto os túbulos correm na direção inferior e para trás, terminando na superfície do reto, formando uma massa entrelaçada na região póstero-anterior do abdômen. Dois dos túbulos estão confinados nesta região, sendo que os outros túbulos, um de cada lado formam uma alça que se estende para o lado do "estômago" ou região dilatada do intestino médio (Wigglesworth, 1931a) (Esquema I A).

Quanto a região proximal, as células são muito transparentes. Observa-se, por outro lado, na mesma dessa região um material amarelado,

Segundo Satmary e Bradley (1984), os túbulos de Malpighi de insetos são epitélios tubulares que desembocam na hemocoele e filtram a hemolinfa produzindo a urina primária.

A urina, o produto dos túbulos de Malpighi, está comumente misturada com resíduos do intestino médio, que juntos formam os excrementos dos insetos (Wigglesworth, 1965).

Em todas as espécies de insetos analisadas, os epitélios dos túbulos de Malpighi são compostos por mais de uma "célula tipo". Em algumas espécies os túbulos são separados em regiões morfológicamente distintas, cada região com uma "célula tipo" característica (Satmary & Bradley, 1984).

O hemíptero *Rhodnius prolixus* é um exemplo de espécie em que os túbulos de Malpighi estão divididos em regiões. Cada um dos quatro túbulos consiste de uma região superior e uma região inferior, composta por diferentes "células tipo". As diferentes células, e as diferentes regiões dos túbulos, podem ser distinguidas morfológica e estruturalmente (Wigglesworth & Salpeter, 1962; Bradley, 1983) (Esquema I B).

Dois terços superiores (região distal), são distintamente diferentes em estrutura e função do terço inferior (região proximal), sugerindo que elas possuem funções diferentes (McElwain, 1984).

A porção distal de cada túbulo constitui cerca de dois terços de seu comprimento total, é translúcida e sem cor, ou, às vezes, fracamente amarelada. As suas células apresentam bordo apical estriado, suas microvilosidades são bastante próximas entre si, não tendo uma separação maior do que 150 a 200 Å. Este é o mesmo grau de separação que existe entre as membranas plasmáticas de células contíguas ou entre as duas membranas do envoltório nuclear. As células dessa região exibem no citoplasma grande quantidade de "concreções" laminares (glóbulos mineralizados), e mitocôndrias especialmente concentradas na parte apical celular (Mello & Vidal, 1980) (Esquema II A).

Quanto à região proximal, as células são quase transparentes. Observa-se, por outro lado, no lúme dessa região um material amarelado,

composto de esferulitos de ácido úrico (Mello & Vidal, 1980), nunca presentes na região distal. O bordo apical das células proximais apresenta-se em forma de escova ("brush border") onde as microvilosidades são separadas por espaço equivalente ao seu próprio diâmetro. Nestas células não ocorrem "concreções" laminares e as mitocôndrias concentram-se na porção celular basal (Wigglesworth & Salpeter, 1962; Mello, 1971; Mello & Dolder, 1977 e 1980, Dolder & Mello, 1979) (Esquema II B).

O inseto hematófago, *Rhodnius prolixus*, ingere em cada alimentação um volume de sangue igual a dez vezes o peso de seu corpo (Buxton, 1930). Imediatamente após a alimentação, é produzida uma urina rica em sódio em alta quantidade devido a ação de dois hormônios diuréticos, 5-HT e um peptídeo (DH), cuja liberação é estimulada pela alimentação (Maddrell *et al*, 1993). Durante constante diurese, o fluido é transportado do intestino médio para a hemolinfa, pelo qual é removido pela atividade dos quatro túbulos de Malpighi.

Baseando-se em experimentos fisiológicos realizados por Wigglesworth (1931 b, 1965), sabe-se que a porção distal dos túbulos de Malpighi desses reduviideos está envolvida na eliminação de potássio e água, enquanto a região proximal reabsorve potássio. Wigglesworth demonstrou que o fluido presente no lúme da porção distal é fracamente alcalino, enquanto que o da porção proximal é distintamente ácido. Ácido úrico seria eliminado pela porção distal e cristalizado no lúme da porção proximal sob a forma de esferulitos (Azeredo-Oliveira, 1982).

Em relação aos fenótipos nucleares das células dos túbulos de Malpighi dos insetos hematófagos, *Triatoma infestans* Klug e *Rhodnius prolixus* Stål diferem quando comparados uns com os outros (Mello & Lima, 1978). Entretanto, muitas características estruturais tem sido observadas em todas as células mencionadas (Wigglesworth & Salpeter, 1962; Mello & Dolder, 1977).

Vários padrões nucleares de heterocromatinização tem sido relatados nos túbulos de Malpighi do hemíptero *Triatoma infestans* Klug (Mello 1971, 1975, 1976 a,b). A morfologia nuclear e as propriedades citoquímicas

diferem quando compara-se o segmento distal com o segmento proximal dos túbulos de Malpighi.

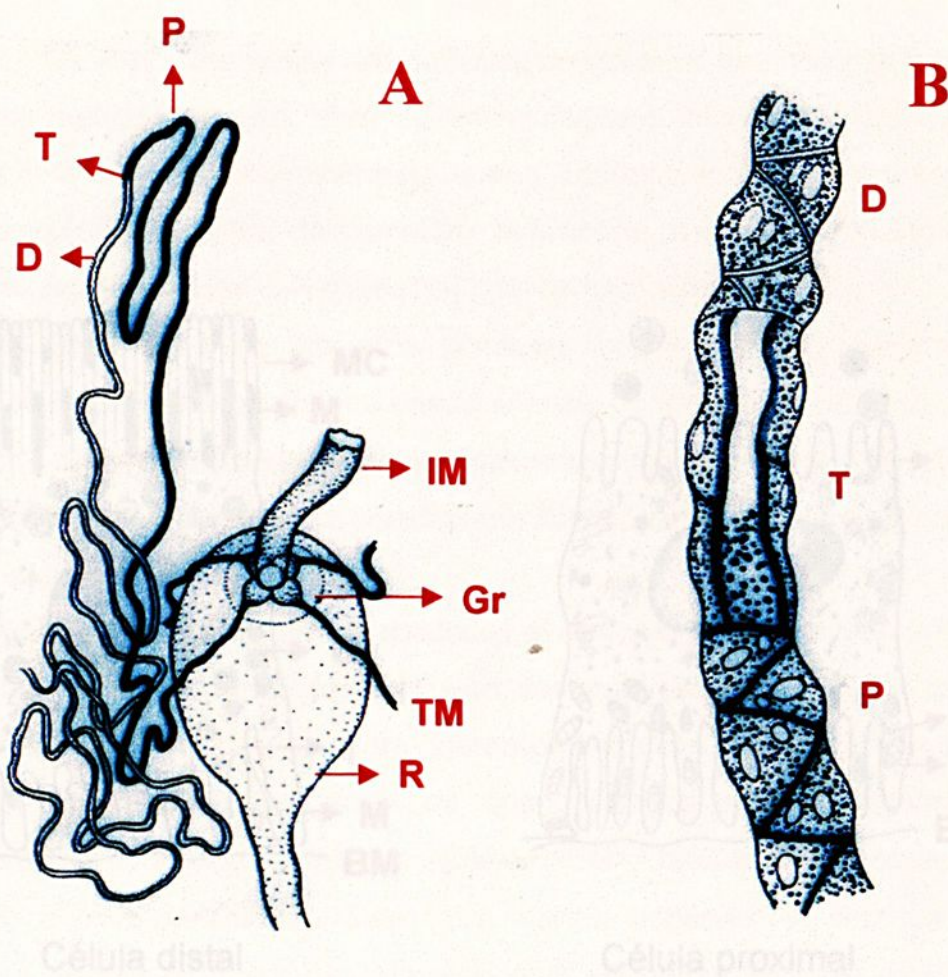
Núcleos altamente poliplóides estão presentes nos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug (Mello, 1971). As quantidades de DNA dos núcleos das células proximais e distais dos túbulos de Malpighi são praticamente as mesmas em ninfas do 5º estágio (Mello, 1971, 1975, 1976 a,b). Entretanto, nesses insetos, os núcleos das células proximais exibem uma quantidade maior de corpos heterocromáticos, enquanto vários cromocentros pequenos são encontrados nos núcleos dos segmentos distais. Os núcleos também diferem em características citoquímicas, tais como fenômenos anisotrópicos e resistência à hidrólise ácida (Mello, 1976 a). Além disso, pesquisas revelam algumas diferenças na associação nucléolo-heterocromatina a nível estrutural. Estas características nucleares sugerem diferentes funções nucleares que estão relacionadas às atividades citoplasmáticas das duas regiões (distal e proximal). Estes achados diferenciais são encontrados também em *Rhodnius prolixus* (Wigglesworth & Salpeter, 1962), os quais apresentam cromatina com características do *Triatoma infestans* (Schreiber et al., 1972, Mello & Lima, 1977). Pode ser assumido que a diversificação nos padrões de composição cromatínica e organização como ocorre em *Triatoma infestans*, ocorreu como uma evolução seletiva que envolveu células com a capacidade de realizar atividades fisiológicas normais.

Também em *Panstrongylus megistus*, foram encontradas diferenças citoplasmáticas ultraestruturais entre as células distais e proximais dos túbulos de Malpighi assemelhando-se aos triatomíneos já mencionados: *Rhodnius prolixus* Stål (Wigglesworth & Salpeter, 1962) e *Triatoma infestans* Klug (Mello & Dolder, 1977). São estas: 1-"Concreções" laminares presentes exclusivamente nas células distais; 2-Elementos da borda estriada agrupados nas células distais e separados nas células proximais; 3-Mitocôndrias extensivamente concentradas na região apical das células distais e na zona basal das células proximais. Em adição, cristais de urato são encontrados somente no lúme da região proximal dos túbulos de Malpighi nas três espécies mencionadas acima. As características

morfológicas das regiões distais e proximais dos túbulos de Malpighi dos insetos sugadores de sangue, são relatadas em suas funções específicas (Wigglesworth, 1931a).

As características ultraestruturais do citoplasma das células proximais e distais dos túbulos de Malpighi de insetos hematófagos não devem estar diretamente relacionadas com seus respectivos fenótipos nucleares, que geralmente diferem quando comparados com células tipo dentro da mesma espécie e entre várias espécies como segue: As células distais de *Triatoma infestans* em ninfas tardias e adultos tem várias massas heterocromáticas, enquanto que as células proximais exibem um grande cromocentro (Mello, 1971 e 1975). Em *P. megistus* as células proximais contêm um pequeno cromocentro, enquanto que as células distais aparecem isentas de corpos heterocromáticos (Mello, 1975; Mello & Raymundo, 1978), bem como todas as células ao longo dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (Mello & Lima, 1978). Não somente a morfologia e distribuição destes cromocentros são diferentes, mas também suas propriedades citoquímicas e associação com nucléolo (Mello, 1979).

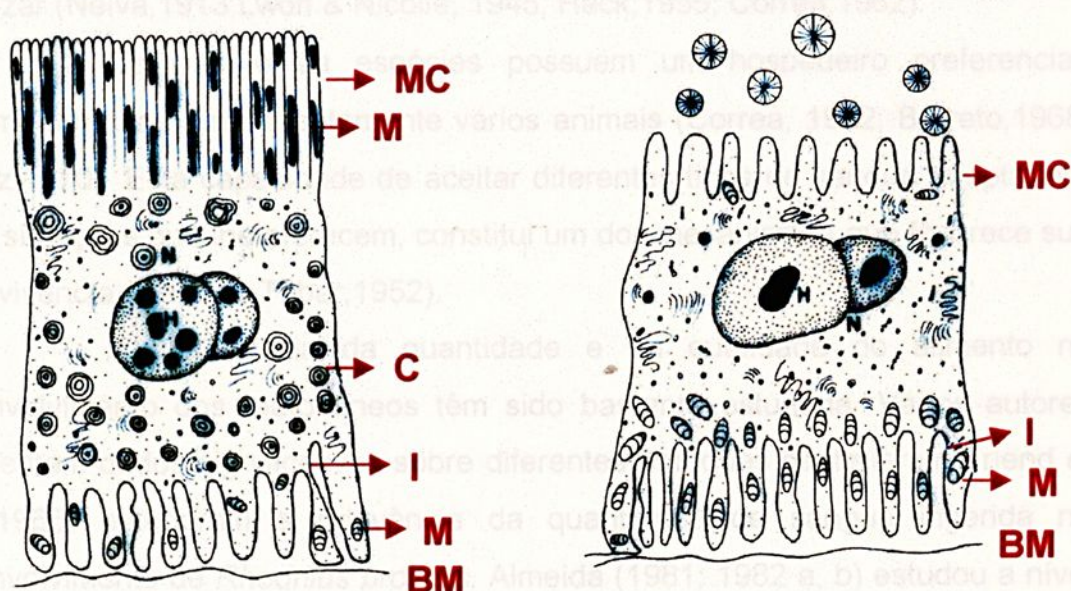
Esquema I-A,B. Sistema excretor de *Triatoma*. A - visão geral do sistema apresentando somente um túbulo em maior extensão. B - detalhe dos segmentos proximal (P) e distal (D) e região de transição (T) visto em corte longitudinal. IM=Intestino Médio; Gr=Glândula retal; TM=Túbulos de Malpighi; R=Recto.



Esquema I-A,B: Sistema excretor de Triatomíneo. A - visão geral do sistema apresentando somente um túbulo em maior extensão; B- detalhe dos segmentos proximal (P) e distal (D) e região de transição (T) visto em corte longitudinal. IM=Intestino Médio; Gr=Glândula retal; TM=Túbulos de Malpighi; R=Reto.

1.2 - Efeito do jejum nas células dos túbulos de Malpighi de Triatomíneos

Os triatomíneos são hematófagos obrigatórios em todas as fases do seu ciclo de desenvolvimento, sendo o hematofagismo imprescindível para que haja muda. Alguns autores mostraram que o *Triatoma infestans* necessita de sangue como fonte exógena de hematina, substância que ele não é capaz de sintetizar (Neiva 1913; Wolf & Nicolle, 1945; Hack 1955; Cordeiro 1962).



Célula distal

Célula proximal

Esquema II-A,B: Células representativas das regiões distal (A) e proximal (B) de túbulos de Malpighi. MC= Microvilosidades; M=Mitocôndrias; I=Invaginação da membrana plasmática do pólo basal; BM = Membrana Basal; C=Concreções; H= Heterocromatina; N=Núcleo; U=Cristal de Urato. (conforme Azeredo-Oliveira, 1982).

1.2 - Efeito do jejum nas células dos túbulos de Malpighi de Triatomíneos

Os triatomíneos são hematófagos obrigatórios em todas as fases do seu ciclo de desenvolvimento, sendo o hematofagismo imprescindível para que haja muda. Alguns autores mostraram que o *Triatoma infestans* necessita de sangue como fonte exógena de hematina, substância que ele não é capaz de sintetizar (Neiva, 1913; Lwoff & Nicolle, 1945; Hack, 1955; Corrêa, 1962).

Geralmente as espécies possuem um hospedeiro preferencial. Sugam, entretanto, indiferentemente vários animais (Correa, 1962; Barreto, 1968; Juarez, 1970). Esta capacidade de aceitar diferentes tipos de sangue adaptando-se às situações que lhe oferecem, constitui um dos mecanismos que favorece sua sobrevivência (Gajardo-Tobar, 1952).

A importância da quantidade e da qualidade do alimento no desenvolvimento dos triatomíneos têm sido bastante estudada. Vários autores apresentam dados significativos sobre diferentes enfoques deste tema. Friend *et al.*, (1965) estudaram a relevância da quantidade de sangue ingerida no desenvolvimento de *Rhodnius prolixus*. Almeida (1981; 1982 a, b) estudou a nível enzimático, a importância da dieta para várias espécies de triatomíneos. Rodrigues e Rabinovich (1980) trabalhando com *Rhodnius prolixus*, mostraram que o efeito da densidade populacional, não é significativo quando os insetos sugam amplamente. Schofield (1982) estudou o papel do sangue ingerido como regulador da densidade populacional de *Triatoma infestans* e mostrou que quando o sangue ingerido é restrito, o período do desenvolvimento ninfal aumenta e a fecundidade diminui.

Ninfas de *Rhodnius prolixus* de 5º estágio, ingerem sangue de mamíferos aproximadamente nove vezes o peso de seu corpo, em uma única vez (Friend *et al.*, 1965). Na diurese, um potente hormônio diurético causa um aumento de 100 vezes na taxa de secreção dos túbulos de Malpighi (Maddrell,

1962, 1963), desse modo, o inseto elimina em torno de 40 a 50% do seu peso na urina (Maddrel, 1964).

Entretanto, apesar de sugarem com voracidade quando dispõem de alimento fácil, os triatomíneos podem resistir aos prolongados jejuns.

De modo geral, a resistência ao jejum varia de espécie para espécie e dentro de uma espécie, de indivíduo para indivíduo e de um estágio a outro do ciclo evolutivo. Os últimos estádios ninfais são geralmente os mais resistentes, sendo a resistência dos adultos semelhante às ninfas de 3° e 4° estágio. A sobrevivência ao jejum é inversamente proporcional à temperatura (Costa *et al.*, 1973).

Sabe-se que a resistência aos prolongados jejuns em relação à difusão da doença de Chagas, é de grande importância epidemiológica (Pellegrino, 1952).

Desde que os trabalhos de combate aos vetores foram iniciados por meio de inseticidas de ação residual, um dos entraves para o sucesso tem sido a capacidade de resistência ao jejum que estes insetos apresentam possibilitando a repopulação tão logo acabe o efeito do inseticida (Dias, 1965; Perlowagora-Szumlewicz, 1954, 1969).

Quando se empregam inseticidas de efeito residual, os sobreviventes são obrigados a permanecerem em seus esconderijos devido ao poder repelente do inseticida. Assim, por causa da grande resistência dos triatomíneos ao jejum, sobrevive uma pequena parcela desses animais. Uma vez dissipado o inseticida, os poucos animais remanescentes são capazes de repopular a área tratada (Perlowagora-Szumlewicz, 1954).

Da observação em microscopia de luz, sabe-se que as células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*, são binucleadas. Os túbulos contêm um constante número de células apesar destes serem muito maior no adulto do que no primeiro estágio. As células dos túbulos crescem sem divisão e, aumentam o tamanho dos núcleos, sendo provável que seu conteúdo de DNA aumente, por endomitose. Tais hipertrofias celulares são freqüentemente



encontradas nos insetos (Pearson, 1974). Em larvas de dípteros, estão associadas com politenia, enquanto que nos hemípteros ocorre mais comumente a endomitose. Em insetos submetidos ao jejum, é comum observar a presença de núcleos poliplóides.

Em vários tipos de estresse aos quais *T. infestans* foi submetido (íons, mercúrio, jejum, toxinas e fungos), o jejum parece ser o único que induz a fusão nuclear *in vivo*, possivelmente porque esse fenômeno requer uma maior ação estressante para ser concluído (Mello, 1989).

Os túbulos de Malpighi de espécimes de *P. megistus* alimentados, desenvolvem células epiteliais binucleadas. Seus núcleos geralmente exibem uma pequena massa heterocromática (Wigglesworth, 1967). Intensa heteropiconose da heterocromatina desenvolve em alguns núcleos fusionados, o que é provavelmente uma necrose nuclear e induz à morte celular (Mello & Raymundo, 1980).

O alto grau de ploidia têm sido citofotometricamente demonstrado no núcleo de células epiteliais dos túbulos de Malpighi desses insetos sugadores de sangue. O conteúdo de DNA desses núcleos aumenta com o desenvolvimento ninfal, cessando no 5º estágio ninfal. Em células do corpo gorduroso de *Rhodnius* sp, entretanto, o alto grau de ploidia aparece induzido pela fusão nuclear, quando estes insetos tenham-se desenvolvido sob condições de jejum (Mello, 1971, 1975).

Embora fusão nuclear também tem sido observada no jejum em *Triatoma infestans* (Mello, 1983), dados quantitativos deste fenômeno são ainda desconhecidos. Em espécies mal-alimentadas, o número de núcleos de um órgão total, que apresenta alto grau de ploidia, como no caso dos túbulos de Malpighi, não tem sido determinado no decorrer do desenvolvimento, nem o efeito da fusão nuclear é considerado poliploidia. Entretanto, possíveis mudanças no fenótipo nuclear, definido em termos do número de cromocentros e estágio de empacotamento, tem sido estudadas em espécies de *Triatoma infestans* submetidas ao jejum.

Os núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, contém um ou vários cromocentros (Mello, 1971), que aparecem rodeados por um halo de material nucleolar (Azeredo-Oliveira & Mello, 1986; Mello & Recco-Pimentel, 1987). Foi encontrado microscopicamente que sobre condições de estresse provocado pelo jejum ou radiação gama, os cromocentros de parte das células dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* são estruturalmente afetados (Mello, 1983; Krubusly, 1984; Andrade & Mello, 1987; Álvares-Garcia, 1988). Análise de imagens tem permitido assumir que após um longo período de jejum a supra-organização da cromatina destes cromocentros é alterada (Mello, 1989). Entretanto, a microscopia eletrônica demonstra características que devem estar associadas com mudanças na fisiologia nuclear devido ao estresse. De fato, dados da microscopia eletrônica revelam que cromocentros e nucléolos estão ausentes em várias condições fisiológicas (Mello *et al.*, 1990).

Os túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* do 5º estágio, exibem células com núcleos com vários cromocentros (Mello, 1971), que apresentam heterocromatina constitutiva (Mello & Recco-Pimentel, 1987). Suspeita-se que devido ao jejum, alguns desses cromocentros aumentam seus volumes, superando a área esperada, através da fusão dos cromocentros (núcleos fusionados). No entanto, mudanças no conteúdo de DNA ou no estado de empacotamento da cromatina, dificultam a demonstração destes cromocentros em condições de jejum.

A aparência dos grânulos pericromáticos na superfície do cromocentro não associado com componentes nucleolares na maioria dos núcleos das ninfas de *T. infestans* em jejum, e o subsequente desaparecimento destes grânulos nos insetos mal alimentados seguindo o jejum, são indicativos de que eles representam a resposta ao estresse do jejum (Mello *et al.*, 1990).

Existem alguns relatos sobre nutrientes que possam afetar a estrutura da cromatina. Estas alterações podem estar relacionadas com

1.3 - Influência da temperatura na fisiologia celular

Quando ocorre um súbito aumento na temperatura, todas as células desde a bactéria mais simples até o neurônio mais altamente diferenciado, aumentam a produção de uma certa classe de moléculas que as protegem dos danos. Foi observado o fenômeno pela primeira vez há trinta anos atrás, e chamaram-no de resposta ao "choque de calor" ("heat shock response"). Estudos subseqüentes revelaram que a mesma resposta ocorre quando as células são submetidas a uma ampla variedade de alterações ambientais, incluindo metais tóxicos, álcoois e muitos venenos metabólicos. Devido ao fato de que muitos diferentes estímulos promovem o mesmo tipo de mecanismo de defesa celular, os pesquisadores referem-se comumente a ele como "resposta ao estresse" e as moléculas expressas neste fenômeno como "**proteínas de estresse**" (Welch, 1993).

Na procura pelo entendimento da estrutura e das funções das "**proteínas de estresse**", tem-se aprendido que são muito mais do que apenas moléculas defensivas. Através da vida de uma célula, muitas dessas proteínas participam de processos metabólicos essenciais, incluindo as etapas pelas quais todas as outras proteínas celulares são sintetizadas e agrupadas. Algumas proteínas de estresse parecem orquestrar as atividades das moléculas que regulam o crescimento celular e a diferenciação (Welch, 1993).

O acúmulo de evidências confirmou que as "**proteínas de estresse**" podem desempenhar um papel ativo na defesa celular. Foram identificados e isolados os genes que codificam para as proteínas de estresse individuais. Mutações nestes genes produzem interessantes anormalidades celulares. Por exemplo, bactérias que portam mutações nos genes que codificam muitas das proteínas de estresse, exibem defeitos na síntese de DNA e RNA, perdem sua habilidade de sofrer divisão celular normal e parecem incapazes de degradar proteínas apropriadamente. Tais mutantes foram incapazes de crescer em temperaturas mais elevadas (Welch, 1993).

A resposta ao estresse desempenha também um importante papel na habilidade das células animais em fazer frente as breves exposições as altas temperaturas. Células animais que recebem um choque de calor brando, o suficiente para aumentar níveis de **"proteínas de estresse"**, são melhor protegidas contra um segundo choque térmico que de outra forma poderia ser letal. Essas células termotolerantes são também menos susceptíveis a outros agentes tóxicos, indicando que a resposta ao estresse de alguma forma, protege a célula contra várias injúrias ambientais.

As **"proteínas de estresse"** (hsp 70), são produzidas em células submetidas após o choque térmico, desempenhando um papel essencial na defesa da célula contra o estresse, mas algumas delas podem ser sintetizadas constitutivamente, ou seja, em condições fisiológicas normais (Atkinson & Walden, 1985). Usando sondas moleculares, os pesquisadores, compreenderam que após um choque de calor, muitas proteínas desse grupo (hsp 70) acumula-se dentro do nucléolo. Tal localização para essas proteínas hsp 70 foi intrigante: estudos prévios haviam demonstrado que após o choque de calor, as células param de produzir ribossomos, e seus nucléolos tornam-se cheios de partículas de ribossomos desnaturadas. Foi sugerido que essas proteínas hsp 70 poderiam de alguma forma, reconhecer outras proteínas intracelulares desnaturadas e restaurar o seu dobramento correto e sua forma biologicamente ativa (Pelham, 1986 *apud* Welch, 1993).

Muitos dos genes que codificam para **"proteínas de estresse"** são notavelmente similares em todos os organismos e muitas **"proteínas de estresse"** são também expressas em muitas células normais e não estressadas e não apenas nas traumatizadas. Conseqüentemente, as **"proteínas de estresse"** foram subdivididas em dois grupos: as constitutivamente expressas sob condições normais de crescimento e aquelas induzidas somente em células que sofrem estresse.

Uma vez estabelecido um papel para algumas **"proteínas de estresse"** como associadas a nível molecular nas células saudáveis e não

estressadas, chaperonas, os investigadores tem voltado sua atenção para a determinação de porque essas proteínas são expressas em níveis mais altos em células sob estresse. Um indício vem das condições que aumentam a expressão das **"proteínas de estresse"**. Temperaturas que são suficientes para ativar a resposta ao estresse podem eventualmente desnaturar algumas proteínas dentro das células (Welch, 1993).

O efeito da temperatura ambiental em insetos é observado em diferentes processos fisiológicos. Entretanto, a preferência de certas temperaturas ambientais é o resultado da relação entre muitos parâmetros fisiológicos e adaptação às certas condições ecológicas (Lazzari, 1991).

Embora, o papel da temperatura em insetos hemípteros tenha sido discutido por vários autores (Hocking, 1971; Friend & Smith, 1977), a resposta comportamental sobre ambientes com diferentes temperaturas, tem recebido pouca atenção.

Em insetos hematófagos, a temperatura possui um papel importante na capacidade vetorial (Wood, 1976). Modificações na dinâmica populacional de *Triatoma infestans* ocorre como resultado de mudanças de temperatura. As taxas de oviposição e muda são altamente favorecidas na primavera e verão (Gorla & Schofield, 1985).

A temperatura possui influência básica na duração do ciclo evolutivo. O efeito favorável de temperaturas mais elevadas na redução do desenvolvimento, em determinadas espécies de insetos, foi observado por Neiva (1913), Perlowagora-Szumlevicz (1953), Bursell (1964), Zeledón *et al.* (1970) Wigglesworth (1972), Silva (1985, 1988a) e Silva & Silva (1988 b, c, d). Esse efeito foi bastante evidente no desenvolvimento de *Rhodnius nasutus*, em todas as fases do ciclo evolutivo, como também no consumo das reservas nutritivas, causando, conseqüentemente, uma redução na sobrevivência ao jejum absoluto. Da temperatura de 25°C para 30°C, houve redução de 22% no ciclo evolutivo, passando de duas para três gerações por ano. Fato este que possibilita uma reinfestação mais rápida e dificulta as ações de controle (Silva, 1989).

apropriadas A velocidade de digestão do sangue pode ser modificada por vários fatores ambientais, principalmente temperatura (Prasad, 1987). Foi demonstrado que modificações na quantidade de sangue ingerido e na taxa de consumo, afetam o potencial reprodutivo de *Triatoma infestans* (Giojalas & Montenegro, 1986; Montenegro, 1989; Giojalas, 1991). Também, deve modificar a frequência de alimentação, com conseqüente efeito na transmissão parasitária (Catalá, 1991).

basofilia da Ninfas de 4º estágio de *Triatoma infestans* Klug, quando submetidas a choque de temperatura, sofrem alterações nucleares nas células dos túbulos de Malpighi (Dantas & Mello, 1992). Essas alterações se processam a curto e a longo prazo e compreendem mudanças na supra-organização cromatínica, fusão de núcleos e aparecimento de diversos níveis de degeneração em parte da população nuclear (Dantas & Mello, 1992). Efeitos semelhantes foram previamente detectados em espécimes submetidos a outros tipos de estresse, como o jejum prolongado (Amaral & Mello, 1989) e ação de metais pesados (Kubrusly, 1984; Mello, 1989).

absorção de Segundo Rodrigues *et al.*, (1991), entendendo os tipos de respostas celulares aos choques de temperatura, seria necessário conhecer se esses efeitos poderiam comprometer a sobrevivência dos insetos a esse tipo de estresse. Dessa forma, tal conhecimento permitiria avaliar melhor a biologia do inseto.

O conceito de concentração crítica de eletrólitos (CEC) e sua aplicação na coloração de substratos polieletrólitos foi desenvolvido por Scott em 1960. Vários polianions da matriz extracelular foram estudados e caracterizados bioquimicamente e eletroquimicamente usando o método de CEC (Vidal & Mello, 1989).

1.4 -Basofilia nuclear e Concentração Eletrolítica Crítica (CEC): conceitos básicos

Dependendo A basofilia metacromática exibida pela cromatina corada com a solução de Azul de Toluidina em pH 4.0, é devida à ligação de moléculas

apropriadas de grupos fosfatos do DNA ou RNA ligados às proteínas do grupo amino (Davison & Butler, 1956; Miura & Ohba, 1967; Itzhaki, 1971). A metacromasia, no caso da coloração com Azul de Toluidina, é caracterizada por uma substituição do pico de absorção espectral, originalmente posicionado em $\lambda=632$ nm, para comprimentos de ondas menores (hipsocromismo) e simultâneo hipocromismo em $\lambda \cong 632$ nm (Bergeron & Singer, 1958; Lison, 1960; Miura & Ohba, 1967; Toepfer, 1970). As características microespectrofotométricas da basofilia da coloração da cromatina pelo Azul de Toluidina estão relacionadas com os níveis de atração e proximidade das moléculas do corante ligadas ao substrato (Davison & Butler, 1956; Miura & Ohba, 1967). Conseqüentemente, diferenças na localização e absorção dos picos na curva de basofilia são esperadas em complexos DNA-proteínas. De fato, isto foi demonstrado na cromatina de gafanhoto e rato durante a espermatogênese, quando histonas somáticas são substituídas por uma proteína rica em arginina (Lison, 1955; Mello & Vidal, 1977; Vidal *et al.*, 1978) e em diferentes zonas de cromossomos politênicos em dípteros (Vidal, 1975). Em adição, é esperado que as curvas de absorção de basofilia da eucromatina e heterocromatina constitutiva também devem diferir *in situ*, assumindo que certas frações de heterocromatina diferem na composição e interações de nucleoproteínas quando comparadas com eucromatina (Comings, 1972; Mello, 1978b).

O conceito da concentração crítica de eletrólitos (CEC) e sua aplicação na coloração de substratos polieletrólíticos foi desenvolvido por Scott em 1960. Vários poliânions da matriz extracelular foram estudados e caracterizados bioquimicamente e topoquimicamente usando o método de CEC (Vidal & Mello, 1989).

Se a uma solução de corante catiônico forem adicionados cátions (por exemplo Mg^{2+}), ocorrerá competição entre estes últimos e o dipolo do corante de carga semelhante pelas cargas negativas do substrato poli-aniônico. Dependendo do tipo e força de carga dos cátions envolvidos na competição e nas afinidades iônicas do poliânion, a coloração do substrato poderá ser abolida

numa certa concentração do cátion, conseqüentemente, os sítios de ligação disponíveis do substrato deverão ligar-se aos cátions (Amaral & Mello, 1989).

O princípio desta reação e sua aplicação, desenvolvidos por Scott (1960) destinaram-se ao estudo de glicosaminoglicanos ácidos (GAGA), sendo neste caso utilizado principalmente o Azul de Alcian como corante catiônico e o Mg^{2+} como cátion competidor (Amaral & Mello, 1989).

Oito membros do grupo dos aminoglicanos são quimicamente bem caracterizados (Scott, 1960), isto é, são carregados negativamente devido a presença de grupos sulfato ésteres e/ou grupos carboxilas. Em conseqüência, ligam-se e são precipitados por corantes catiônicos. Esta reação físico-química é a base de todo método histoquímico. Alguma especificidade pôde ser introduzida pela combinação do corante com um ou mais membros do grupo. Metilação, acetilação, desulfatação e manipulação de pH são usados para distinguir entre polissulfatos e policarboxilatos (Quintarelli *et al.*, 1964).

Vidal & Mello (1987) propuseram que o princípio da CEC pudesse ser utilizado para o estudo da cromatina, mas empregando-se neste caso o corante azul de toluidina (AT). O uso extensivo do azul de toluidina (AT) em pesquisas de natureza topoquímica e anisotrópica de DNA justificou sua escolha. Neste caso, a CEC foi considerada como sendo o valor de concentração de Mg^{2+} no qual a metacromasia aparecia completamente abolida, ou seja, o material cromatínico aparecia corado em verde. Esta coloração seria também proporcionada por outro mecanismo de interação de moléculas do Azul de Toluidina com o DNA, ou seja, intercalação de moléculas do corante no interior da molécula deste ácido nucléico (Miura & Ohba, 1967).

As moléculas do corante catiônico e os cátions inorgânicos competem pelas cargas negativas dos fosfatos livres do DNA não ligados às proteínas. Quando se utilizam soluções de AT na ausência de Mg^{2+} ou com concentrações de Mg^{2+} inferiores aquela requerida para o ponto de CEC, o DNA cora-se em violeta (metacromasia). Com a utilização de uma concentração de Mg^{2+} correspondente ao valor de CEC, a metacromasia do DNA será totalmente

abolida e a cor exibida será verde. Inicialmente tal determinação foi efetuada por método microespectrofotométrico, associando-se a cor encontrada ao pico de absorção da respectiva curva espectral de absorção. No entanto, a determinação microespectrofotométrica pôde ser substituída por observação visual, uma vez que a coloração verde corresponde ao ponto de CEC (Vidal & Mello, 1989).

Grande parte dos estudos de basofilia nuclear destinados a levantar conhecimentos sobre os níveis de complexação DNA-proteína na cromatina, e até mesmo o estado de conformação do DNA e da cromatina tem se baseado na utilização do Azul de Toluidina (AT), um corante catiônico tiazínico planar, empregado em diferentes pHs na detecção de ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos ácidos e proteínas. Além disso, é uma molécula com excelentes propriedades anisotrópicas, especialmente dicroísmo linear, o que torna esse corante indicado para estudos de ordem molecular (Amaral & Mello, 1989).

A basofilia é devida à ligação eletrostática de moléculas aniônicas de um substrato. Admite-se que a basofilia nuclear quando da utilização do Azul de Toluidina em pH 3,0-4,0, seja devida à presença de ácidos nucleicos (Lison & Mutsaers, 1950; Lison, 1960) e se dá pela ligação eletrostática dos grupos catiônicos do corante e grupos aniônicos do substrato, ou seja, os grupos fosfatos de DNA e RNA (Lison, 1960; Vidal, 1979).

Cabe lembrar que o empilhamento das moléculas de azul de toluidina depende da disponibilidade de grupamentos aniônicos no DNA, e que devido a geometria planar da molécula corante, quanto maior for a proximidade e empilhamento destas moléculas, maior será a interação de seus elétrons π , provocando a metacromasia. Quando na abolição desta, a cor verde observada (CEC) é devida a intercalação das bases da dupla hélice do DNA (Mello, 1976; Vidal & Mello, 1987).

As características da influência do corante AT nos padrões de empacotamento da cromatina e na absorção espectral nos núcleos ainda não estão claras. No trabalho clássico de Sylvén (1954), ficou estabelecido que

formas monoméricas do corante absorvem luz vermelha, enquanto formas poliméricas absorvem no espectro azul. É extensivamente aceito que produzindo juntas reações, o substrato resulta na polimerização do corante e apresenta mudança para direita do espectro, exibindo uma coloração metacromática. As formas da condensação cromatínica influenciam na formação do espectro do corante AT (Erenpreisa *et al.*, 1992).

O fenômeno de metacromasia acha-se intimamente ligado ao grau de empilhamento das moléculas do corante e proximidade entre elas. Quanto mais próximas as moléculas do corante estiverem entre si, e maior for seu empilhamento, maior será a interação de seus elétrons, conseqüentemente sendo maior o deslocamento de seu máximo de absorção para comprimentos de ondas mais curtas (efeito hipsocrômico) (Mello, 1976; Vidal & Mello, 1987). O fenômeno metacromático pode ser diferencialmente obtido, em tecidos diversos, variando-se o pH da solução diluente do Azul de Toluidina.

Prévios estudos de ligação de corantes em desoxirribonucleoproteínas, indicam que mais de 50 % de fosfatos estão livres (Klein & Szirmai, 1963; Miura & Ohba, 1967), isto é visto como uma quantidade equilibrada de fosfatos e grupos de histonas no DNA.

É geralmente assumido que na cromatina, as proteínas devem estar ausentes ou dissociadas do DNA em certos sítios de transcrição.

Sabe-se que complexos DNA-H₁ e DNA-polilisina possuem graus menores de agregação que complexos DNA-protaminas. Este fato leva a diferença na disponibilidade dos fosfatos, causando as referidas diferenças nas respostas. Assim, complexos DNA-proteínas que proporcionem um maior grau de compactação (como por exemplo DNA-protamina, *in situ* e *in vitro*), que são moléculas policatiônicas e pequenas, mas com alto poder de agregação dos sítios aniônicos do DNA, possuem menor disponibilidade de sítios aniônicos livres e conseqüentemente menor valor de CEC, ou até, ausência do mesmo, onde a coloração verde é observada já no controle, devido a intercalação das moléculas do corante (Falco *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994)



Taboga *et al.*, (1996), observou que nos complexos DNA-polilisina, onde se esperava a coloração azul/violeta, a resposta encontrada foi verde. Esta pode ser devida, a alta concentração destas proteínas em relação ao DNA *in vitro*, (pois a proporção 1:1 é relativa). Alto valor de CEC observado neste estudo foi achado em filamentos de DNA puro e valores menores em complexos DNA/protaminas. Certamente, o número e proximidade dos grupos fosfatos associados com corante catiônico (e cátion inorgânico) tem um importante significado nestes resultados, uma vez que eles definem a metacromasia bem como suas mudanças (Vidal & Mello, 1989).

É conhecido que protaminas estão mais associadas ao DNA do que as histonas. Conseqüentemente, menos fosfatos devem estar associados com a ligação eletrostática dos complexos DNA/protaminas, permitindo então que a CEC seja atingida com valores de Mg^{2+} mais baixos. Isto deve explicar a estabilidade do complexo DNA/protamina em concentrações maiores de Mg^{2+} do que nos complexos DNA/ H_1 . O mesmo fenômeno deve explicar a dispersão normal da birrefringência observada nos complexos DNA/protaminas tratados com AT na ausência de íons Mg^{2+} , enquanto DNA e complexos DNA/ H_1 exibem dispersão anômala da birrefringência após coloração com soluções contendo baixas concentrações de íons Mg^{2+} (Vidal & Mello, 1989).

Clupeína é uma proteína extremamente básica que atua no empacotamento do DNA e apresenta forma bioquimicamente inerte na cromatina. Esta proteína está presente em espermatozóides de salmão, tem grande afinidade pela dupla hélice dos ácidos nucleicos (Warrant & Kim, 1978). Foi demonstrado que a clupeína pode experimentalmente ligar-se na maioria das regiões dos cromossomos politênicos, retardando a metacromasia usual e ao mesmo tempo, aumentando sua birrefringência (Vidal, 1979). Por outro lado, certas regiões cromossômicas tais como pufe de RNA e organizadores nucleolares não se ligam a clupeína, exibindo metacromasia e uma fraca ou virtualmente não existente anisotropia (Vidal, 1979). É esperado que a clupeína deve se ligar

diferencialmente na heterocromatina e eucromatina, levando os diferentes níveis de afinidade pelas moléculas do Azul de Toluidina.

Considerando as características estruturais e funcionais do cromocentro de *Triatoma infestans* (Mello, 1971, 1979, 1980, 1983; Vidal & Pimentel, 1980), e a habilidade da clupeína em se ligar à dupla hélice do DNA (Warrant & Kim, 1978), é assumido que esta tem uma grande oportunidade para se ligar na maior parte em heterocromatina do que na eucromatina. Isto resultou em condições de que moléculas de azul de toluidina ligam-se aos fosfatos da heterocromatina, abolindo a metacromasia.

A metacromasia detectada na eucromatina após o tratamento com clupeína é sustentada não somente pelo alto nível de atividade transcricional, mas também pelo estado supra-organizado que deve permitir uma especial ligação de moléculas de clupeína nestas estruturas. Obviamente, a eucromatina não está isenta da dupla hélice do DNA, e além disso, exibe metacromasia e birrefringência após o tratamento com RNase (Vidal & Pimentel, 1980; Mello, 1983). Conseqüentemente, deve existir um certo potencial de ligação das moléculas de clupeína. Entretanto, o estado relativamente descompactado deve implicar nas interações inter- e intramolecular, esperado nas várias protaminas.

É sabido que fixações aldeídicas (formol Karnowsk) preservam eficientemente proteínas, enquanto que fixações etanol-acéticas as solubilizam. É de se esperar portanto, que estes fatores possam influenciar nas respostas de basofilia e CEC de complexos DNA-proteínas. É interessante ressaltar que depois de atingida a CEC dos complexos DNA-proteínas no núcleo, as concentrações salinas superiores à da CEC, são removedoras de proteínas nucleares. Assim sendo, ocorre um retorno da metacromasia nuclear, pois a remoção das proteínas libera sítios aniônicos na molécula de DNA (Amaral & Mello, 1989).

Mello *et al.* (1993), estudando variações desta técnica, encontraram que complexos de ribonucleoproteínas são altamente metacromáticos após os valores de CEC em complexos DNA/proteínas serem encontrados. Os autores descrevem uma variante da técnica de CEC em que os nucléolos são

significadamente discriminados. A visualização do nucléolo em colorações com Azul de Toluidina é freqüentemente dificultada pela forte afinidade das moléculas do corante ao DNA. Desse modo, sem a digestão enzimática, os nucléolos não podem ser distinguidos das áreas heterocromáticas. Entretanto, nas preparações onde o Azul de Toluidina é seguido pelo tratamento com íons Mg^{2+} , o nucléolo torna-se facilmente visível, sendo a concentração do Mg^{2+} suficiente para abolir a metacromasia do DNA, neste caso, o Mg^{2+} tem a função de extrator e não de competidor. Foi observado que a metacromasia do RNA é mantida em concentrações de Mg^{2+} maiores do que aquelas requeridas para valores de CEC de DNA ou complexos DNA-proteína.

1.5 - Estrutura nucleolar e impregnação por íons prata (revisão)

Em células eucarióticas, o nucléolo é o sítio em que ocorre a transcrição do gene ribossômico e o mecanismo necessário para a produção das subunidades ribossômicas (Hadjiolov, 1985). Neste sítio são sintetizados os RNAr 18S, 28S e 5,8S, que são associados às proteínas acídicas, tais como a proteína ribossomal S_1 e também o pequeno RNAr 5S, que é transcrito em outro local do genoma. Portanto, o nucléolo não é uma organela estável. Sua estrutura, seu tamanho e organização dependem da biogênese dos ribossomos (Hügler et al., 1985; Hernandez-Verdun, 1991).

Hoje, sabemos a importância do nucléolo, sendo o sítio de biogênese dos precursores ribossômicos. Ele contém inúmeras cópias de genes para RNAr, que estão agrupados em seqüências de DNAr altamente repetidas ou em tandem, que por sua vez, estão contidos nos organizadores nucleolares. Então, as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), são os sítios ou regiões cromossômicas que contém os genes que codificam o RNAr, os quais são transcritos e posteriormente processados em pré-ribossomos no citoplasma,

portanto, o RNA é transcrito a partir do DNAr, presente nas RONS (Schwarzacher, 1993).

As formas e os detalhes dos nucléolos mostram uma extensa variação em diferentes tipos de células e também dependem do seu estado funcional. Em células com alto grau de produção de ribossomos, os nucléolos são grandes e complexos, entretanto, em células com baixa atividade, na maioria dos casos, são pequenos e possuem uma estrutura simples. Porém, três componentes estruturais específicos podem ser encontrados em muitos tipos de nucléolos (Schwarzacher, 1993).

Os diferentes passos na biogênese correspondem aos domínios nucleolares que podem ser identificados por sua morfologia. Existem três domínios nucleolares básicos, os centros fibrilares (FCs), o componente fibrilar denso (DFC) e os componentes granulares (GCs). Eles são encontrados em todos os nucléolos, exceto naqueles muito pequenos. Tradicionalmente, os FCs são considerados como sítios de armazenamento de genes ribossômicos não transcritos, o DFC é um sítio de transcrição destes genes e o GC é o sítio de maturação e armazenagem das subunidades ribossômicas (Goessens, 1984; Hernandez-Verdun, 1986; Somerville, 1986). Entretanto, os atuais sítios de transcrição são ainda controversos. Alguns autores acreditam que eles estão localizados nos FCs (Scheer & Benavente, 1990), outros no limite entre FCs e DFC (Derenzini *et al.*, 1990; Thiry *et al.*, 1991); e outros somente no DFC (Hartung *et al.*, 1990; Wachtler *et al.*, 1989).

Muito freqüentemente, em células eucarióticas complexas, os nucléolos estão localizados próximos ao envelope nuclear (Bergeois & Hubert, 1988), ou em núcleos de levedura estão justapostos na membrana nuclear interna (Clark *et al.*, 1990). Esta posição é relatada pela presença de estruturas esqueléticas específicas no sítio de ligação com o envelope. Este esqueleto nucleolar adere diretamente à lâmina nuclear ou está ligado por um pedículo (Bureau *et al.*, 1986). Atualmente pouca informação está associada à caracterização do esqueleto nucleolar, especialmente a especificidade

comparada àquela da matriz nuclear (Bouteille *et al.*, 1983) e ação da estrutura do domínio nucleolar.

Uma preferencial localização dos nucléolos próximos à membrana nuclear ou em contato direto, pode ser observada em muitos diferentes tipos de células animais e vegetais (Bourgeois *et al.*, 1982; Bourgeois & Hubert, 1988), especialmente àqueles com grande produção de ribossomos, tais como divisão rápida e regeneração celular. A posição periférica dos nucléolos é em parte uma consequência da posição freqüentemente periférica dos cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) dentro do núcleo e em parte a expressão de um transporte facilitado de pré-ribossomos para o citoplasma (Bourgeois & Hubert, 1988).

Os nucléolos, quando supra ativados, adquirem mudanças morfológicas. Tais mudanças referem-se ao aumento de tamanho e uma transformação a nível de nucleolonema. O centro fibrilar apresenta-se mais esparso, o componente fibrilar denso ocupa-se em uma grande extensão e o componente granular não apresenta grandes transformações. O volume medido em várias áreas, revela que durante este estágio, o centro fibrilar denso aumenta em grande parte (Hozak *et al.*, 1986, 1989). Com provável ativação, vários nucléolos desenvolvem e iniciam a compactação, aparecendo primeiramente com poucas extensões e posteriormente muitos centros fibrilares, cada um circundado pelos componentes fibrilares densos, formando uma intercomunicação com os centros fibrilares. Nas regiões periféricas do nucléolo uma grande zona de componentes granulares desenvolvem-se. Todos os componentes do nucléolo aumentam seu volume.

Na ativação de células previamente inativas, as RONs devem ser totalmente alteradas. Isto indica que muitas cópias dos genes RNAr devem ser alteradas em um curto espaço de tempo. No caso de uma rápida ativação da transcrição do DNAr e biogênese de ribossomos, torna-se necessário que as proteínas nucleolares específicas sejam armazenadas nas RONs para uso imediato. Em células inativas da intérfase estas regiões apresentam formas de

pequenos anéis, e durante a mitose, apresentam a forma de corpos pré-nucleolares, com sítios de RONS nos cromossomos mitóticos (Schwarzacher, 1993).

Existe um grupo de proteínas especificamente localizadas nas RONS durante a mitose, que foram identificadas pela sua habilidade em reduzir prata (Ag) sobre condições acídicas, onde a maioria das proteínas celulares permanecem não coradas (Goodpasture & Bloom, 1975). Estas proteínas são localizadas durante a intérfase no nucléolo e sua presença é necessária para a transcrição dos genes ribossômicos (Miller *et al.*, 1976). Elas também são usadas como marcadores de RONS ativas e na microscopia eletrônica, são localizadas no FC e DFC, mas nunca em GC (Hernandez-Verdun *et al.*, 1980). Nas unidades transcricionais ribossômicas, essas proteínas Ag-RON tem sido localizadas nas regiões transcritas das unidades e expostas em distribuição linear, indicando a localização preferencial no eixo das proteínas ligadas ao DNAr (desoxirribonucleoproteínas-DNP). Foi relatado que a variabilidade nas suas intensidades de coloração está relacionada com o grau de atividade nucleolar (atividade transcricional) (Angelier *et al.*, 1982).

Apesar da melhoria de seletividade de uma técnica de coloração e o uso de outra para especificidade, cujos resultados foram extensivamente provados, não há uma única proteína ou um grupo de proteínas responsável pela impregnação nucleolar pela prata, confirmando prévias hipóteses (Medina *et al.*, 1983). De fato, nenhuma presença da cromatina portadora da RON, nem atual atividade transcricional são características comuns em toda estrutura nucleolar corada pela prata. Todas estas estruturas: RON mitótica, centros fibrilares interfásicos e porções do componente fibrilar denso, contém cromatina DNAr (Fakan & Puvion, 1980; Mirre & Stahl, 1981; Risueño *et al.*, 1982). Proteínas associadas com a transcrição de RNAr e processos iniciais são encontradas em todo componente fibrilar denso (DFC) e, durante a mitose, em cobertura dos cromossomos anafásicos bem como em corpos pré-nucleolares (Fan & Penman, 1971; Moreno *et al.*, 1976; Risueño *et al.*, 1976; Fakan & Puvion, 1980).

Somente as porções dos componentes dos centros fibrilares combinam ambas características ao mesmo tempo, por esta reação, esta estrutura é mais densamente corada pela prata, um padrão observado por outros autores (Daskal *et al.*, 1980; Pebusque & Seite, 1981, Moreno *et al.*, 1985). Achados citológicos descrevem duas proteínas nucleolares que se coram pela prata, C23 (nucleolina) e B23 (numatrina). Destas, somente a C23 está associada com DNAr (Olson *et al.*, 1983), sugerindo que é a "verdadeira" proteína "Ag-RON" (Ochs & Busch, 1984).

Métodos de imunoperoxidase que utilizam anticorpos específicos anti-C23 foram usados para localizar proteínas C23 nas células. Foi determinado que a proteína C23 está localizada na densa estrutura nucleolonemal ou "centros fibrilares" dentro do nucléolo. Estas estruturas, que são também evidenciadas no nucléolo após impregnação pela prata, tem sido evidenciadas por conter RNA, sugerindo que é o sítio de síntese do RNAr. A proteína C23 está localizada nestas regiões nucleolares transcricionalmente ativas.

A localização da proteína C23 nas RONS sugere seu envolvimento na atividade do gene ribossomal. Outras evidências sustentam a hipótese de que as proteínas C23 e B23 estão relacionadas com a atividade nucleolar. A taxa relativa dessas proteínas no DNA e histonas (Ballal *et al.*, 1975), mostrou-se aumentada durante a atividade do gene ribossomal. Foi relatado inicialmente que proteínas C23 e B23 são responsáveis pela coloração da prata nas RONS (Lischwe, 1978). Uma correlação entre a síntese de RNA ribossômico e o número de grânulos corados pela prata, em nucléolo interfásico, indica que as proteínas coradas pela prata devem ter um importante papel funcional na determinação da taxa de atividade nucleolar (Howell, 1977; Busch *et al.*, 1979).

Proteínas cromossômicas não histônicas são difíceis de isolar bioquimicamente porque são heterogêneas, insolúveis, associadas com macromoléculas nucleares e susceptíveis às proteases (Lischwe *et al.*, 1981).

Na coloração RON-Ag (do inglês Ag-NOR), ou seja, impregnação nucleolar pela prata nas proteínas associadas com cromatina DNAr, não é

detectada a presença dessa cromatina DNAr. Embora ocorram inclusões dessa cromatina condensada nos centros fibrilares heterogêneos do nucléolo e a RON mitótica contenha esta mesma cromatina DNAr, esta em ambas situações, não é corada pela prata. A técnica também não detecta transcrição do DNA r, como é mostrado em vários trabalhos (Dimova *et al.*, 1982; Hernandez-Verdun *et al.*, 1984; Medina *et al.*, 1983; Raman & Sperling, 1981; Sánchez-Pina *et al.*, 1984). A característica comum de toda estrutura RON-Ag corada é a presença da cromatina DNAr descondensada (Hernandez-Verdun *et al.*, 1982; Hernandez-Verdun & Derenzini, 1983; Risueño *et al.*, 1982). Os estudos demonstraram citologicamente que poucas relações existem entre as proteínas ácidas e o estado de descondensação da cromatina portadora das RONS.

Esta conclusão é sustentada pelo achado de regiões altamente fosforiladas nessas proteínas ácidas RON-Ag (Rao *et al.*, 1982; Buys & Osinga, 1984) e pelo fato que, um processo de fosforilação-desfosforilação em proteínas da cromatina (ácidas e na histona H₁) da cromatina é responsável por uma mudança estrutural que afeta o grau de empacotamento da fibra cromatínica (Bhorjee, 1981; Tsanev, 1983; Sahasrabudde *et al.*, 1983; Egyhazy *et al.*, 1984). O desenrolamento da cromatina condensada inativa, é um passo necessário para a transcrição (Tsanev, 1983; Spiker, 1984; Stainer *et al.*, 1984), mas pouca relação existe entre a fosforilação, proteínas não histônicas e RNA polimerase (Egyhazy *et al.*, 1984).

Embora a maior parte dos estudos aqui relatados tenham sido realizados em genes extranucleolares, é concebível que requerimentos similares são necessários para o nucléolo (Tsanev, 1983). Entretanto, a alta taxa de transcrição do DNA nucleolar, que forma a composição de uma proteína particular da cromatina nucleolar (Widmer *et al.*, 1979), deve explicar satisfatoriamente a necessidade de manutenção da funcionalidade da cromatina DNAr permanecer descondensada, transcrevendo ou não durante a mitose. Isto deve ser a estrutura da inativa, mas "potencialmente ativa" cromatina nucleolar. Quando genes ribossômicos estão totalmente reprimidos (Miller *et al.*, 1976; Cermeño *et*

al., 1984) sua cromatina deve estar totalmente condensada e não mostrar afinidade pela prata. No caso de células vegetais, altas doses de genes ribossômicos (Ingle & Sinclairs, 1972) devem explicar a condensação transitória de alguns deles, que são visualizados como inclusões de cromatina condensada (Risueño *et al.*, 1982).

Alguns resultados relataram que a nucleolina (C23) proteína da região nucleolar induz a condensação cromatínica pela interação com o octâmero das histonas. A nucleolina, quando fosforilada é incapaz de dissociar-se do octâmero das histonas. A ligação forte da nucleolina na histona H₁ sugere que a mesma induz a condensação cromatínica (Lischwe, 1981).

1.6 - Cariometria

A utilização de métodos cariométricos apresenta grande importância, uma vez que os dados obtidos possibilitam uma série de informações referentes aos mais variados propósitos. Essencialmente, os métodos cariométricos medem a área ou o volume do objeto em estudo que pode ser a célula, núcleo ou nucléolo.

A partir das variações detectadas, através dos dados, pode-se inferir sobre a atividade celular em vários aspectos: fases do desenvolvimento (Recco-Pimentel *et al.*, 1989); processos de transformação e malignidade (Vidal & Russo, 1987; Mello & Russo, 1987; Taboga, 1997); resposta a estresse (Kubrusly, 1984; Álvares-Garcia & Mello, 1987; Andrade & Mello, 1987); processos de envelhecimento, ciclo cardiano, danos patológicos e ação hormonal (Mello & Vidal, 1980) e correlação com dosagens de DNA, RNA, Histonas e Proteínas Não-Histônicas (Recco-Pimentel *et al.*, 1989).

No presente trabalho foram medidas as áreas nucleares e nucleolares das células dos túbulos de Malpighi de triatomíneos da espécie



Rhodnius prolixus (machos e fêmeas), submetidos a diferentes condições de alimentação e técnicas citológicas (orceína lacto-acética e nitrato de prata).

A técnica utilizada foi a do ampliador fotográfico, onde as áreas são medidas através de imagens ampliadas dos núcleos, obtidas a partir de negativos fotográficos e projetadas em papel milimetrado.

1.7 -Objetivos

Os triatomíneos apresentam importância epidemiológica pela transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Além disso, são excelentes materiais biológicos por apresentarem resistência a jejuns prolongados, são de fácil obtenção e anatomicamente didático.

Os túbulos de Malpighi, órgãos estudados no presente trabalho, apresentam alta atividade metabólica, relacionados com a secreção e excreção de nutrientes para manter a homeostase normal. Desse modo, alterações ambientais afetam diretamente sua fisiologia.

Portanto, nesse trabalho, os objetivos estão relacionados ao estudo das alterações das células dos túbulos de Malpighi de insetos hematófagos, adultos (machos e fêmeas) do gênero *Rhodnius* (*R. prolixus*), submetidos a duas situações de estresse: jejum alimentar e alterações de temperatura (choques hipotérmicos e hipertérmicos); e a relação entre as características celulares observadas, tanto nos insetos controles como nos experimentais, relativas principalmente a: distribuição cromatínica; fusão nuclear e nucleolar;- modificações das áreas nucleares e nucleolares e graus de compactação e descompactação da cromatina, com as respostas fisiológicas do metabolismo celular.

2.1- Espécie analisada, obtenção dos insetos e procedência

A espécie escolhida no presente trabalho foi *Rhodnius prolixus* (machos e fêmeas) (Figuras A e B), que é nativa de Bogotá, Colômbia.

Os insetos foram cedidos pelo Insetário do Serviço Social de Saúde de Araraquara (SESA), pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sob a coordenação do Prof. Dr. José Maria Soares Barata. O insetário promove coletas periódicas em algumas regiões do Estado de São Paulo e Minas Gerais e também recebe doações de hemipteros de todo o mundo, mantendo assim um estoque que proporciona a distribuição às instituições de pesquisa solicitantes.

Os insetos foram trazidos na fase adulta, machos e fêmeas, sempre recém alimentados. No presente trabalho foram sacrificados 840 insetos (420 machos e 420 fêmeas), sendo 504 para a técnica de CEC (414 para observação em diferentes condições de alimentação, 90 submetidos às diferentes temperaturas e 30 insetos que foram realimentados) e 168 insetos para impregnação por nitrato de prata e orceína lacto-acética nas duas situações de estresse.

2. Material & Método

2.1- Espécie analisada, obtenção dos insetos e procedência

A espécie escolhida no presente trabalho foi *Rhodnius prolixus* (machos e fêmeas) (Figuras A e B), que é nativa de Bogotá, Colombia.

Os insetos foram cedidos pelo Insetário do Serviço Social de Saúde de Araraquara (SESA), pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sob a coordenação do Prof. Dr. José Maria Soares Barata. O insetário promove coletas periódicas em algumas regiões do Estado de São Paulo e Minas Gerais e também recebe doações de hemípteros de todo o mundo, mantendo assim um estoque que proporciona a distribuição às instituições de pesquisa solicitantes.

Os insetos foram trazidos na fase adulta, machos e fêmeas, sempre recém alimentados. No presente trabalho foram sacrificados 840 insetos (420 machos e 420 fêmeas), sendo 504 para a técnica de CEC (414 para observação em diferentes condições de alimentação, 60 submetidos às diferentes temperaturas e 30 insetos que foram realimentados) e 168 insetos para impregnação por nitrato de prata e orceína lacto-acética nas duas situações de estresse.

Figura A-B Triatomíneos do gênero *Rhodnius*. A. *R. prolixus* macho B. *Rhodnius prolixus* fêmea

2.2 - Manutenção

No insetário, os insetos são mantidos em cristalizadores, à temperatura ambiente, em salas com pouca luminosidade. Os cristalizadores são fechados na parte superior com tecido de malha fina ou meia de seda. Os triatomíneos são alimentados a cada 15 dias com sangue de rato. No departamento de Biologia (IBILCE-UNESP), esses insetos foram mantidos na câmara de temperatura constante (21°).

2.3 - Experimentos

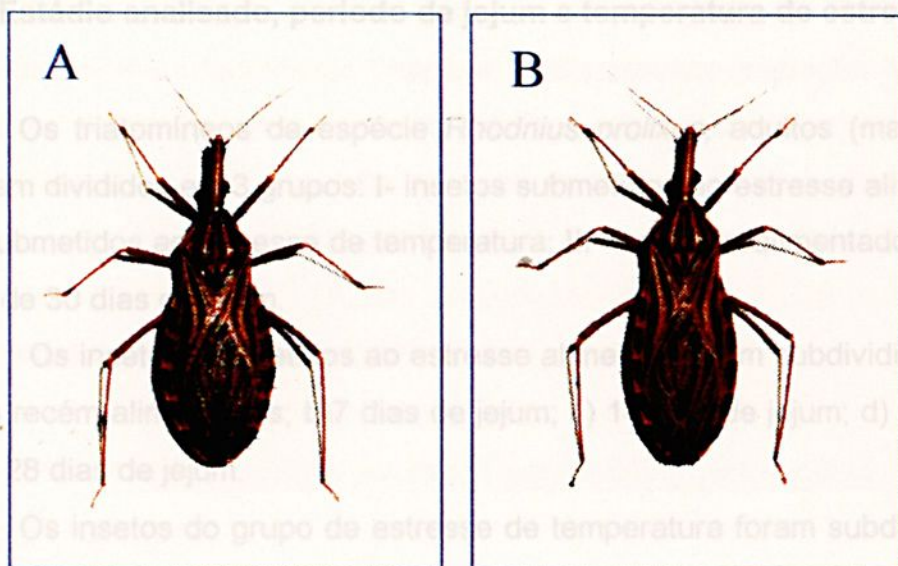


Figura A-B: Triatomíneos do gênero *Rhodnius*. **A.** *R. prolixus* macho. **B.** *Rhodnius prolixus* fêmea

Esses insetos foram dissecados e tiveram seus túbulos de Malpighi retirados, sem separar região distal da região proximal, onde foram realizadas diferentes técnicas de coloração, como orceína lacto-acética, impregnação pelo

2.2 - Manutenção

No insetário, os insetos são mantidos em cristalizadores, à temperatura ambiente, em salas com pouca luminosidade. Os cristalizadores são fechados na parte superior com tecido de malha fina ou meia de seda. Os triatomíneos são alimentados a cada 15 dias com sangue de pato. No departamento de Biologia (IBILCE-UNESP), esses insetos foram mantidos na câmara de temperatura constante (21°).

2.3 - Estádio analisado, período de jejum e temperatura de estresse

Os triatomíneos da espécie *Rhodnius prolixus*, adultos (machos e fêmeas) foram divididos em 3 grupos: I- insetos submetidos ao estresse alimentar; II- insetos submetidos ao estresse de temperatura; III- insetos realimentados após um período de 30 dias de jejum.

Os insetos submetidos ao estresse alimentar foram subdivididos em 5 grupos: a) recém-alimentados; b) 7 dias de jejum; c) 14 dias de jejum; d) 21 dias de jejum; e) 28 dias de jejum.

Os insetos do grupo de estresse de temperatura foram subdivididos em 3 grupos: 21°C (temperatura ambiente) -4°C (choque hipotérmico) e 40°C (choque hipertérmico) durante períodos de tempo diferentes: 1, 6 e 12 horas.

A temperatura de 21°C foi utilizada como controle pela disponibilidade da câmara de temperatura constante existente no Departamento de Biologia, IBILCE (UNESP), São José do Rio Preto (S.P.). Além disso, essa temperatura é a mais próxima da temperatura ambiente existente no Insetário de Araraquara (S.P.), de onde os insetos são originários.

Esses insetos foram dissecados e tiveram seus túbulos de Malpighi retirados, sem separar região distal da região proximal, onde foram realizadas diferentes técnicas de coloração, como orceína lacto-acética, impregnação pelo

nitrito de prata e concentração crítica de eletrólitos (CEC). As diversas técnicas utilizadas permitiram estudar os efeitos provocados pelos estresses em questão.

2.4 -Dissecação dos insetos

Os triatomíneos adultos *Rhodnius prolixus* foram eterizados e em seguida depositados em uma placa de Petri contendo parafina.

As patas e as asas foram cortadas e seguiu-se a fixação na parafina através de um alfinete na região superior do cefalotórax. Após a fixação, as laterais do abdomen foram cortadas.

Com a utilização de uma pinça, o exoesqueleto do abdomen foi extraído, exibindo-se os túbulos de Malpighi, que possuem coloração leitosa e localizam-se na hemocele, com a extremidade proximal usualmente presa entre os intestinos médio e posterior. Os túbulos de Malpighi foram retirados e depositados sobre uma lâmina contendo Demerec (Demerec & Kaufmann, 1945).

2.5 -Técnicas citológicas

2.5.1- Esmagamento e coloração pela orceína lacto-acética (Bicudo, 1982; De Vaio et al., 1985).

Assim que os túbulos de Malpighi foram depositados na lâmina contendo Demerec (Demerec & Kaufmann, 1945), o excesso de solução fisiológica foi retirado. Em seguida, foi depositada uma gota de fixador 1:1 (ácido acético 45% e ácido láctico 50%) e após 1 minuto, o excesso foi retirado com papel absorvente.

Em seguida, foi adicionada uma gota de orceína lacto acética e após 8 minutos de coloração, o excesso foi retirado com papel absorvente.



Foi então adicionada uma gota de ácido acético e após 1 minuto o excesso foi retirado. Novamente, uma gota de ácido acético foi adicionada, a lamínula foi colocada sobre o material e procedeu-se o esmagamento

2.5.2-Preparo do material para posterior impregnação pela prata.

Sobre os túbulos de Malpighi depositados na lâmina, foi adicionada uma gota de ácido acético e após 1 minuto o excesso foi retirado. Após esse procedimento, foi adicionada uma gota de ácido láctico (50%) e após 5 minutos, o excesso foi retirado. Em seguida adicionou-se uma gota de ácido acético (45%) e a lamínula foi colocada sobre o material, onde seguiu-se o esmagamento.

As lâminas ficaram na câmara úmida aproximadamente 10 minutos.

As lamínulas foram retiradas, após 20 segundos, do nitrogênio líquido, com auxílio de uma lâmina de metal

• Impregnação por nitrato de prata (Howell & Black, 1980)

Sobre as lâminas contendo o material biológico, foi adicionada uma gota de solução reveladora e duas gotas de nitrato de prata.

Após essa etapa, a lamínula foi colocada sobre o material e a lâmina foi levada à estufa pré-aquecida a 70°C, por aproximadamente 15 minutos (as lâminas foram colocadas na estufa em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada).

Em seguida, o material foi lavado com água destilada e seco à temperatura ambiente. Após esse procedimento, as lâminas foram montadas com verniz cristal.

2.5.3-Coloração pela CEC (concentração crítica de eletrólitos) (Vidal & Mello, 1977; Taboga, 1997; Mello, 1997).



2.5_{3.1}- CEC no estudo da cromatina.

O corante foi preparado utilizando-se Azul de Toluidina (0,025%) diluído no tampão MacIlvaine em pH 3.8 - 4.1. O tampão é preparado com 0,1 M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato dissódico.

A solução foi dividida em porções de 50 ml que foram colocadas em boréis contendo concentrações crescentes de cloreto de magnésio. As concentrações do sal variavam de 0,01 M a 2,0 M. O valor de CEC, dado em molar, ocorreu quando a metacromasia foi abolida.

Para coloração do material, os túbulos de Malpighi foram fixados em etanol 70% e etanol ácido acético 3:1 por 1 minuto.

Após esse procedimento, as lâminas foram mergulhadas nos boréis contendo solução de Azul de Toluidina e Mg^{2+} por 15 minutos. Em seguida, o material foi lavado em água destilada e secos à temperatura ambiente por 6 horas. Finalizando, o material foi clarificado em xilol, e as lâminas montadas com verniz cristal.

2.5_{3.2}- CEC no estudo do nucléolo e RNAs citoplasmáticos.

O procedimento para preparar o corante (Azul de Toluidina com tampão MacIlvaine) e a fixação dos túbulos de Malpighi (etanol 70%; etanol:ácido acético 3:1) ocorreu como descrito para o estudo da cromatina.

Após a fixação do material, as lâminas foram mergulhadas em boréis contendo 50 ml da solução sem Mg^{2+} , por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram rapidamente lavadas em água destilada (somente para retirar o excesso do corante) e mergulhadas novamente em boréis contendo 50 ml de água destilada e 0,05 M de Mg^{2+} . O tempo de exposição do material nesta solução variou de 3,7, 10 e 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada (para retirar o excesso do sal) e secas à temperatura ambiente por 6 horas, clarificadas

em xilol e montadas com verniz cristal.

Com esse procedimento, os corpúsculos nucleolares e o RNA citoplasmático ficam totalmente metacromáticos, enquanto que, o DNA atinge a CEC.

2.6-Fotomicrografias.

As lâminas foram fotomicrografadas no microscópio ZEISS JENAVAL, do Departamento de Biologia de Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, São José de Rio Preto. Os filmes coloridos foram revelados no Laboratório Jetcolor de São José do Rio Preto (SP). A ampliação final das fotomicrografias apresentadas em todas as pranchas é de 1080 X.

2.7-Cariometria

Foi realizada a cariometria em insetos machos e fêmeas submetidos a cinco condições alimentares: alimentados, primeira semana de jejum, segunda semana de jejum, terceira semana de jejum e quarta semana de jejum. Os túbulos de Malpighi foram retirados dos insetos após cada condição experimental, e submetidos a coloração com orceína lacto-acética e impregnação pela prata. Os núcleos das células desses órgãos foram fotografados e os negativos dos filmes foram colocados em um ampliador fotográfico. A imagem dos núcleos foi ampliada, projetada em papel milimetrado e delimitada com lápis preto.



2.8- Análise estatística

A análise das áreas nucleares e nucleolares das células dos túbulos de Malpighi de insetos machos e fêmeas submetidos à diferentes condições de nutrição e de técnicas de visualização foi realizada com os seguintes procedimentos (Zar, 1984).

- Estatísticas descritivas e intervalos de confiança
- Gráficos box-plot e de dispersão
- Coeficiente de correlação de Pearson
- Comparação de médias e medianas por análise de variância (ANOVA)
- Comparação de médias por teste t de Student

3. Resultados

A técnica de coloração pela orceína lacto-acética evidenciou diferenças na distribuição cromatínica, bem como mudanças de áreas nucleares, não somente no transcurso dos diferentes períodos de jejum, mas também entre indivíduos machos e fêmeas. Na impregnação pela prata, foram claramente observadas diferenças morfológicas nos corpúsculos nucleares diante das diferentes situações de estresses e mudanças das áreas nucleares. A concentração crítica de eletrólitos (CEC), uma técnica cujo mecanismo consiste na interação de um corante catiônico (Azul de Toluidina) ou um cátion inorgânico (cloro de manganês) entre os grupos fosfatos livres da cromatina, evidenciou os graus de compactação cromatínica provocados pelos diferentes estresses.

3.1 - Estresse provocado pelo jejum

3.1.1 - Coloração: Orceína lacto-acética

Através desta coloração a distribuição da cromatina e os fenótipos nucleares foram facilmente visualizados.

No estresse provocado pelo jejum, em indivíduos machos e fêmeas, pode-se destacar diferenças nos fenótipos nucleares, como mudanças das áreas nucleares e contornos nucleares e também descompactação cromatínica.

Nas figuras 1 e 2, são observados fenótipos nucleares em indivíduos machos e fêmeas, na condição de recém-alimentação até 28 dias de jejum, respectivamente. Pode-se ver, com o desenvolvimento do jejum, ocorrem mudanças na distribuição da cromatina, bem como a descompactação cromatínica. Pode-se observar também uma conformation diferenciada do contorno nuclear.

3. Resultados

Na figura 1 (machos), nota-se que a partir da segunda semana de jejum (C) a técnica de coloração pela orceína lacto-acética evidenciou diferenças na distribuição cromatínica, bem como mudanças de áreas nucleares, não somente no transcorrer dos diferentes períodos de jejum, mas também entre indivíduos machos e fêmeas. Na impregnação pela prata, foram claramente observadas diferenças morfológicas nos corpúsculos nucleolares diante das diferentes situações de estresses, e mudanças das áreas nucleolares. A concentração crítica de eletrólitos (CEC), uma técnica cujo mecanismo consiste na intercalação de um corante catiônico (Azul de Toluidina) ou um cátion inorgânico (cloreto de magnésio) entre os grupos fosfatos livres da cromatina, evidenciou os graus de descompactação cromatínica provocados pelos diferentes estresses.

3.1 - Estresse provocado pelo jejum

3.1.1 - Coloração: Orceína lacto-acética

Através desta coloração a distribuição da cromatina e os fenótipos nucleares foram facilmente visualizados.

No estresse provocado pelo jejum, em indivíduos machos e fêmeas, pode-se destacar diferenças nos fenótipos nucleares, como mudanças nas áreas nucleares e contornos nucleares e também descompactação cromatínica.

Nas figuras 1 e 2, são observados fenótipos nucleares em indivíduos machos e fêmeas, na condição de recém-alimentação até 28 dias de jejum, respectivamente. Nota-se que com o desenvolvimento do jejum, ocorrem mudanças na distribuição da cromatina, que se torna mais descompactada no decorrer do processo. Pode ser também observada uma conformação diferenciada do contorno nuclear.

Na figura 1 (machos), nota-se que a partir da segunda semana de jejum (C), a descompactação da cromatina é mais acentuada, e o início de fusão nuclear ocorre mais freqüentemente na terceira e quarta semanas de jejum.

Na figura 2 (fêmeas), a partir da terceira semana de jejum, também ocorre maior descompactação da cromatina, e as irregularidades nas delimitações nucleares, são mais freqüentes.

Para cada condição de alimentação foram selecionados, aleatoriamente, 50 núcleos das células dos túbulos de Malpighi de insetos machos e outros 50 de insetos fêmeas.

As tabelas 1 e 2 ilustram os resultados obtidos para cálculos de estatísticas descritivas relativas às áreas nucleares dos insetos machos e fêmeas, respectivamente. Foram desconsiderados dos testes estatísticos alguns dados detectados como discrepantes na amostra, por isso os valores de n apresentados nas tabelas 1 e 2 não são todos iguais a 50. Em decorrência da seleção aleatória dos núcleos, aparentemente pode ser constatada uma heterocedasticidade das amostras comparadas na elaboração dessas tabelas.

As estimativas dos intervalos de confiança IC(95%) apresentadas na tabela 2, revelam que as áreas nucleares foram aumentando a medida em que transcorriam as semanas de jejum, atingindo valores mais altos na terceira semana de jejum.

Um outro aspecto que vale destacar é que na terceira semana de jejum a cariometria apresentou maior heterogeneidade, ou melhor, os maiores valores de desvio padrão, tanto para machos como para fêmeas, foram encontrados nesta condição alimentar dos insetos.

A figura 1 ilustra também o comportamento dos dados medidos na cariometria para machos (A) e fêmeas (B).

Ainda com respeito aos dados cariométricos da coloração com orceína, verifica-se pela aplicação do teste t que a comparação entre os sexos em cada uma das diferentes condições alimentares resultou em:



a) não evidências de diferença estatisticamente significativa para os dados da primeira semana de jejum ($p=0,9206$)

b) evidências de diferença significativa entre as áreas médias nas demais condições alimentares (valores- p inferiores a 0,01 em todos os casos). Portanto, as áreas nucleares das fêmeas apresentaram-se significativamente maiores que as dos machos.

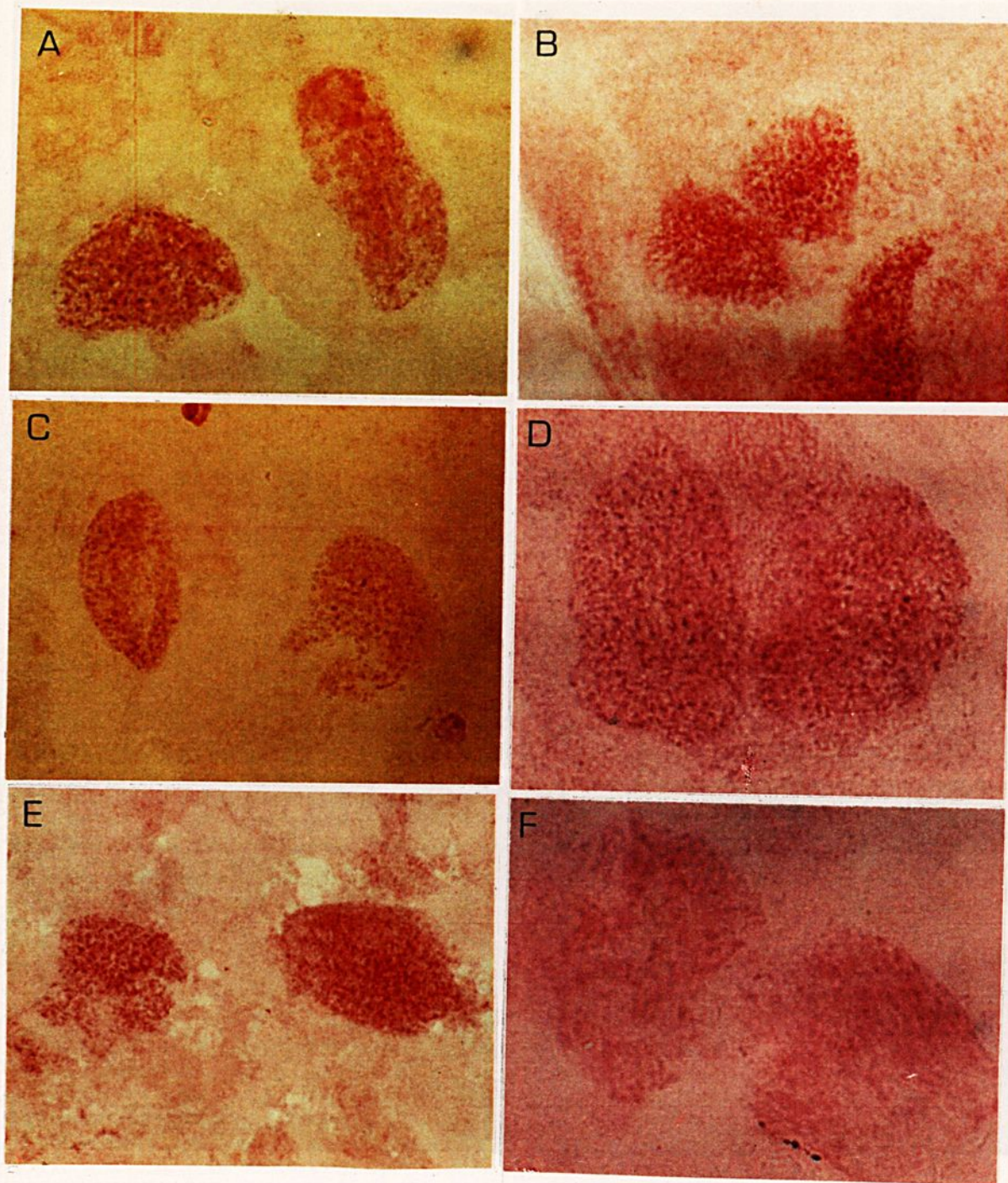


Figura 1: Núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* machos submetidos a diferentes condições de alimentação. Coloração: Orceína lacto-acética. **A:** Recém-alimentados. Notar contorno nuclear bem delimitado e cromatina uniformemente distribuída. **B:** 7 dias de jejum. Observa-se início da descompactação da cromatina. **C:** 14 dias de jejum. O contorno nuclear apresenta-se sem delimitação regular e ocorre descompactação da cromatina. **D:** 21 dias de jejum. A área nuclear apresenta-se aumentada e ocorre início de fusão nuclear. **E-F:** 28 dias de jejum. Notar descompactação da cromatina mais acentuada e início de fusão nuclear em F.

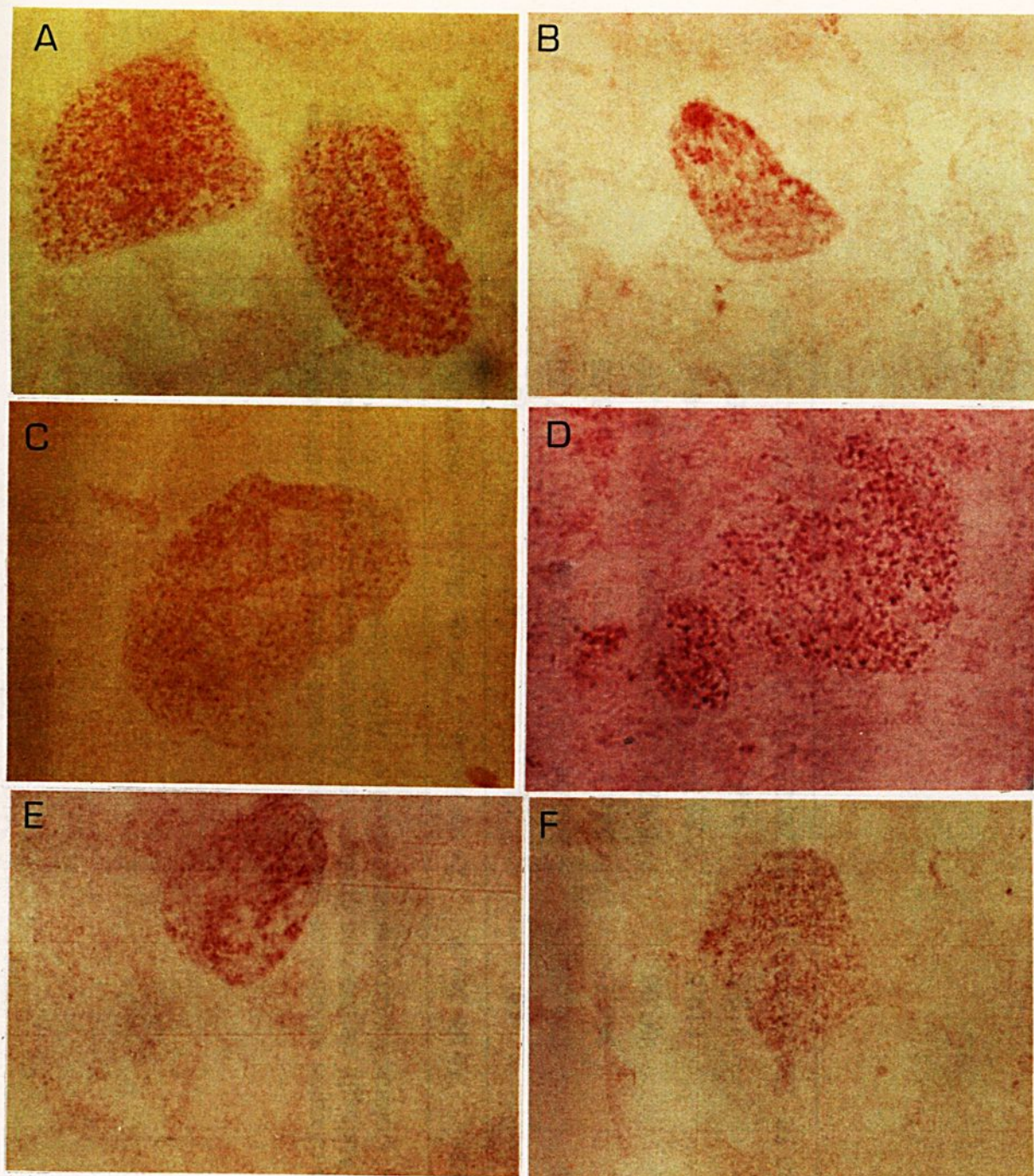


Figura 2: Núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* fêmeas, submetidas a diferentes condições de alimentação. Coloração: Orceína lacto-acética. **A:** Recém-alimentados. Notar núcleos bem delimitados e textura cromatínica normal. **B:** 7 dias de jejum. Observa-se início da descompactação da cromatina. **C:** 14 dias de jejum. A área nuclear apresenta-se maior. **D:** 21 dias de jejum. Notar grande descompactação da cromatina, em núcleos sem delimitação regular. **E-F:** 28 dias de jejum. Observar descondensação da cromatina.

Tabela 1: Resultados dos cálculos estatísticos descritivos e valor-p para ANOVA referentes às áreas nucleares dos túbulos de Malpighi de machos adultos de *Rhodnius prolixus*, submetidos a diferentes condições de alimentação. Coloração: orceína lacto-acética. Área nuclear = μm^2 .

Estatística	Alimentado	1s de Jejum	2s de Jejum	3s de Jejum	4s de Jejum	Valor-p
n	49	46	48	47	48	
Média	183,06	273,58	245,66	289,78	337,30	< 0,0001
Mediana	174	364,75	240,5	277	343,75	
Desvio padrão	57,92	66,66	68,71	89,94	65,54	
Mínimo	90	119,5	86,5	165,5	146,6	
Máximo	295	412,5	414	589	461	
IC (95%)	166,43; 199,70	253,78; 293,37	225,70; 265,61	263,38; 316,19	318,27; 356,33	

Tabela 2: Resultados dos cálculos estatísticos descritivos e valor-p para ANOVA referentes às áreas nucleares dos túbulos de Malpighi de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus*, submetidas a diferentes condições de alimentação. Coloração: orceína lacto-acética. Área nuclear = μm^2 .

Estatística	Alimentado	1s de Jejum	2s de Jejum	3s de Jejum	4s de Jejum	Valor-p
n	50	45	46	49	50	
Média	254,43	276,13	338,41	474,99	400,09	< 0,0001
Mediana	255,25	267,5	345,5	416	391	
Desvio padrão	127,08	160,02	113,88	245,84	107,07	
Mínimo	71,5	58,5	137	140,5	225	
Máximo	520	708	596	1107	641,5	
IC (95%)	218,31; 290,55	228,06; 324,21	304,59; 372,23	404,38; 545,60	369,66; 430,52	

3.1.- Impregnação pelo nitrato de prata.

A impregnação pelo nitrato de prata evidenciou os fenotipos nucleares e os corpúsculos nucleolares das células dos túbulos de Malpighi de triatomíneos submetidos às diferentes condições de alimentação.

Os corpúsculos nucleolares apresentaram-se diferenciados nos indivíduos que foram re alimentados após 30 dias de jejum. Estas evidentes diferenças são mostradas tanto em indivíduos machos quanto em fêmeas (figuras 3 e 4).

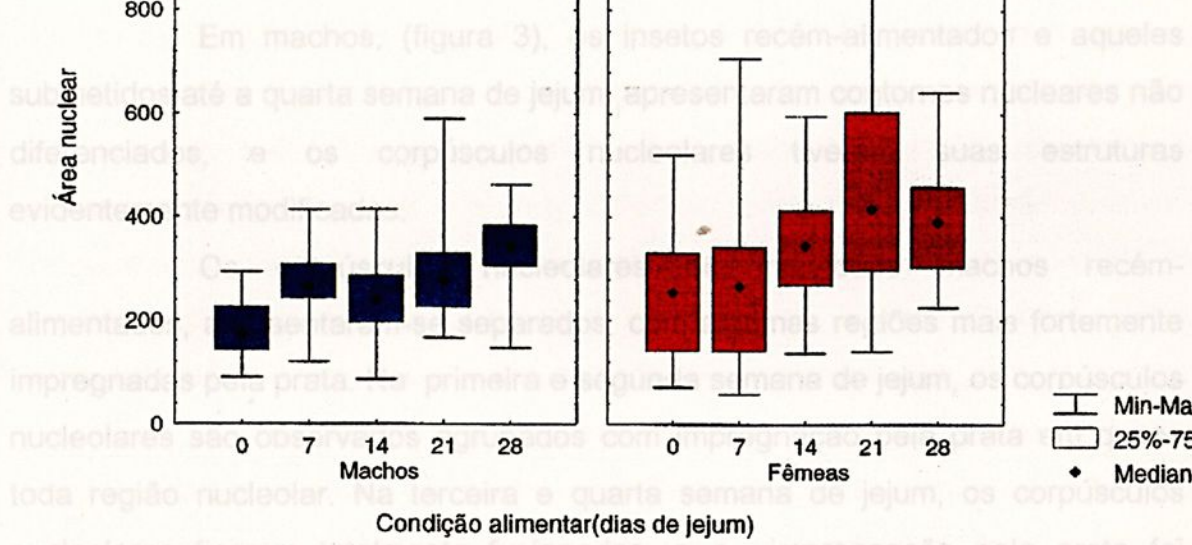


Figura 1: Representação esquemática ("Box plot") das medianas das áreas nucleares (μm^2), das células dos túbulos de Malpighi de insetos adultos de *Rhodnius prolixus* (A-machos; B-fêmeas), sob o efeito de diferentes condições de alimentação (0: indivíduo alimentado; 7, 14, 21 e 28: período em dias de jejum). Coloração: orceína lacto-acética.

3.1₂- Impregnação pelo nitrato de prata.

A impregnação pelo nitrato de prata evidenciou os fenótipos nucleares e os corpúsculos nucleolares das células dos túbulos de Malpighi de triatomíneos submetidos às diferentes condições de alimentação.

Os corpúsculos nucleolares apresentaram-se diferenciados nos núcleos dos insetos submetidos aos diversos períodos de jejum e também nos núcleos dos indivíduos que foram realimentados após 30 dias de jejum. Estas evidentes diferenças são mostradas tanto em indivíduos machos, quanto em fêmeas (figuras 3 e 4).

Em machos, (figura 3), os insetos recém-alimentados e aqueles submetidos até a quarta semana de jejum apresentaram contornos nucleares não diferenciados, e os corpúsculos nucleolares tiveram suas estruturas evidentemente modificadas.

Os corpúsculos nucleolares de indivíduos machos recém-alimentados, apresentaram-se separados, com algumas regiões mais fortemente impregnadas pela prata. Na primeira e segunda semana de jejum, os corpúsculos nucleolares são observados agrupados com impregnação pela prata em quase toda região nucleolar. Na terceira e quarta semana de jejum, os corpúsculos nucleolares ficaram totalmente fusionados, e a impregnação pela prata foi observada em toda região nucleolar. A impregnação diferencial pela prata pode indiretamente caracterizar mudanças na fisiologia nucleolar.

Em fêmeas (figura 4) os contornos nucleares, bem como os corpúsculos nucleolares, apresentaram modificações no decorrer do jejum.

Nas fêmeas recém-alimentadas (figura 4 A), os corpúsculos nucleolares apresentaram-se separados, como em machos. Na primeira e segunda semana de jejum, os corpúsculos apresentaram início de fusão nucleolar, com impregnação pelos íons prata de forma diferenciada. Os contornos nucleares das células dos insetos submetidos a primeira semana sem

alimentação (figura 4 B), apresentaram-se com delimitação pouco modificada. Na terceira semana (figura 4 D), os corpúsculos nucleolares foram observados mais fusionados, mas não totalmente; na quarta semana, os corpúsculos nucleolares apresentaram-se totalmente fusionados, com impregnação pela prata em toda região nucleolar.

Na realimentação, tanto em machos (figura 3 F) quanto em fêmeas (figura 4 F), os núcleos apresentaram-se com contorno nuclear bem delimitado, e os corpúsculos nucleolares continuaram com fusão nucleolar parcial.

Inicialmente foi verificado o grau de dependência linear entre as áreas nucleares e nucleolares calculando o coeficiente de correlação de Pearson (R) e dispondo os dados das áreas mencionadas em um gráfico de dispersão (figura II). Esta situação foi avaliada nas cinco condições alimentares, para os insetos machos (figura II A) e fêmeas (figura II B). O que se observa a partir dos cálculos dos coeficientes e dos gráficos apresentados é que há uma correlação linear entre a área nuclear e a área nucleolar, sendo esta correlação positiva e relativamente alta na maioria das situações abordadas, exceto na condição de fêmeas recém-alimentadas. Na tabela 3 observa-se os valores de R para machos e para fêmeas em todas as diferentes condições de alimentação.

As tabelas 4 e 5 demonstram os cálculos das estatísticas descritivas para os dados relativos às áreas nucleolares dos insetos machos e fêmeas, respectivamente. Desses resultados expostos é possível constatar que na coloração com impregnação pela prata, tanto os triatomíneos machos como as fêmeas, apresentaram nucléolos cujas áreas médias revelaram-se estatisticamente diferentes tomando as cinco condições alimentares consideradas. Percebe-se pelos intervalos de confiança estimados (IC(95%)) que os machos possuem nucléolos maiores que as fêmeas, tendo os valores mais elevados na terceira semana de jejum. Tal indicação sugere que foi possível constatar com impregnação pela prata, que a área nucleolar (média e mediana) aumenta à medida que aumenta o período de jejum alimentar (figura III A,B).

Outro aspecto importante que merece destaque diz respeito ao aumento da dispersão dos dados na terceira semana de jejum (figura II). Isto pode estar indicando que algo em particular ocorre nos núcleos, bem como nos nucléolos, nesse período especificamente, já que aos 21 dias de jejum pode-se verificar que também houve uma elevação da área nuclear para machos e fêmeas quando a coloração foi com orceína lacto-acética (figura I).

Comparativamente os insetos machos e fêmeas possuem nucléolos de áreas médias estatisticamente diferentes. A aplicação do teste t de Student resulta em valores-p inferiores a 0,05 em todas as condições alimentares a que foram submetidos os insetos em análise. Portanto, as áreas nucleolares dos machos são significativamente maiores que as das fêmeas.

Para a área nuclear o resultado repete-se no jejum mas não na condição de recém-alimentado em que o valor-p obtido pelo teste t foi de 0,0937 (tabelas 6 e 7). Este valor permite concluir que, no estado de recém-alimentados, as áreas nucleares médias dos machos não diferem significativamente das áreas nucleares médias das fêmeas (figura IV A,B)

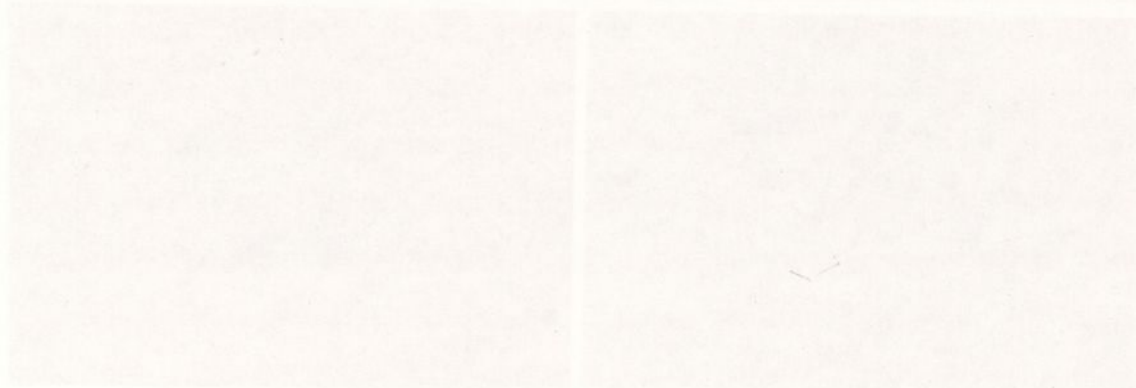


Figura 3: Nucleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* machos submetidos a diferentes condições de alimentação. Coloração: Impregnação pelo método de pasta. A: Recém-alimentados. Corpusculos nucleolares bem definidos, distribuídos normalmente pelo núcleo. Notar impregnação diferencial em algumas regiões nucleares. B: 7 dias de jejum. Notar início de fusão dos corpusculos nucleolares. C: 14 dias de jejum. Observa-se um aumento da área nuclear e o início na fusão dos corpusculos nucleolares dispostos na região central do núcleo. D: 21 dias de jejum. Ocorre fusão total dos corpusculos nucleolares e seu deslocamento dasse para a extremidade do núcleo. E: 28 dias de jejum. Notar fusão nuclear e nucleolar. F: recomposição após 30 dias de jejum. Observa-se aumento da área nuclear e início de fusão dos corpusculos nucleolares.

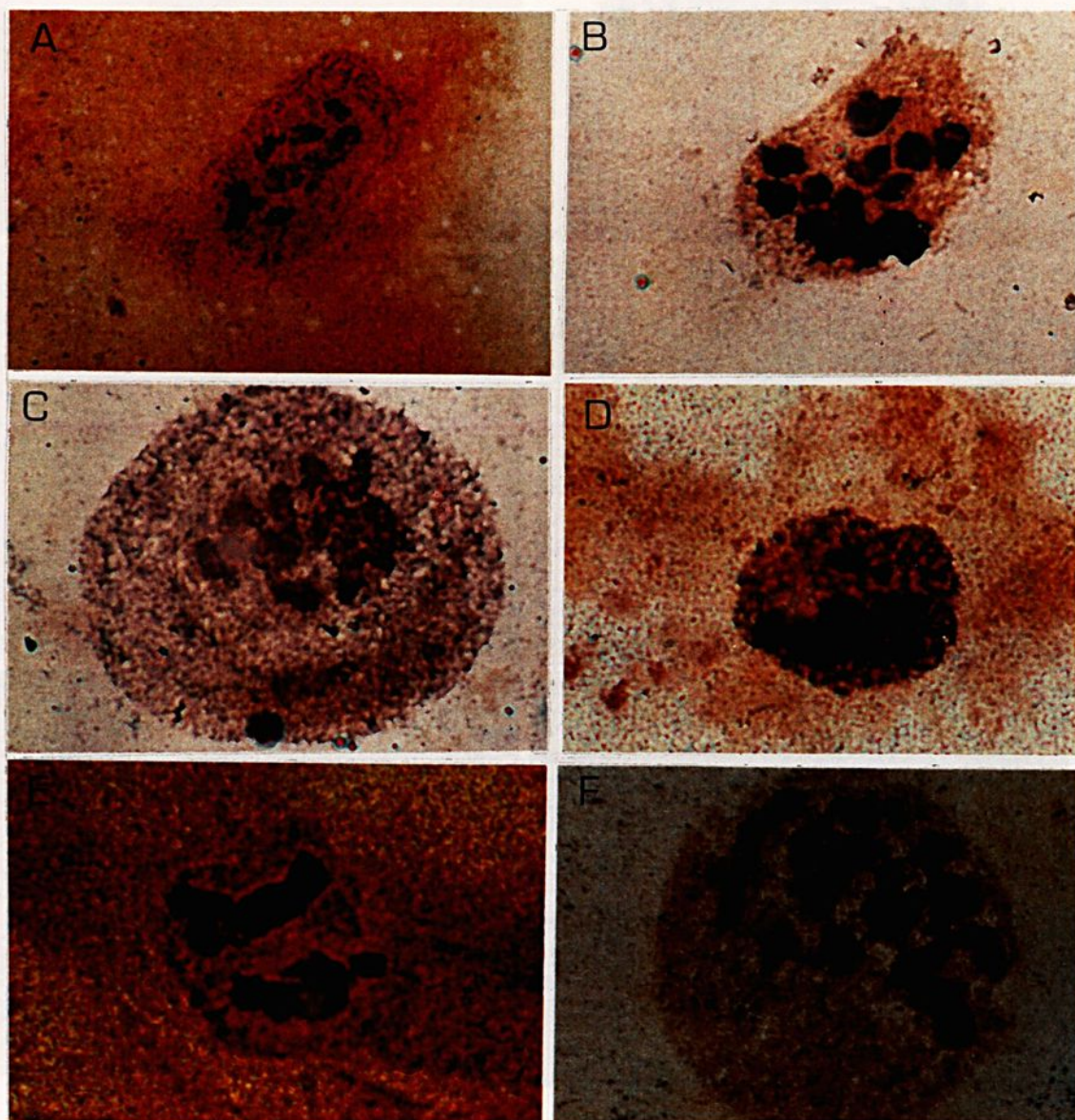
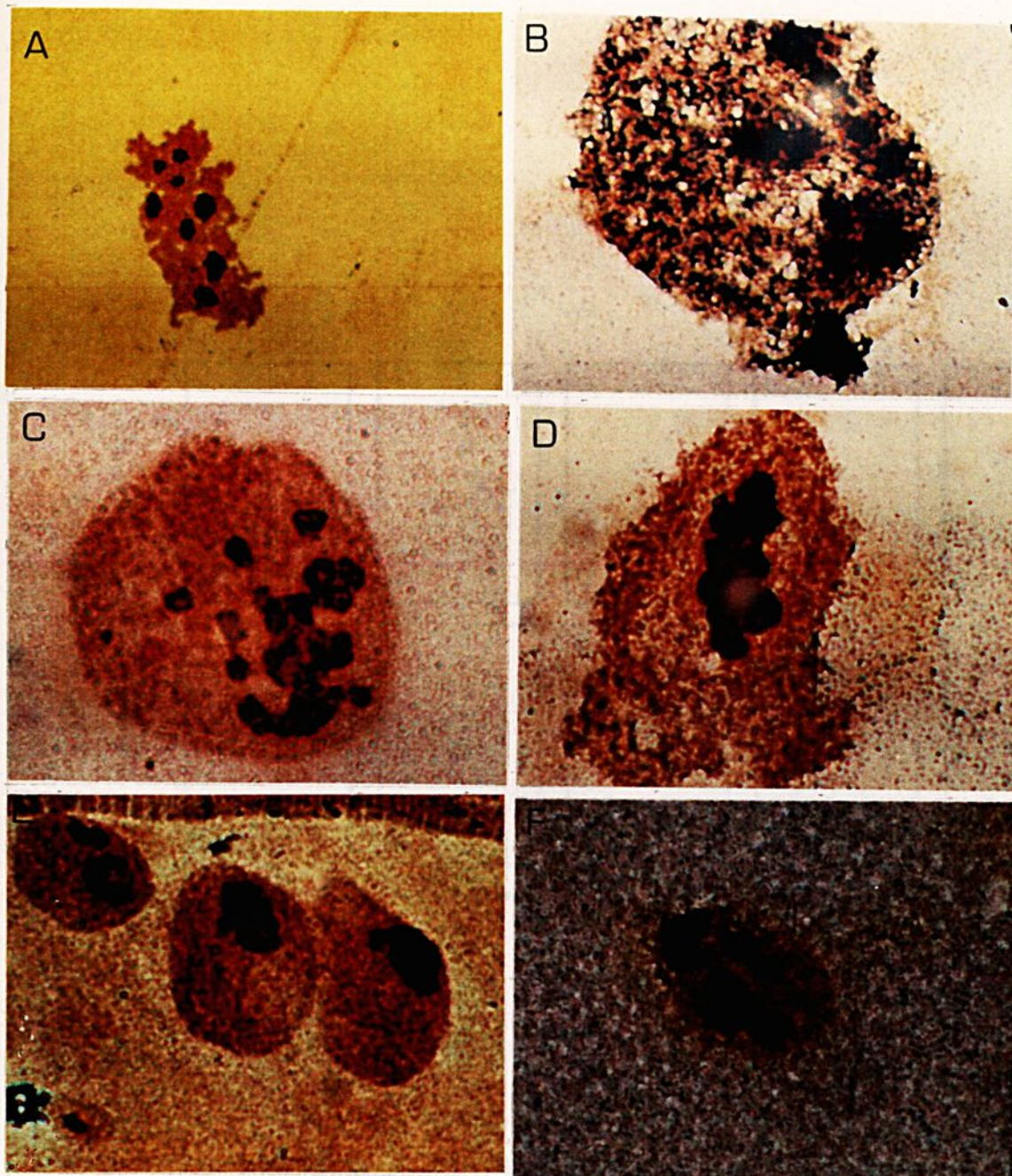


Figura 3: Núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* machos, submetidos a diferentes condições de alimentação. Coloração: Impregnação pelo nitrato de prata: **A:** Recém-alimentados. Corpúsculos nucleolares bem definidos, distribuídos normalmente pelo núcleo. Notar impregnação diferencial em algumas regiões nucleolares. **B:** 7 dias de jejum. Notar início de fusão dos corpúsculos nucleolares. **C:** 14 dias de jejum. Observa-se um aumento da área nuclear e o início de fusão dos corpúsculos nucleolares dispostos na região central do núcleo. **D:** 21 dias de jejum. Ocorre fusão total dos corpúsculos nucleolares e seu deslocamento desses para a extremidade do núcleo. **E:** 28 dias de jejum. Notar fusão nuclear e nucleolar. **F:** realimentação após 30 dias de jejum. Observa-se aumento da área nuclear e início de fusão dos corpúsculos nucleolares.



(A) e fêmeas (B) de *Rhodnius prolixus* submetidos a diferentes condições de alimentação (0: recém-alimentado, 7, 14, 21 e 28 dias de jejum). Coloração: nitrato de prata.

Figura 4: Núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* fêmeas, submetidas a diferentes condições de alimentação. Coloração: Impregnação pelo nitrato de prata. **A:** Recém-alimentados. Notar que os corpúsculos nucleolares estão bem definidos e localizados aleatoriamente no núcleo. **B:** 7 dias de jejum. Ocorre aumento da área nuclear, descompactação da cromatina e início de fusão nucleolar. **C:** 14 dias de jejum. Observa-se núcleo com delimitação bem definida, com corpúsculos nucleolares fusionados e deslocados para a extremidade. **D:** 21 dias de jejum. Núcleo com delimitação irregular e com corpúsculos nucleolares em adiantado estado de fusão. **E:** 28 dias de jejum. Notar decréscimo da área nuclear e corpúsculos nucleolares totalmente fusionados. **F:** realimentação após 30 dias de jejum. Notar fusão parcial dos corpúsculos nucleolares e a localização desses na periferia do núcleo.

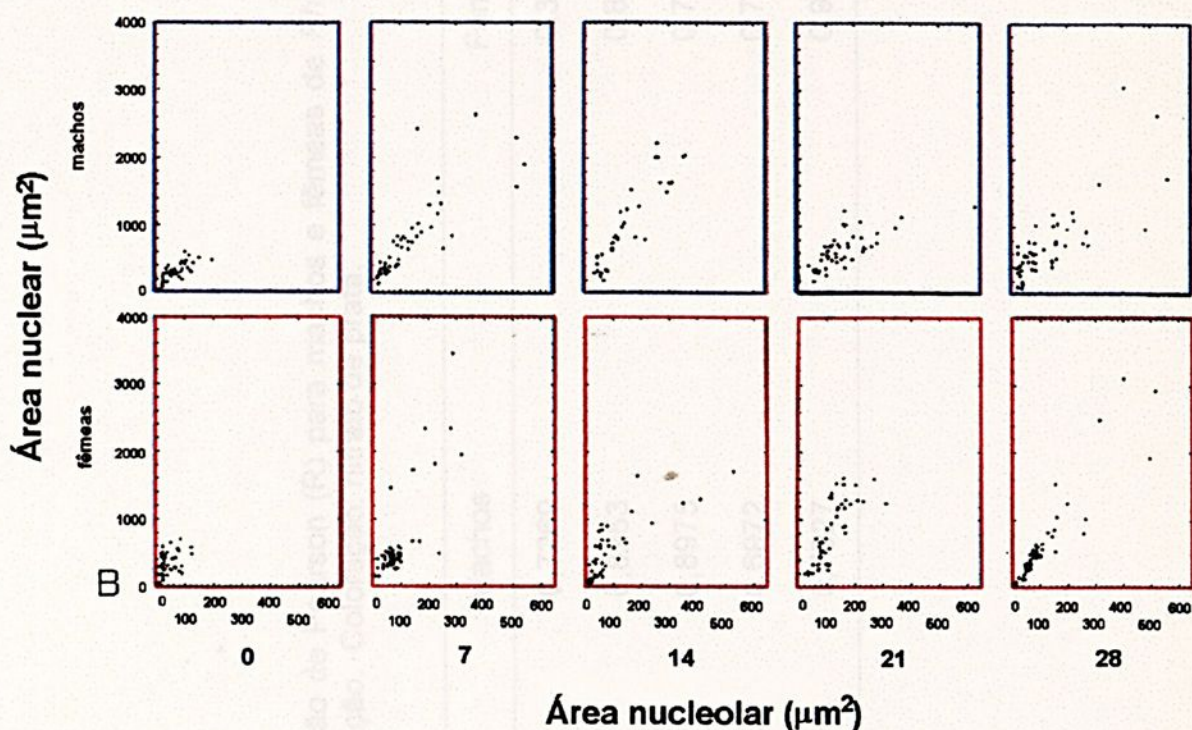


Figura II: Gráfico de dispersão dos dados das áreas nucleares e nucleolares (μm^2) dos túbulos de Malpighi de machos (A) e fêmeas (B) de *Rhodnius prolixus* submetidos a diferentes condições de alimentação (0: recém-alimentado; 7, 14, 21 e 28 dias de jejum). Coloração: nitrato de prata.

Tabela 3: Valores coeficientes de correlação de Pearson (R) para machos e fêmeas de *Rhodnius prolixus* em diferentes condições de alimentação. Coloração: nitrato de prata.

Condição Alimentar (dias de jejum)		Machos	Fêmeas	Valor-p
n	0	47	45	0,7269
Média	7	62,87	104,04	0,8253
Mediana	14	59,5	89,5	0,8028
Desvio padrão	21	33,57	76,71	0,8975
Mínimo	28	9,5	18	0,6972
Máximo		151	288,5	0,7927

* mesmo valor-p obtido para teste da Mediana

Tabela 4: Estatísticas descritivas e valor-p para ANOVA referentes aos dados das áreas nucleolares das células dos túbulos de Malpighi de machos adultos de *Rhodnius prolixus*, submetidos a diferentes condições de alimentação. Coloração: nitrato de prata. Área nucleolar = μm^2 .

Estatística	Alimentado	1s de Jejum	2s de Jejum	3s de Jejum	4s de Jejum	Valor-p
n	47	45	50	47	46	
Média	62,87	104,04	137,8	151,38	105,95	< 0,0001*
Mediana	59,5	89,5	109,5	134,5	79,5	
Desvio padrão	33,57	76,71	90,79	94,33	79,18	
Mínimo	9,5	18	31,5	36	16,5	
Máximo	151	286,5	355,5	625,5	317	
IC (95%)	53,02; 72,72	80,99; 127,09	111,99; 163,60	123,69; 179,08	82,43; 129,46	

* mesmo valor-p obtido para teste da Mediana

Tabela 5: Estatísticas descritivas e valor-p para ANOVA referentes aos dados das áreas nucleolares das células dos túbulos de Malpighi de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus*, submetidas a diferentes condições de alimentação. Coloração: nitrato de prata. Área nucleolar = μm^2 .

Estatística	Alimentado	1s de Jejum	2s de Jejum	3s de Jejum	4s de Jejum	Valor-p
n	48	38	44	49	42	
Média	35,67	65,17	49,03	112,33	75,69	< 0,0001*
Mediana	25,25	69,75	46,25	105	70,75	
Desvio padrão	22,97	24,92	31,64	53,73	36,12	
Mínimo	6	10,5	10,5	21,5	7,5	
90	100,5	144	268	157,5	317	
IC (95%)	28,99; 42,33	56,98; 73,36	39,41; 58,66	96,89; 127,76	64,43; 86,95	

* mesmo valor-p obtido para teste da Mediana

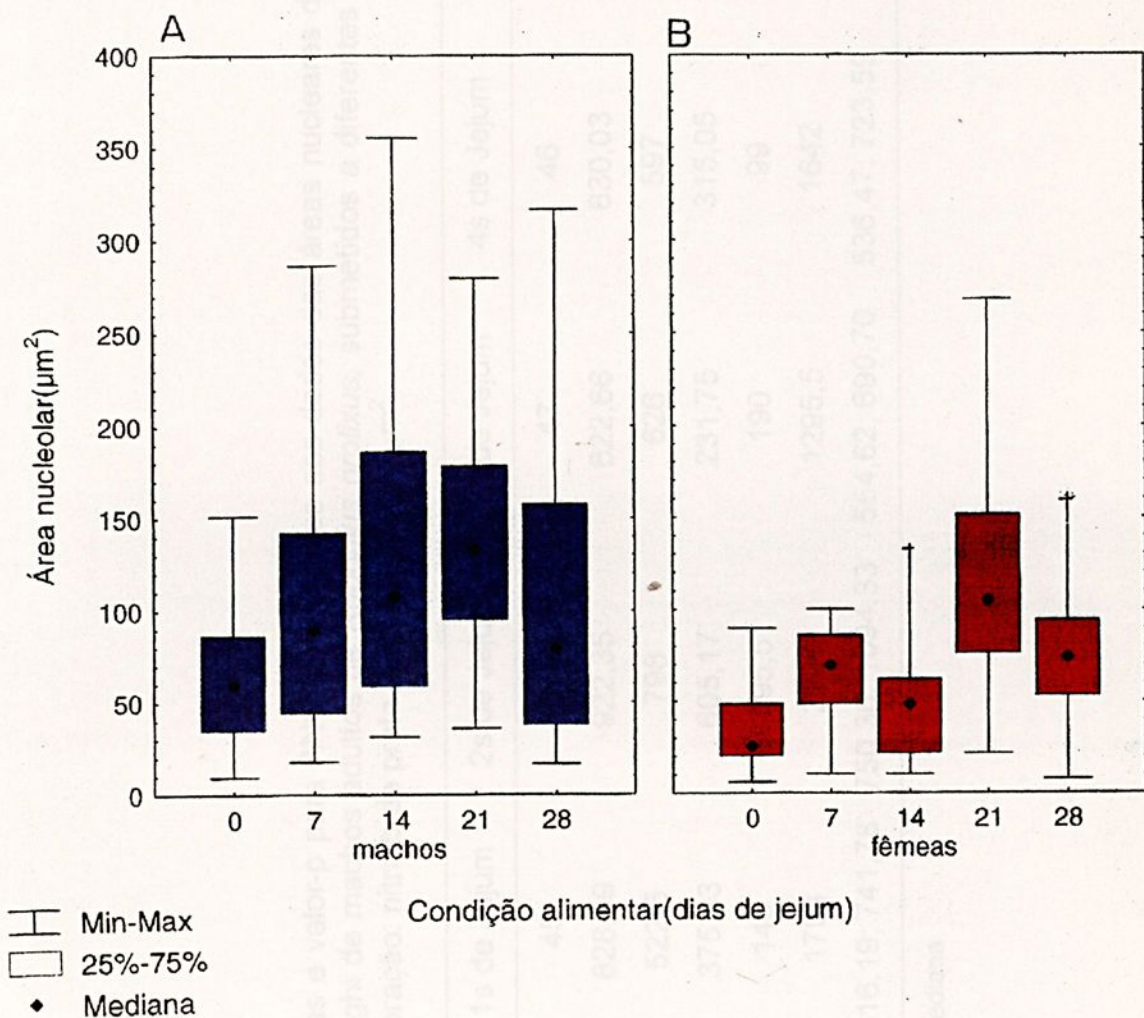


Figura III: Representação esquemática ("Box plot") das medianas das áreas nucleolares (μm^2), das células dos túbulos de Malpighi de insetos adultos de *Rhodnius prolixus* (A-machos; B-fêmeas), sob diferentes condições de alimentação (0: indivíduo alimentado; 7, 14, 21 e 28: período em dias de jejum). Coloração: nitrato de prata.

Tabela 6: Estatísticas descritivas e valor-p para ANOVA referentes aos dados das áreas nucleares das células dos túbulos de Malpighi de machos adultos de *Rhodnius prolixus*, submetidos a diferentes condições de alimentação. Coloração: nitrato de prata. Área nuclear = μm^2 .

Estatística	Alimentado	1s de Jejum	2s de Jejum	3s de Jejum	4s de Jejum	Valor-p
n	47	45	50	47	46	
Média	297,73	628,99	922,35	622,66	630,03	< 0,0001*
Mediana	300	522,5	798	626	597	
Desvio padrão	103,5	375,43	605,17	231,75	315,05	
Mínimo	55	140	195,5	190	99	
Máximo	515	1704	2221	1295,5	1642	
IC (95%)	267,34; 328,12	516,19; 741,78	750,36; 1094,33	554,62; 690,70	536,47; 723,59	

* mesmo valor-p obtido para teste da Mediana

Tabela 7: Estatísticas descritivas e valor-p para ANOVA referentes aos dados das áreas nucleares das células dos túbulos de Malpighi de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus*, submetidas a diferentes condições de alimentação. Coloração: nitrato de prata. Área nuclear = μm^2 .

Estatística	Alimentado	1s de Jejum	2s de Jejum	3s de Jejum	4s de Jejum	Valor-p
n	48	38	44	49	42	
Média	341,5	391,45	389,64	781,37	434,67	< 0,0001*
Mediana	315,5	395,5	356	667,5	453,5	
Desvio padrão	145,2	98,5	263,88	460,88	221,41	
Mínimo	55	155	48,5	189,5	55,5	
Máximo	704	563,5	929	1611,5	1048,5	
IC (95%)	299,35; 383,67	359,07; 423,82	309,41; 469,86	648,98; 913,75	365,67; 503,66	

* mesmo valor-p obtido para teste da Mediana

3.1.- Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC).

3.1.1.- Estudo da cromatina

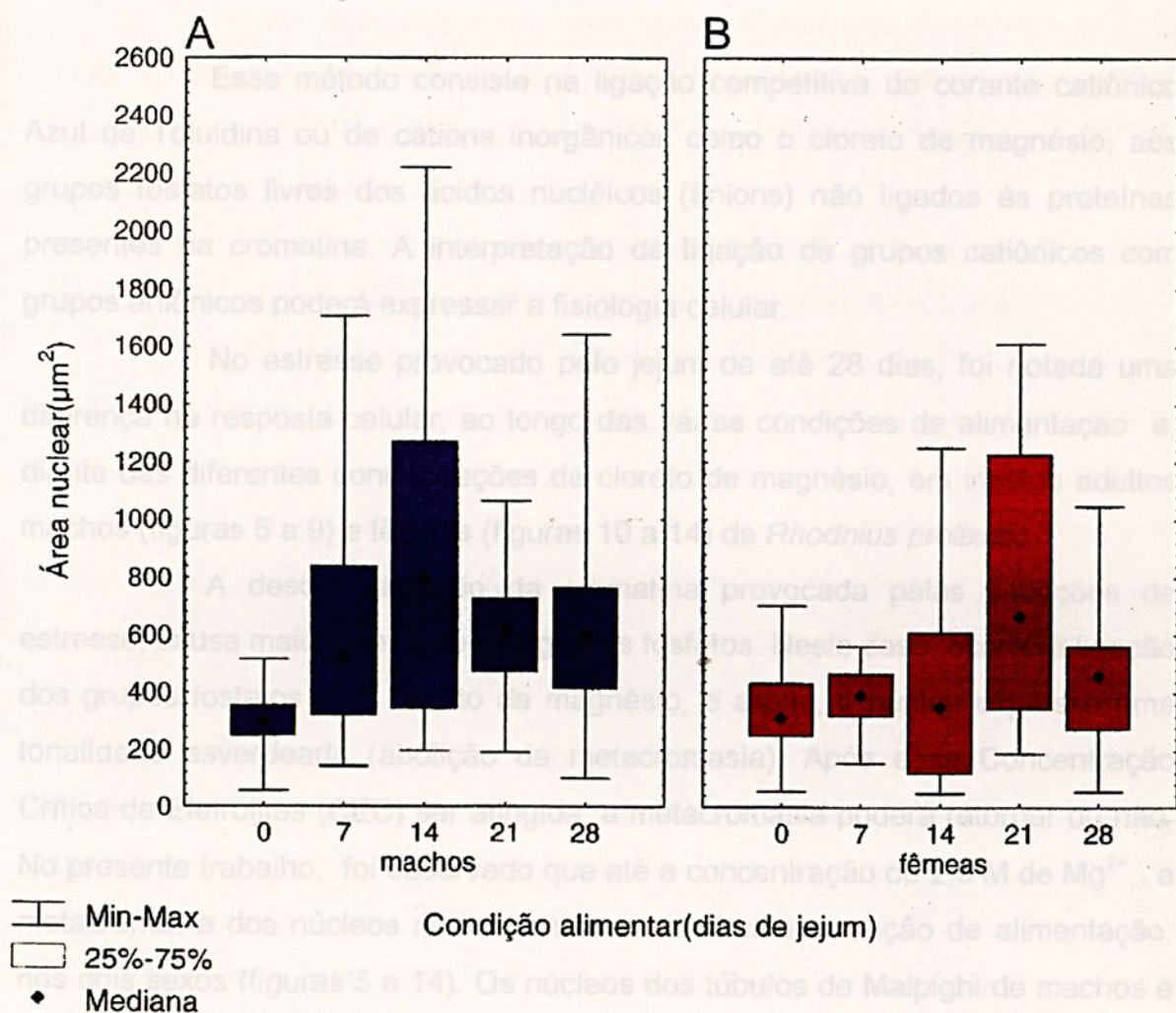


Figura IV: Representação esquemática ("Box plot") das medianas das áreas nucleares (μm^2), das células dos túbulos de Malpighi de insetos adultos de *Rhodnius prolixus* (A-machos; B-fêmeas), sob efeito de diferentes condições de alimentação (0: indivíduo alimentado; 7, 14, 21 e 28: período em dias de jejum). Coloração: nitrato de prata.

3.1₃- Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC).

3.1₃₁- Estudo da cromatina

Esse método consiste na ligação competitiva do corante catiônico Azul de Toluidina ou de cátions inorgânicos como o cloreto de magnésio, aos grupos fosfatos livres dos ácidos nucleicos (ânions) não ligados às proteínas presentes na cromatina. A interpretação da ligação de grupos catiônicos com grupos aniônicos poderá expressar a fisiologia celular.

No estresse provocado pelo jejum de até 28 dias, foi notada uma diferença na resposta celular, ao longo das várias condições de alimentação e, diante das diferentes concentrações de cloreto de magnésio, em insetos adultos machos (figuras 5 a 9) e fêmeas (figuras 10 a 14) de *Rhodnius prolixus*.

A descompactação da cromatina provocada pelas situações de estresse, causa maior liberação dos grupos fosfatos. Neste caso, ocorrerá ligação dos grupos fosfatos com cloreto de magnésio, e assim, o núcleo expressa uma tonalidade esverdeada (abolição da metacromasia). Após essa Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) ser atingida, a metacromasia poderá retornar ou não. No presente trabalho, foi observado que até a concentração de 2,0 M de Mg^{2+} , a metacromasia dos núcleos não retornou em nenhuma condição de alimentação, nos dois sexos (figuras 5 a 14). Os núcleos dos túbulos de Malpighi de machos e fêmeas dos triatomíneos que foram submetidos à técnica controle, isto é, solução de Azul de Toluidina (pH 4,0), em todas as diferentes situações de alimentação, apresentaram metacromasia, isto é, coloração azul violeta (figuras 5 a 14 - controle: Azul de Toluidina).

Em várias situações ficou evidenciada a presença dos corpúsculos nucleolares que destacaram-se da cromatina. Nos núcleos dos machos esses corpúsculos são vistos principalmente nas figuras 6 (AT + Mg^{2+} 0,4M) e 8 (AT + Mg^{2+} 0,01 M a 0,3 M) e nos núcleos das fêmeas nas figuras 10 (AT + Mg^{2+} 0,09 M; 0,1 M; 0,4 M e 0,5 M) e 11 (AT + Mg^{2+} 0,3 M e 0,5 M).

A tabela 8 apresenta um resumo dos resultados obtidos pelo método da CEC em machos adultos submetidos a diferentes condições de alimentação. A metacromasia é representada pela cor azul e a CEC pela cor verde.

Na condição de recém-alimentado e após 7 dias de jejum, a CEC foi obtida na concentração de 0,5 M. Nos períodos de 14 e 21 dias de jejum, a CEC foi atingida na concentração de 0,3 M de Mg^{2+} . Após 28 dias de jejum, a CEC foi obtida na concentração de 0,2 M de Mg^{2+} .

A diminuição das concentrações de Mg^{2+} para se atingir a CEC, durante o jejum, provavelmente indica a descompactação cromatinica.

A tabela 9, resume os resultados do método de CEC em fêmeas. Observa-se que na condição de alimentado, a CEC é obtida na concentração de 0,3 M de Mg^{2+} . Após 7 e 14 dias de jejum a CEC foi atingida na concentração de 0,2 M de Mg^{2+} , mas após 21 e 28 dias de jejum, a CEC voltou a ser obtida na concentração de 0,3 M de Mg^{2+} . Este método demonstra que a maior descompactação cromatinica, nas fêmeas, ocorreu após 7 e 14 dias de jejum (figuras 11 e 12).

Os insetos adultos, machos e fêmeas, foram realimentados após 30 dias de jejum, sacrificados e posteriormente os túbulos de Malpighi foram submetidos ao método de CEC (figuras 15 e 16). Os machos tiveram a CEC atingida (cromatina verde) na concentração de 0,3 M de Mg^{2+} e as fêmeas na concentração de 0,2 M de Mg^{2+} . Este fato indica que, a realimentação após 30 dias de jejum, não promove a recuperação normal do estado de compactação da cromatina. A tabela 10 resume esses dados obtidos após a realimentação.

O gráfico da figura V demonstra as diferenças do ponto de CEC que ocorreram em machos e fêmeas nas diferentes condições de alimentação. A CEC é obtida em concentrações menores em fêmeas do que em machos na condição de recém-alimentação, após 7 e 14 dias de jejum. Após 21 dias de jejum, a CEC é atingida nas mesmas concentrações de Mg^{2+} (0,3 M), em machos e fêmeas. Com 28 dias de jejum os núcleos dos túbulos de Malpighi dos machos atingiram o ponto de CEC na concentração de 0,2 M, e as fêmeas na concentração de 0,3 M

de Mg^{2+} . Os núcleos dos insetos realimentados tiveram uma inversão desses valores, ou seja, machos tiveram o ponto de CEC na concentração de 0,3 M e as fêmeas em 0,2 M de Mg^{2+} .

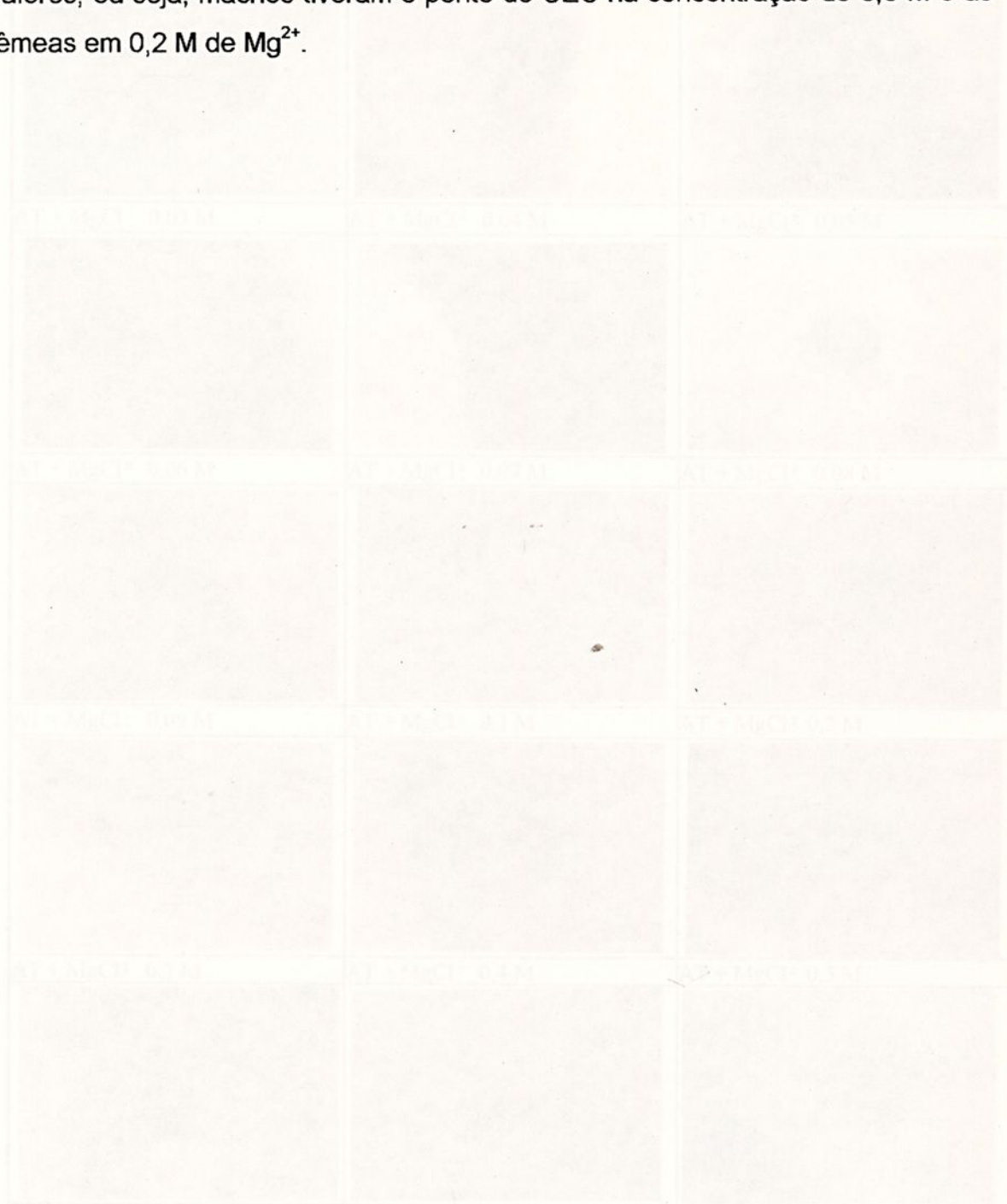


Figura 5. Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na corrente de saída dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (machos adultos) sob diferentes condições de concentração do ponto de CEC: 0,1 M a 0,3 M de Mg^{2+} em AT. A solução de NaCl (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação: 0,5 M.

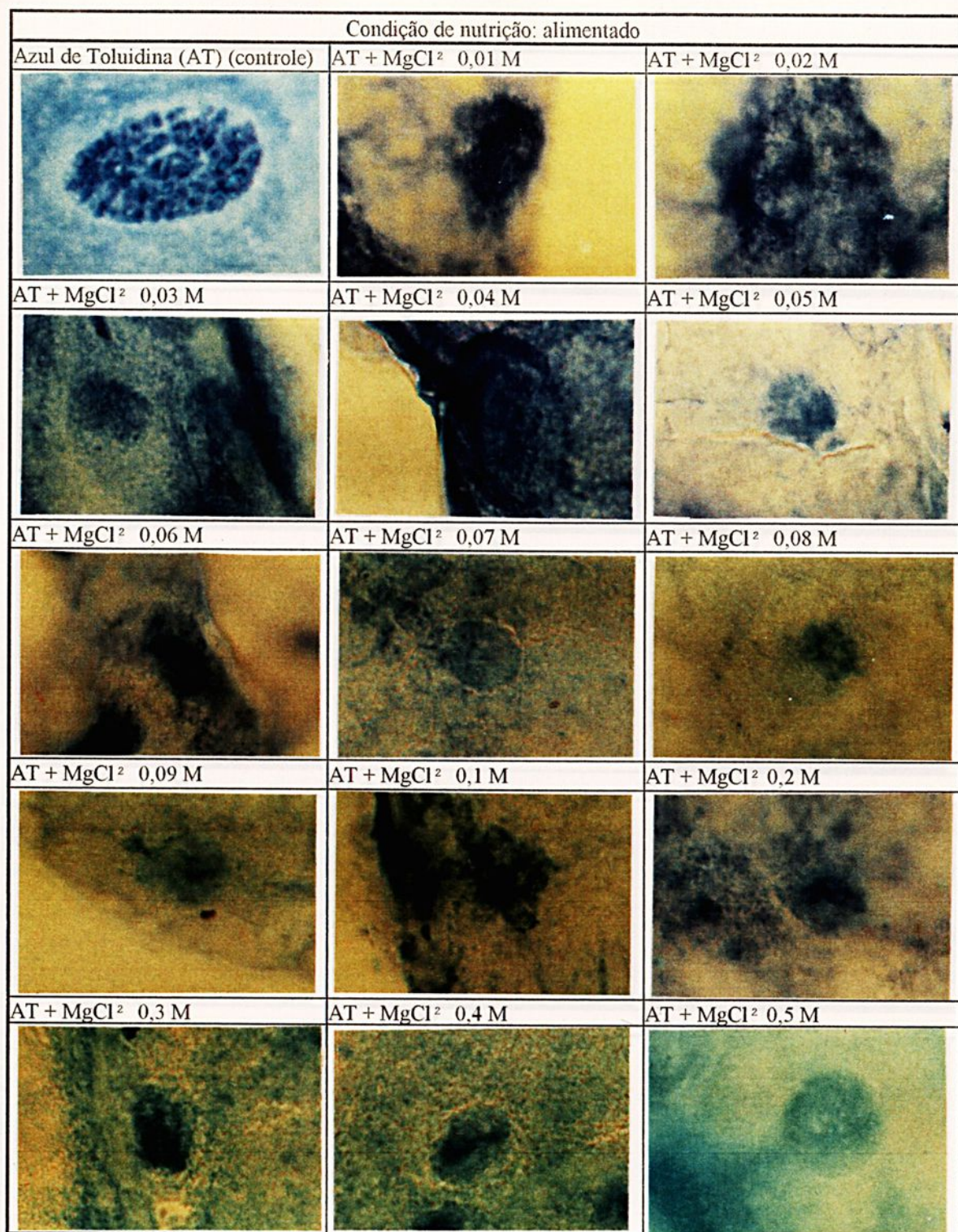


Figura 5: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (macho adulto), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT)-a pH 4.0. Condição de alimentação: alimentado. CEC em 0,5 M

Condição de nutrição 7 dias de jejum

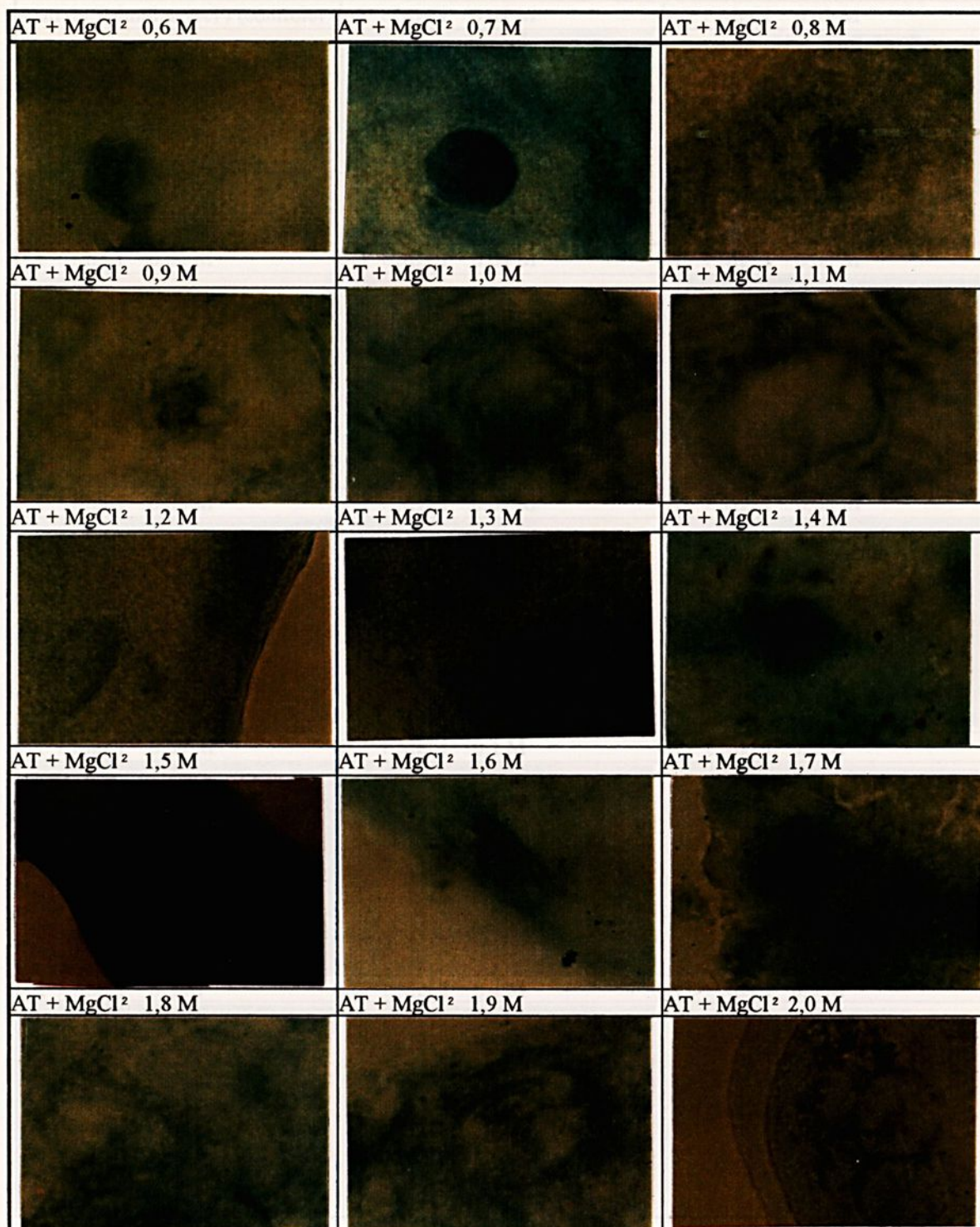


Figura 6. Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (macho adulto), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação 7 dias de jejum. CEC em 0,5 M

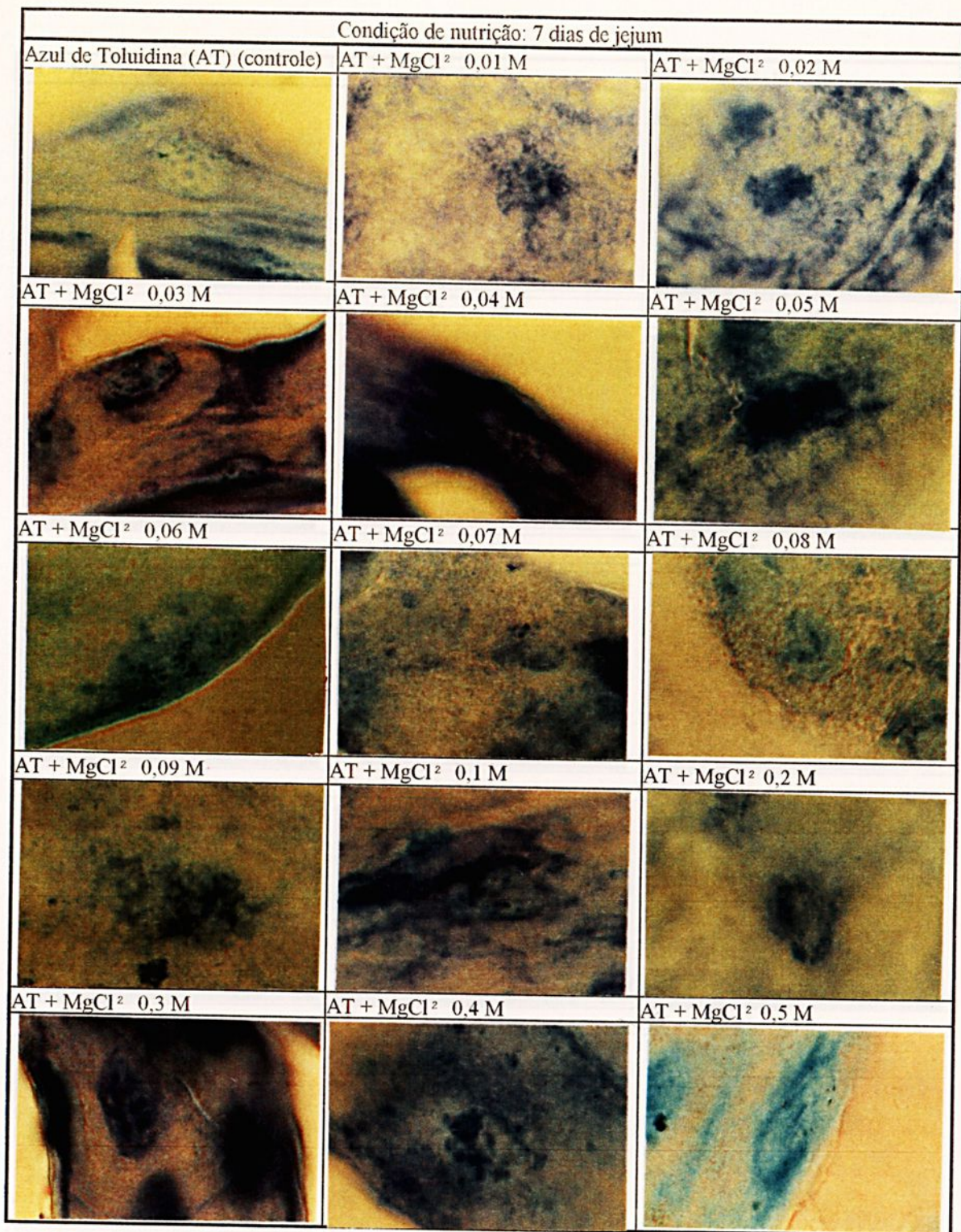


Figura 6: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (macho adulto), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: 7 dias de jejum. CEC em 0,5 M

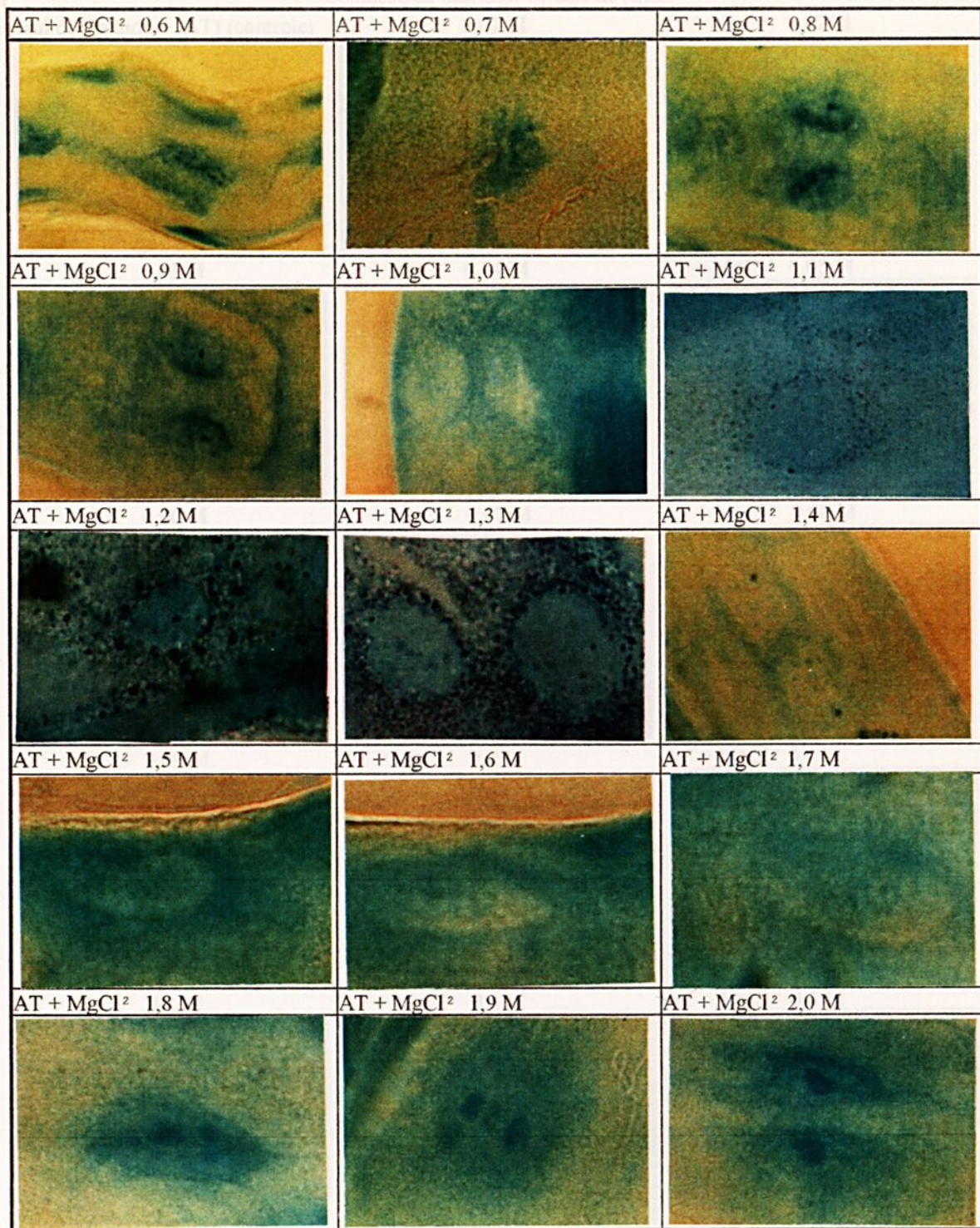


Figura 7: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos tórax de *Rhodnius prolixus* (inseto adulto) sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação: 14 dias de jejum. CEC em 0,3 M.

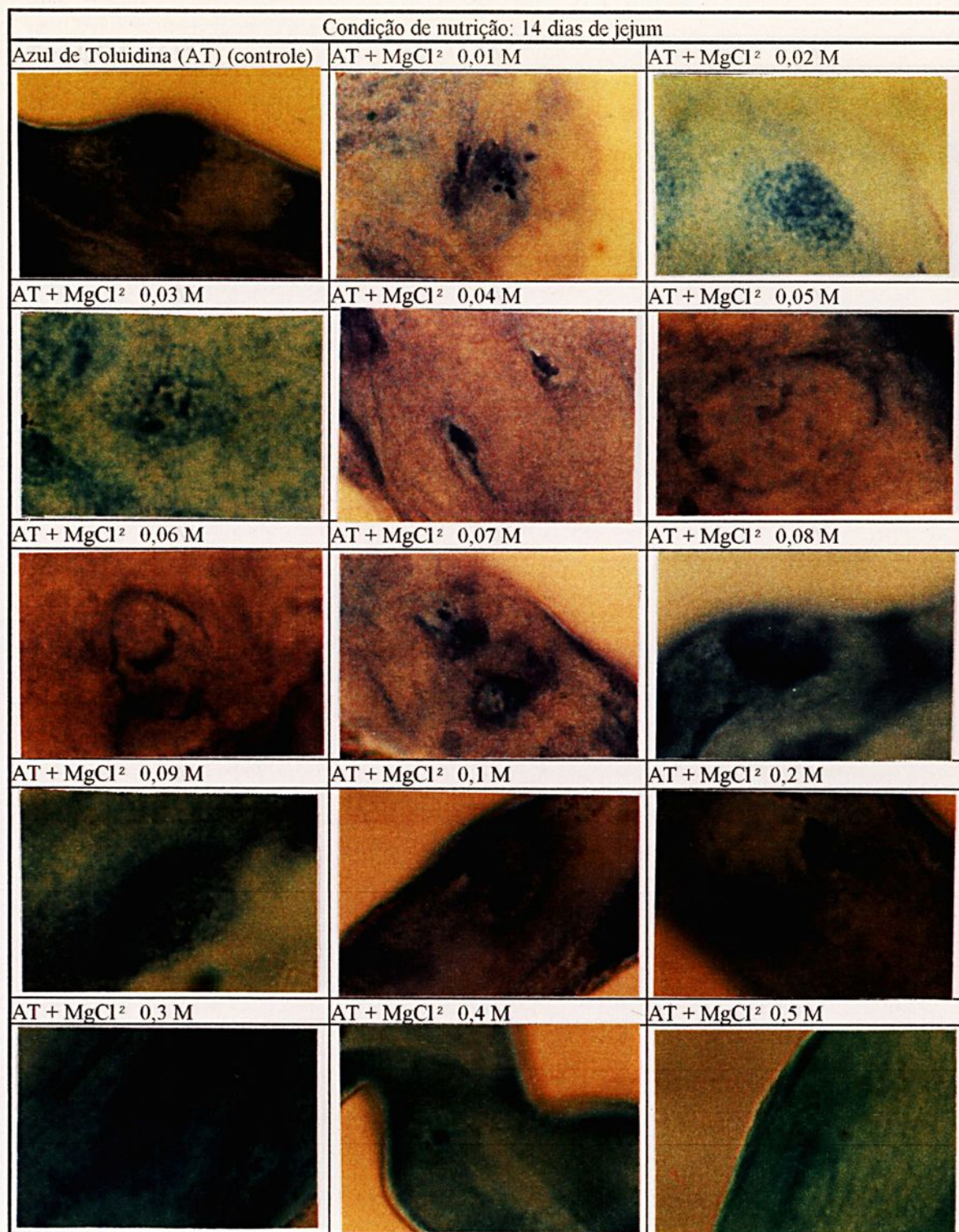


Figura 7: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (macho adulto), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: 14 dias de jejum. CEC em 0,3 M

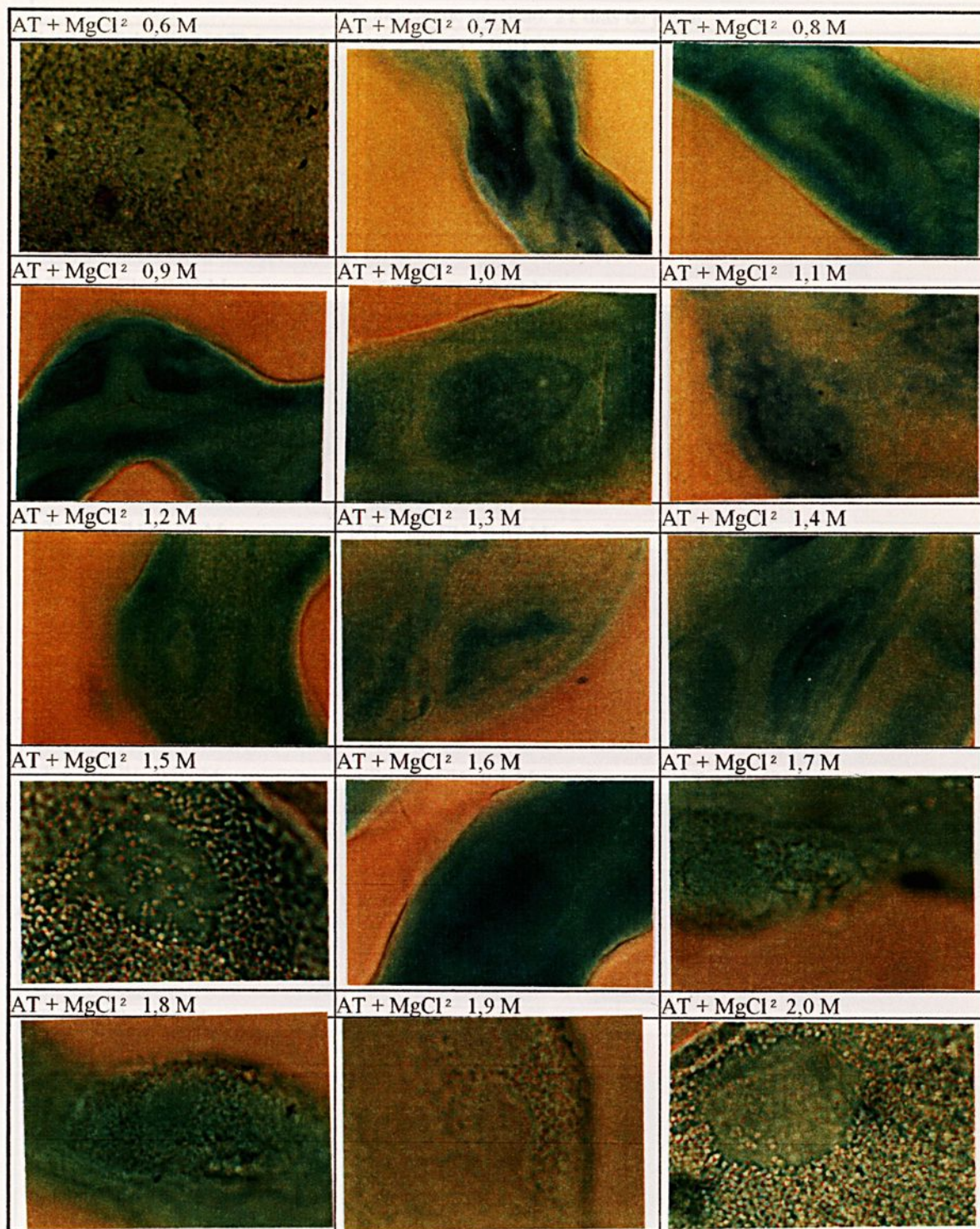


Figura 8: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (macho adulto), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,0...M a 2,0 M) em Azul de Tiluidinã (AT), a pH 4,0. Condição de alimentação: 21 dias de jejum. CEC em 0,3 M



Figura 8: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (macho adulto), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: 21 dias de jejum. CEC em 0,3 M

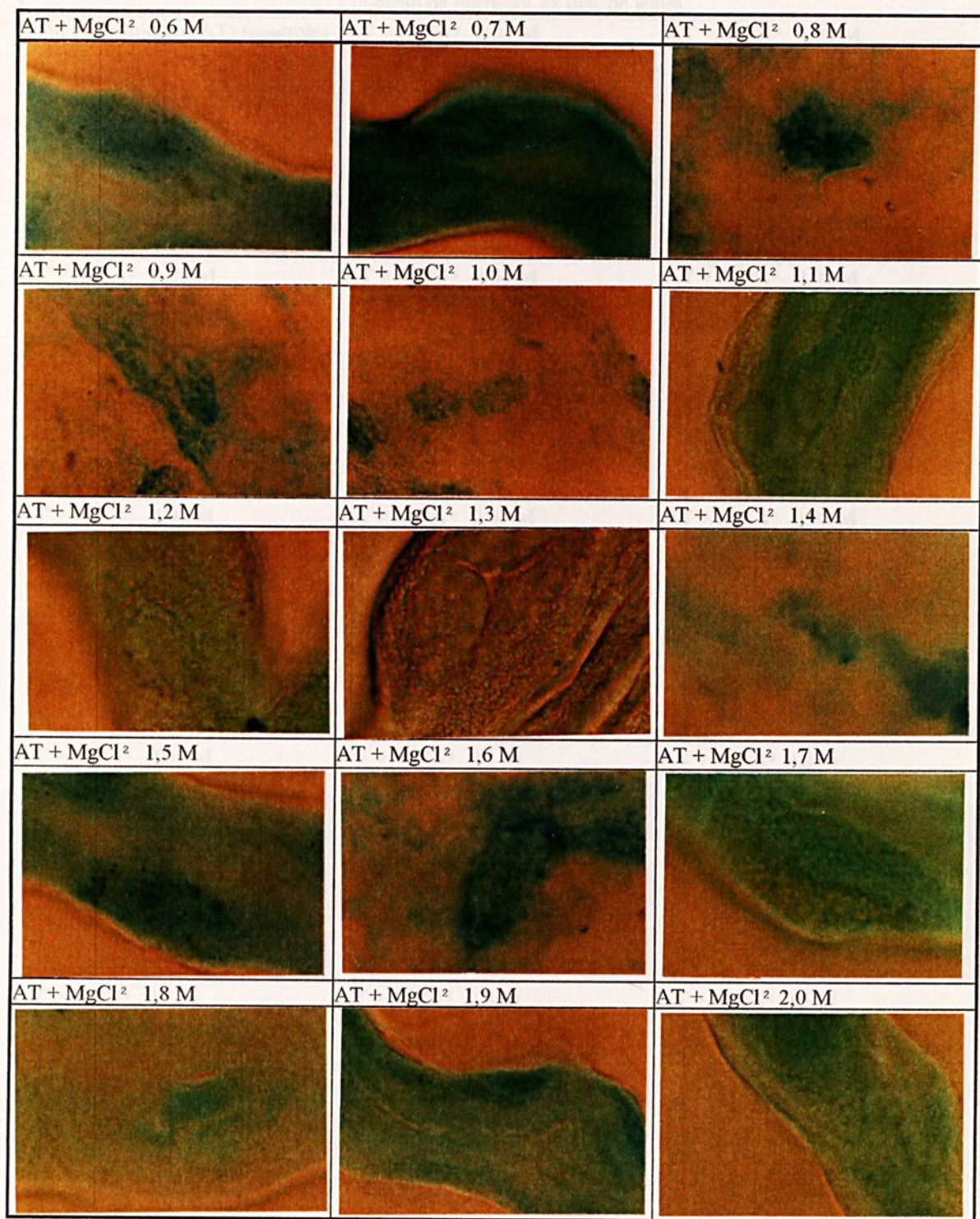


Figura 9. Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (macho adulto), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação: 26 dias de jejum. CEC em 0,2 M.

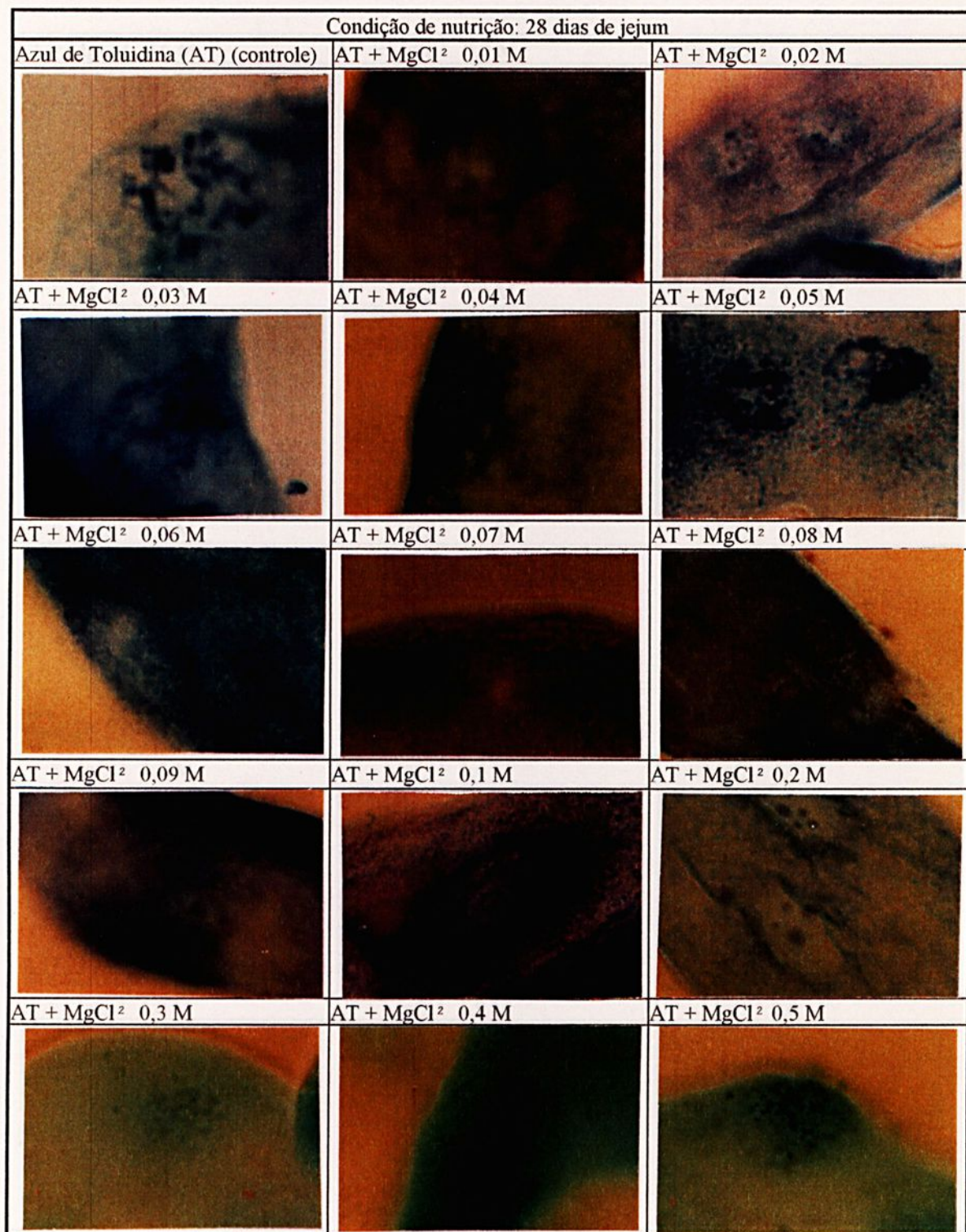


Figura 9: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (macho adulto), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: 28 dias de jejum. CEC em 0,2 M

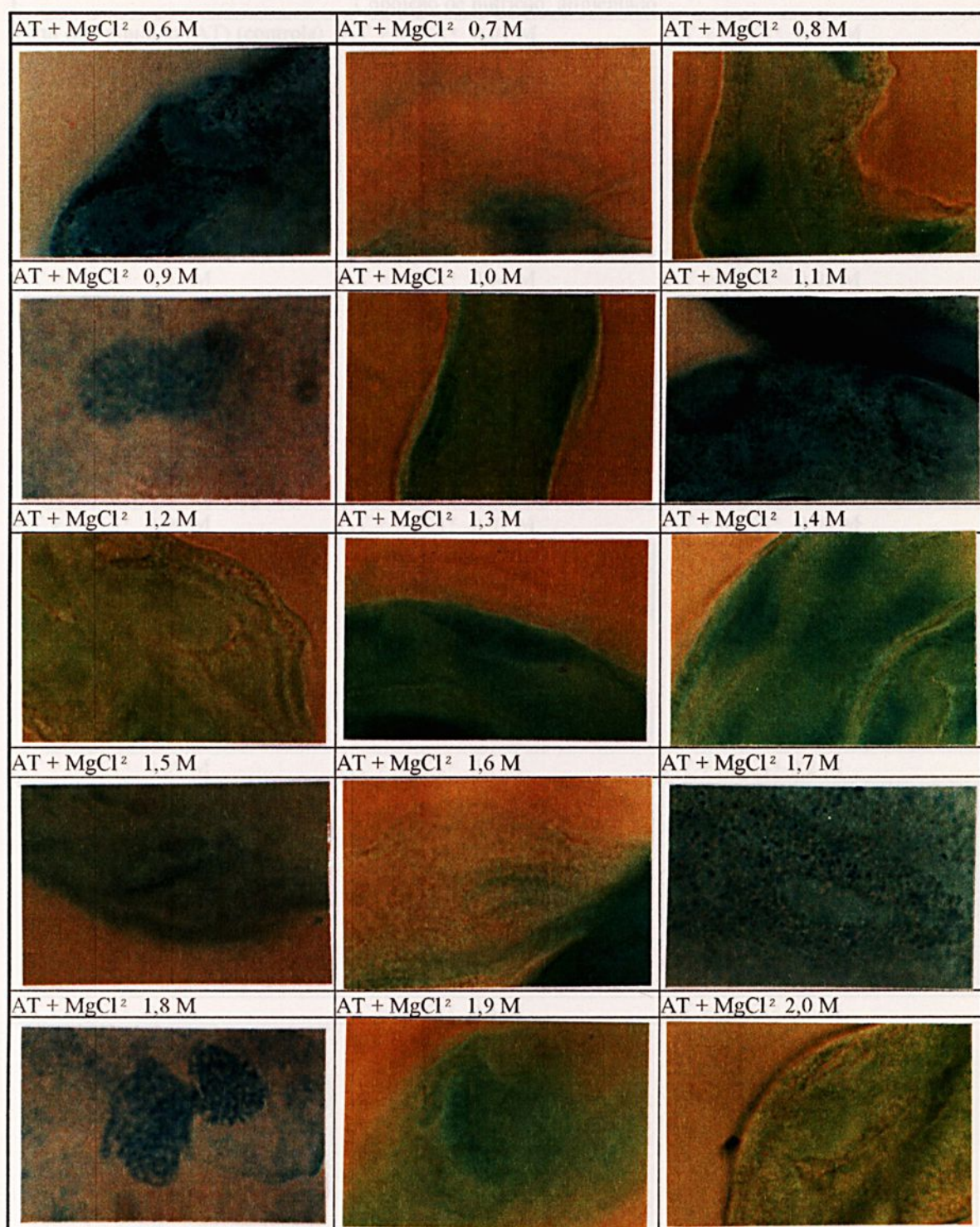


Figura 10: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromalina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} 0,01 M e 2,0 M) em Azul de toluidina (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação: alimentado CEC em 0,3 M.



Figura 10: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: alimentado. CEC em 0,3 M

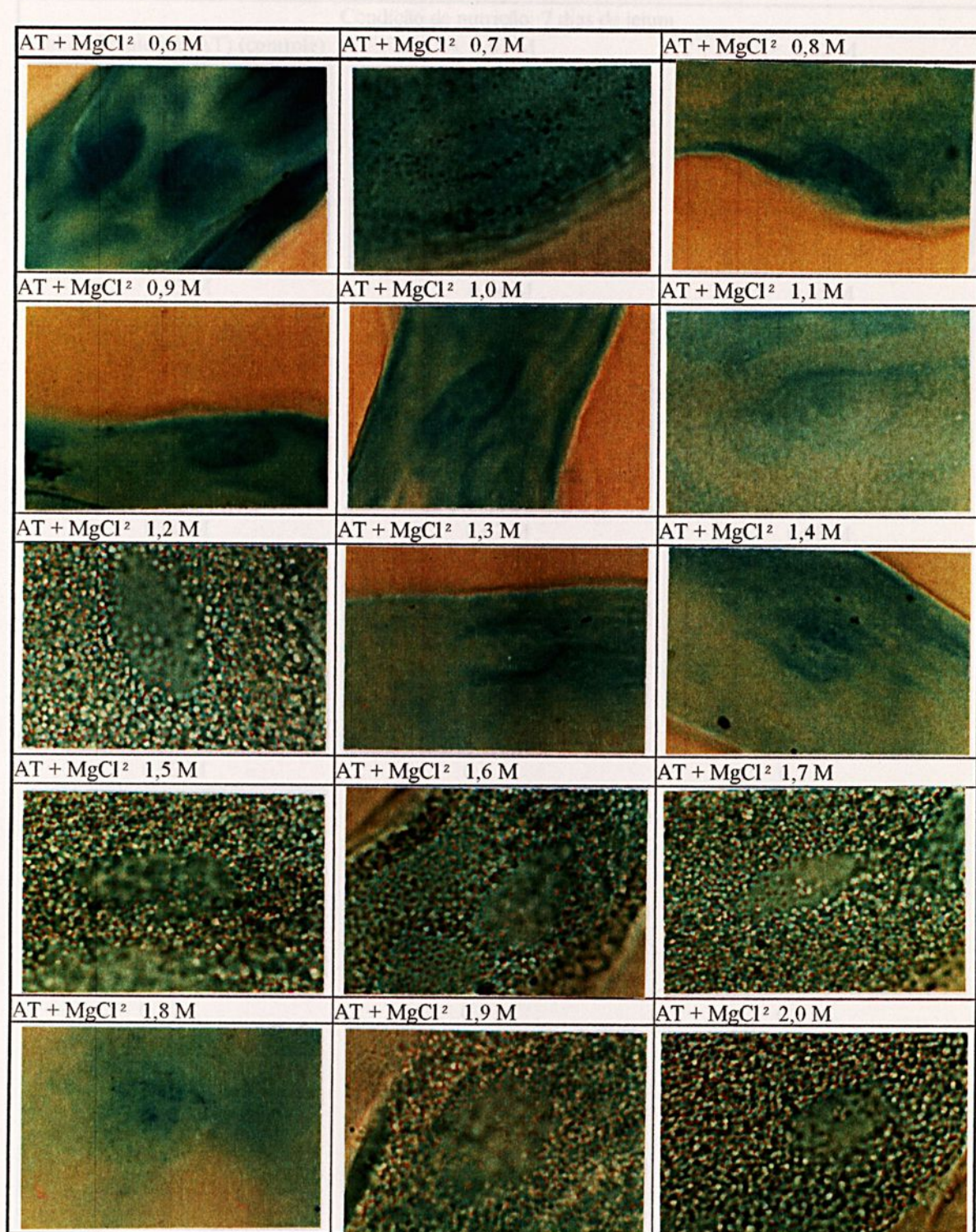


Figura 11: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação: 7 dias de jejum. CEC em 0,2 M.

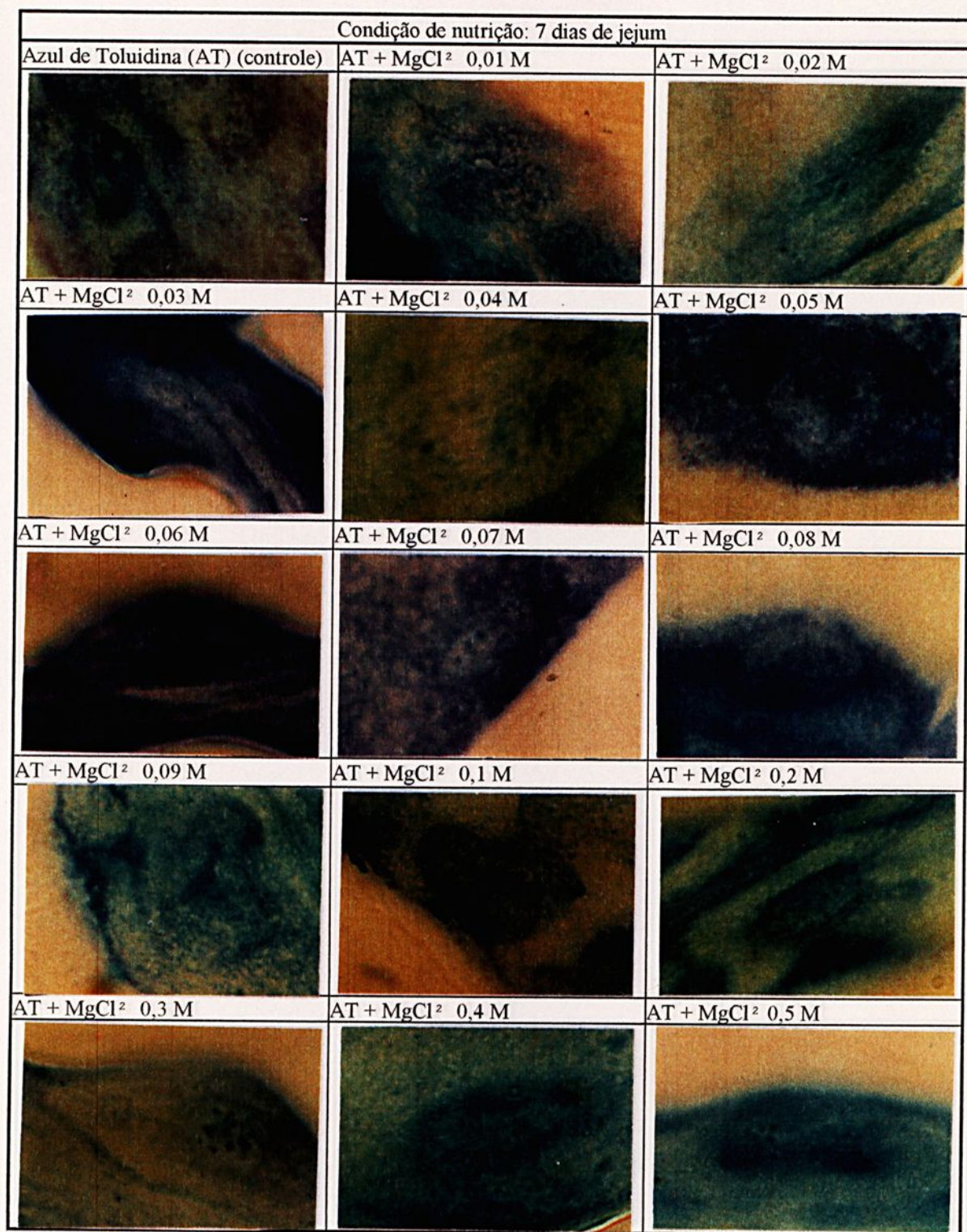


Figura 11: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: 7 dias de jejum. CEC em 0,2 M

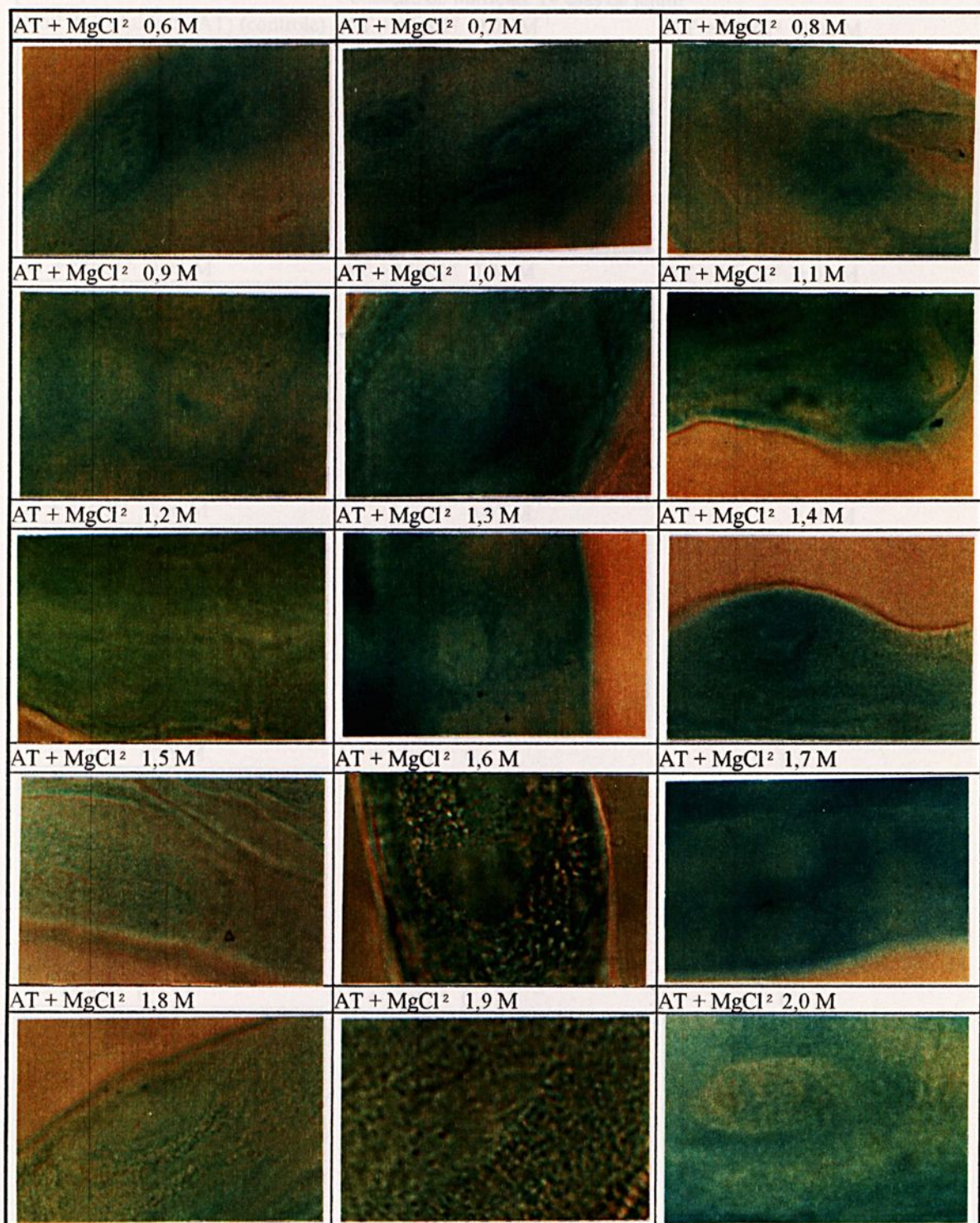


Figure 12: Resposta ao método de CEO (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmeas adultas), sob diferentes condições de concentrações de citrato de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação: 14 dias de jejum. CEO em 0,2 - 0,3 M

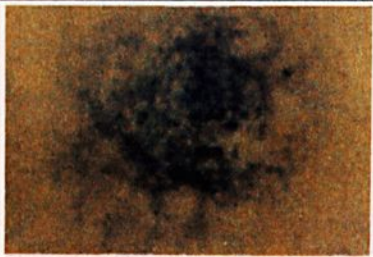
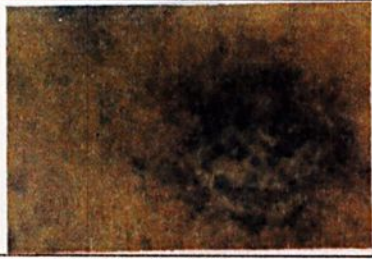
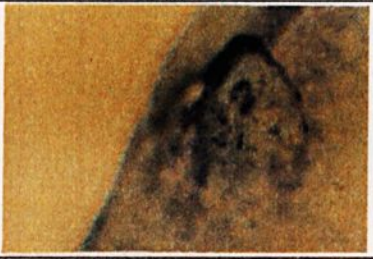
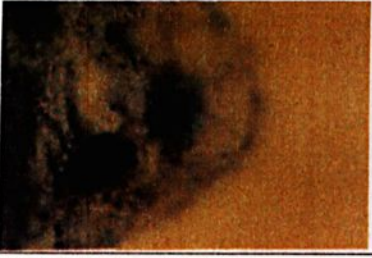
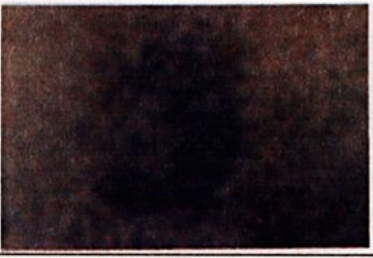
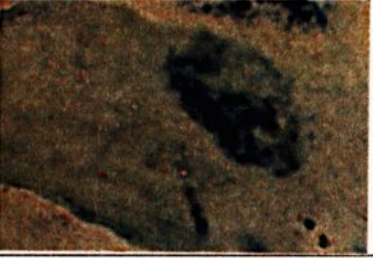
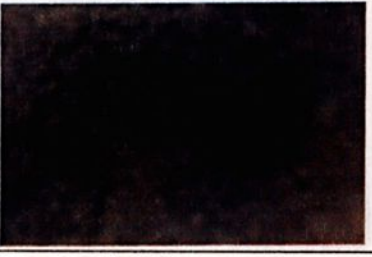
Condição de nutrição: 14 dias de jejum		
Azul de Toluidina (AT) (controle)	AT + MgCl^2 0,01 M	AT + MgCl^2 0,02 M
		
AT + MgCl^2 0,03 M	AT + MgCl^2 0,04 M	AT + MgCl^2 0,05 M
		
AT + MgCl^2 0,06 M	AT + MgCl^2 0,07 M	AT + MgCl^2 0,08 M
		
AT + MgCl^2 0,09 M	AT + MgCl^2 0,1 M	AT + MgCl^2 0,2 M
		
AT + MgCl^2 0,3 M	AT + MgCl^2 0,4 M	AT + MgCl^2 0,5 M
		

Figura 12: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: 14 dias de jejum. CEC em 0,2 - 0,3 M

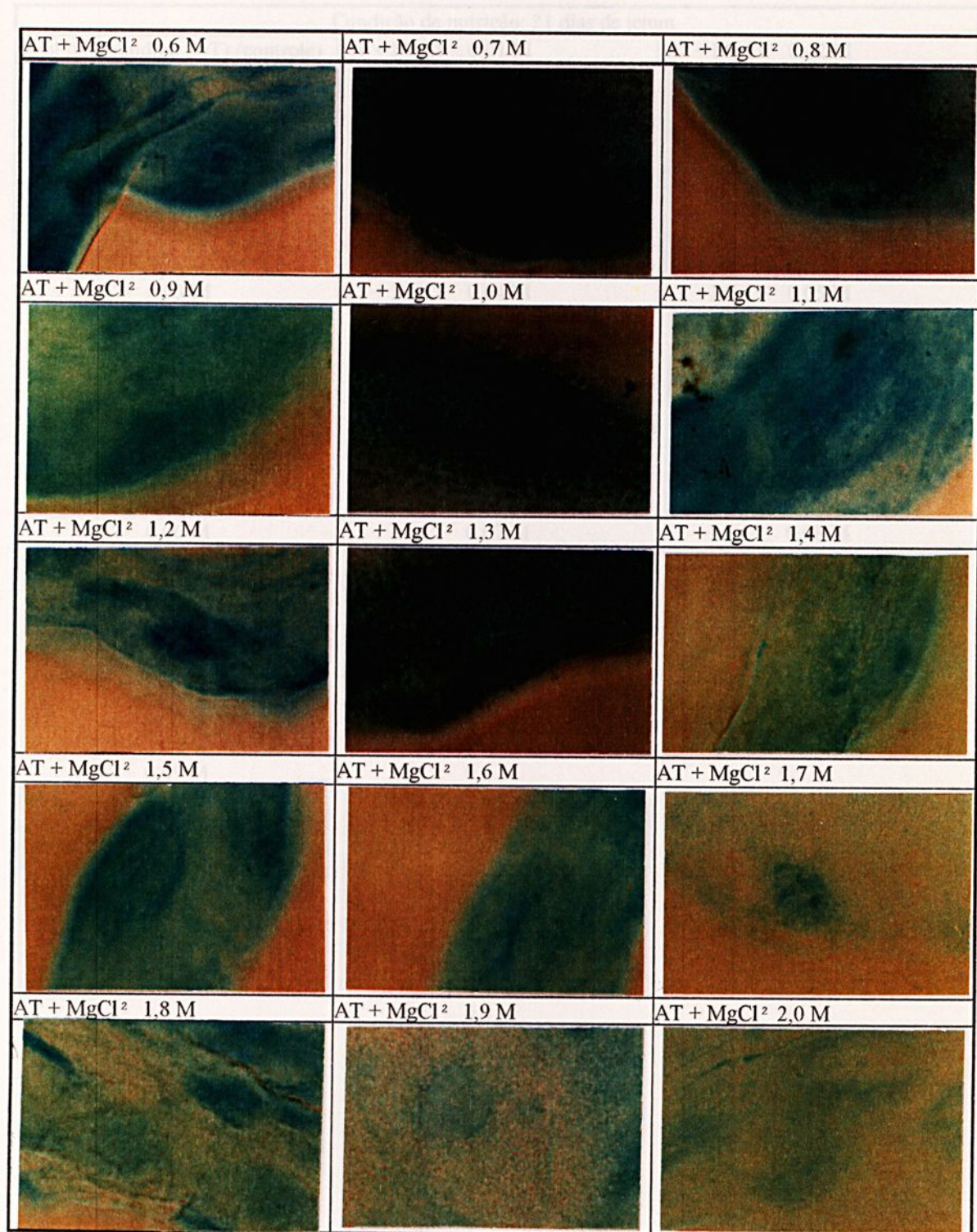


Figura 13: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromalina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação: 21 dias de jejum. CEC em 0,3 M.

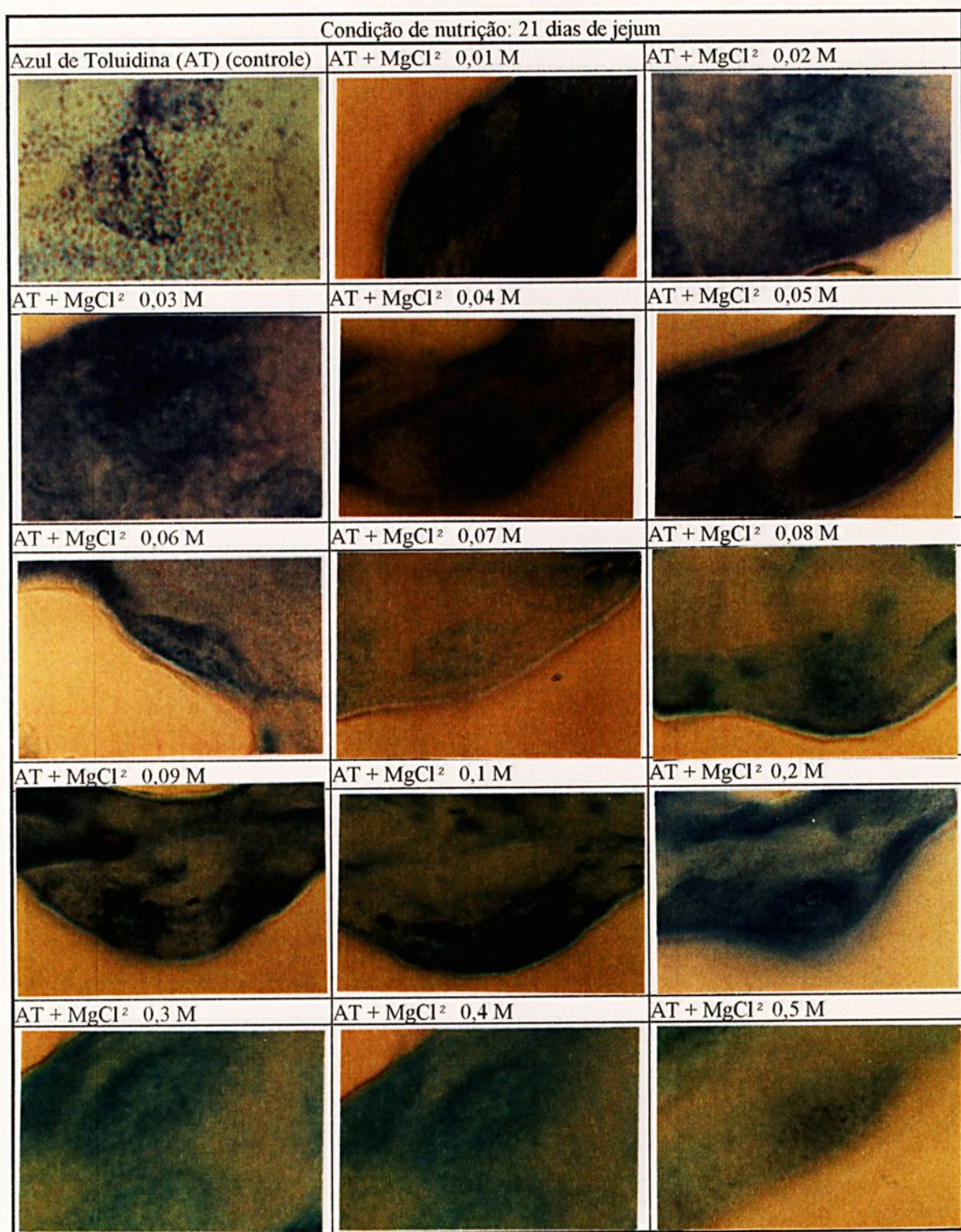


Figura 13: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: 21 dias de jejum. CEC em 0,3 M

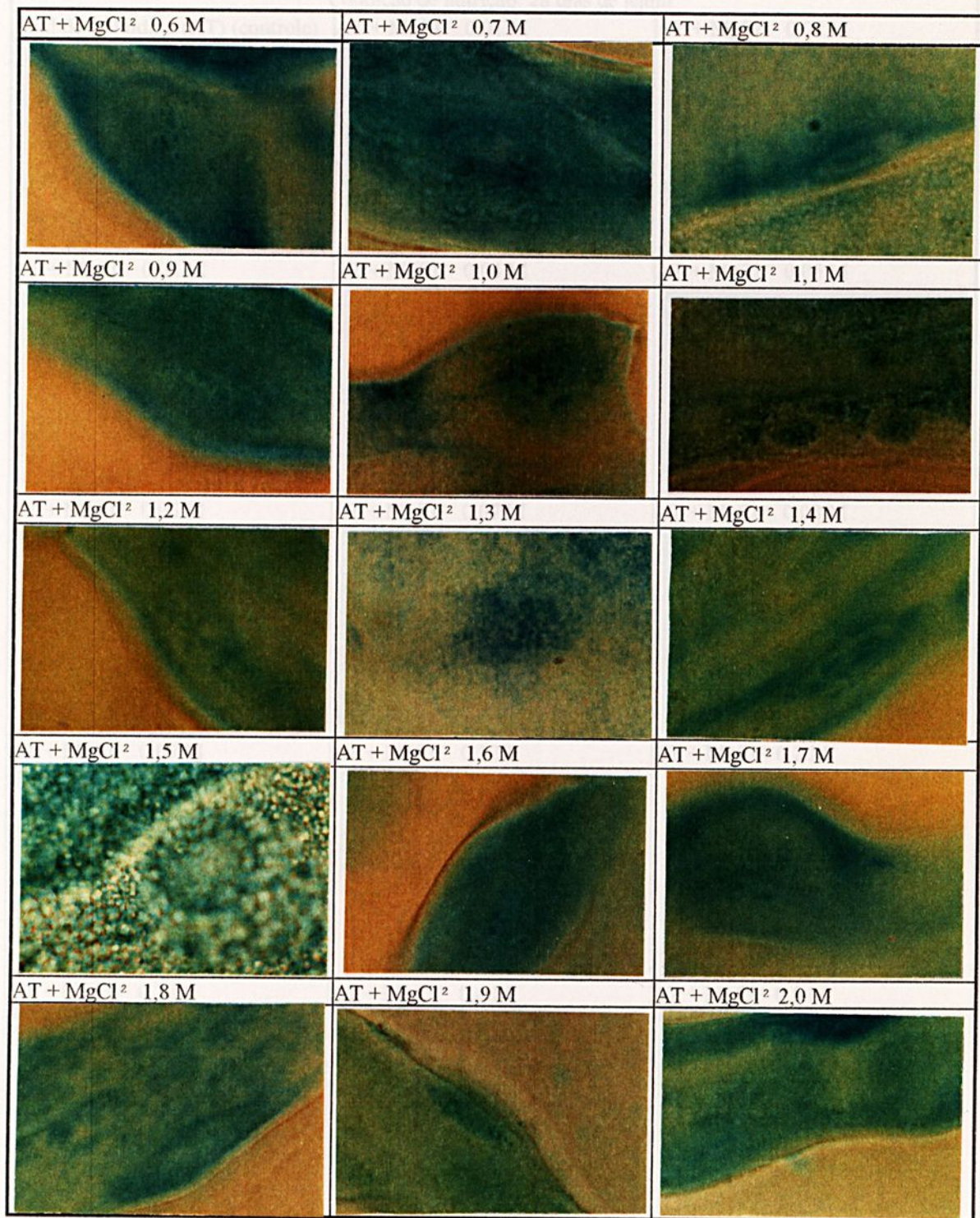


Figura 14: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação: 28 dias de jejum. CEC em 0,3 - 1,4 M

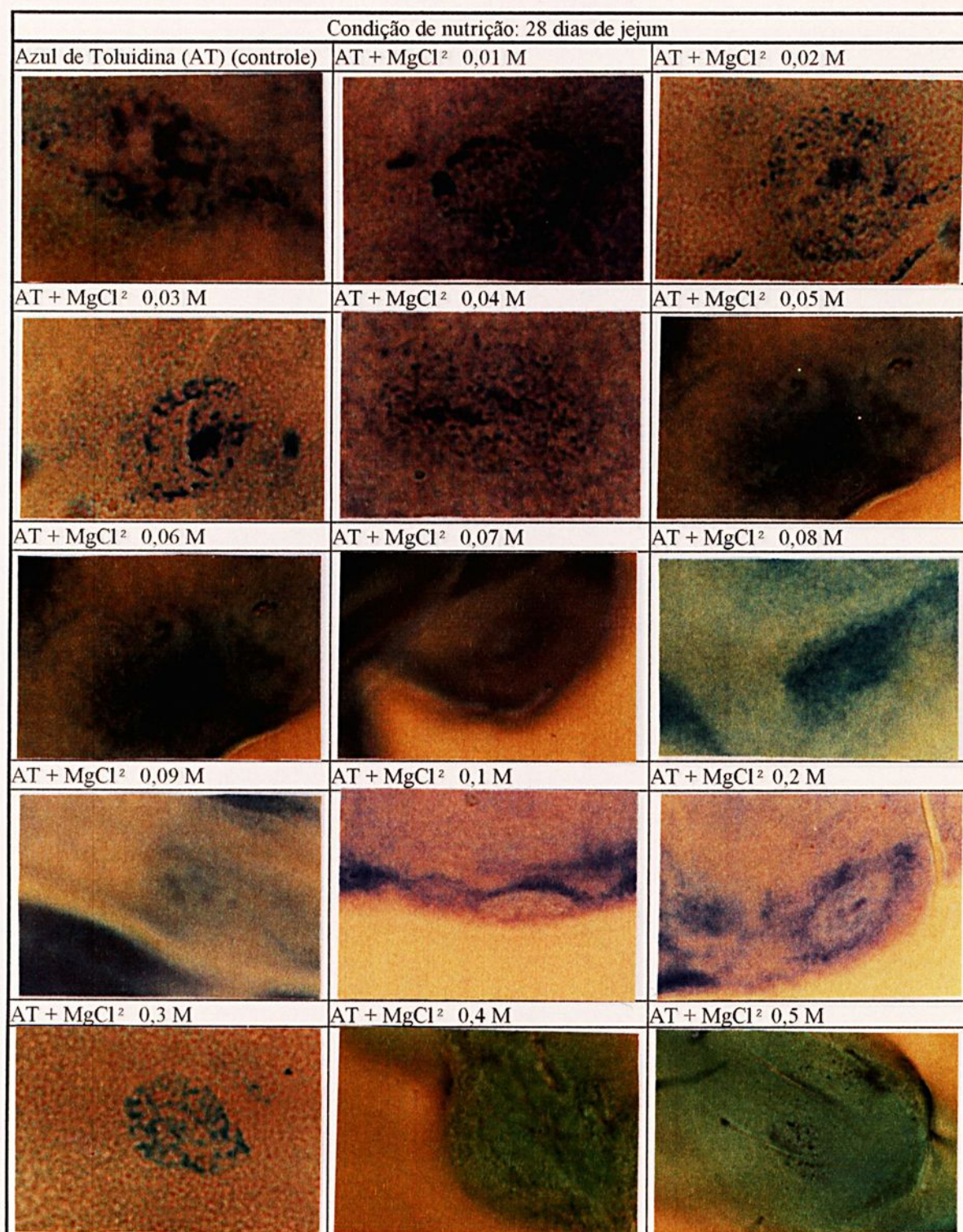


Figura 14: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: 28 dias de jejum. CEC em 0,3 - 0,4 M

Condições de nutrição

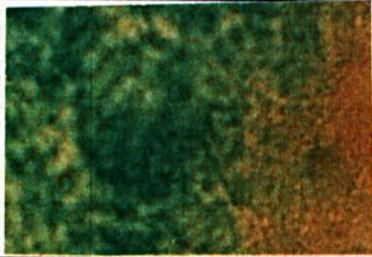
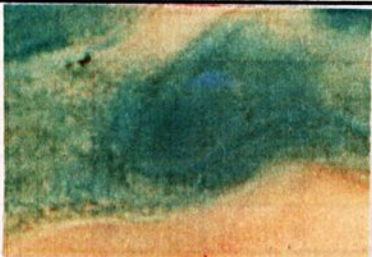
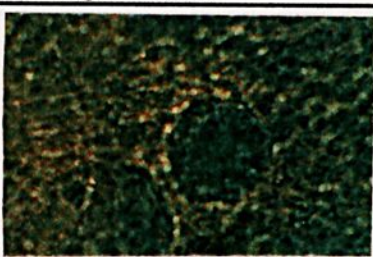
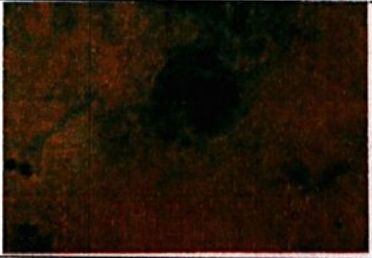
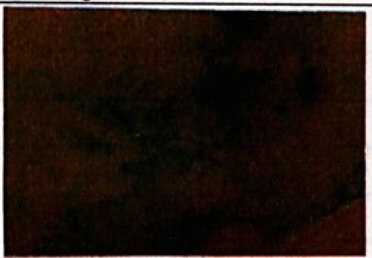
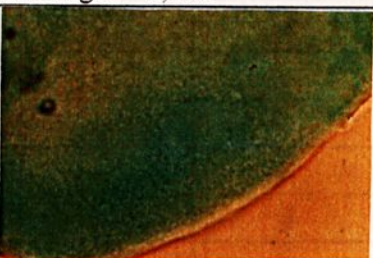
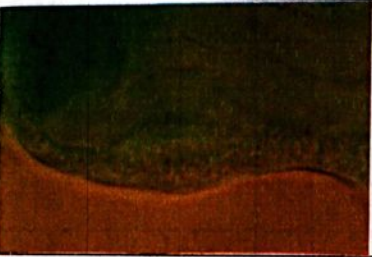
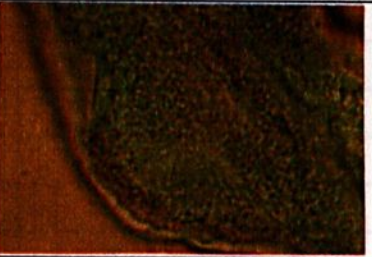
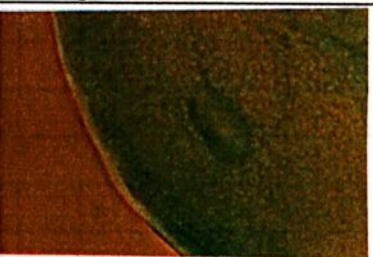
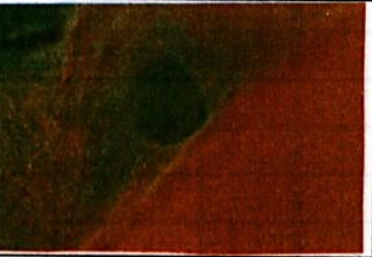
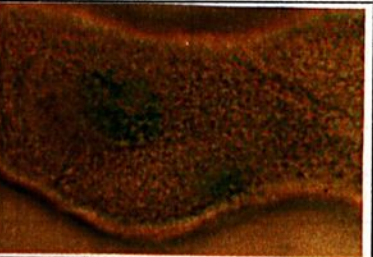
AT + MgCl ² 0,6 M	AT + MgCl ² 0,7 M	AT + MgCl ² 0,8 M
		
AT + MgCl ² 0,9 M	AT + MgCl ² 1,0 M	AT + MgCl ² 1,1 M
		
AT + MgCl ² 1,2 M	AT + MgCl ² 1,3 M	AT + MgCl ² 1,4 M
		
AT + MgCl ² 1,5 M	AT + MgCl ² 1,6 M	AT + MgCl ² 1,7 M
		
AT + MgCl ² 1,8 M	AT + MgCl ² 1,9 M	AT + MgCl ² 2,0 M
		

Tabela 8. Resumo dos resultados obtidos em resposta ao método de CEC, nos núcleos dos túbulos de Malpighi de machos adultos de *Rhodnius prolixus* submetidos a diferentes condições de nutrição. Legenda: * Azul (metacromasia)
* Verde (CEC)

Condições de nutrição						
Concentração de $MgCl^{2+}$	alimentado	7 dias / jejum	14 dias / jejum	21 dias / jejum	28 dias / jejum	
contr.(AT sem $MgCl^2$)	•	•	•	•	•	
0,01 M	•	•	•	•	•	
0,02 M	•	•	•	•	•	
0,03 M	•	•	•	•	•	
0,04 M	•	•	•	•	•	
0,05 M	•	•	•	•	•	
0,06 M	•	•	•	•	•	
0,07 M	•	•	•	•	•	
0,08 M	•	•	•	•	•	
0,09 M	•	•	•	•	•	
0,1 M	•	•	•	•	•	
0,2 M	•	•	•	•	•	•
0,3 M	•	•	•	•	•	•
0,4 M	•	•	•	•	•	•
0,5 M	•	•	•	•	•	•
0,6 M	•	•	•	•	•	•
0,7 M	•	•	•	•	•	•
0,8 M	•	•	•	•	•	•
0,9 M	•	•	•	•	•	•
1,0 M	•	•	•	•	•	•
1,1 M	•	•	•	•	•	•
1,2 M	•	•	•	•	•	•
1,3 M	•	•	•	•	•	•
1,4 M	•	•	•	•	•	•
1,5 M	•	•	•	•	•	•
1,6 M	•	•	•	•	•	•
1,7 M	•	•	•	•	•	•
1,8 M	•	•	•	•	•	•
1,9 M	•	•	•	•	•	•
2,0 M	•	•	•	•	•	•

Tabela 8: Resumo dos resultados obtidos em resposta ao método de CEC, nos núcleos dos túbulos de Malpighi de machos adultos de *Rhodnius prolixus* submetidos a diferentes condições de nutrição. Legenda: • Azul (metacromasia)
• Verde (CEC)

Condição de nutrição: realimentação após 30 dias de jejum		
Azul de Toluidina (AT) (controle)	AT + MgCl^2 0,01 M	AT + MgCl^2 0,02 M
		
AT + MgCl^2 0,03 M	AT + MgCl^2 0,04 M	AT + MgCl^2 0,05 M
		
AT + MgCl^2 0,06 M	AT + MgCl^2 0,07 M	AT + MgCl^2 0,08 M
		
AT + MgCl^2 0,09 M	AT + MgCl^2 0,1 M	AT + MgCl^2 0,2 M
		
AT + MgCl^2 0,3 M	AT + MgCl^2 0,4 M	AT + MgCl^2 0,5 M
		

Figura 15: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (macho adulto), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: realimentação após 30 dias de jejum. CEC em 0,3 M

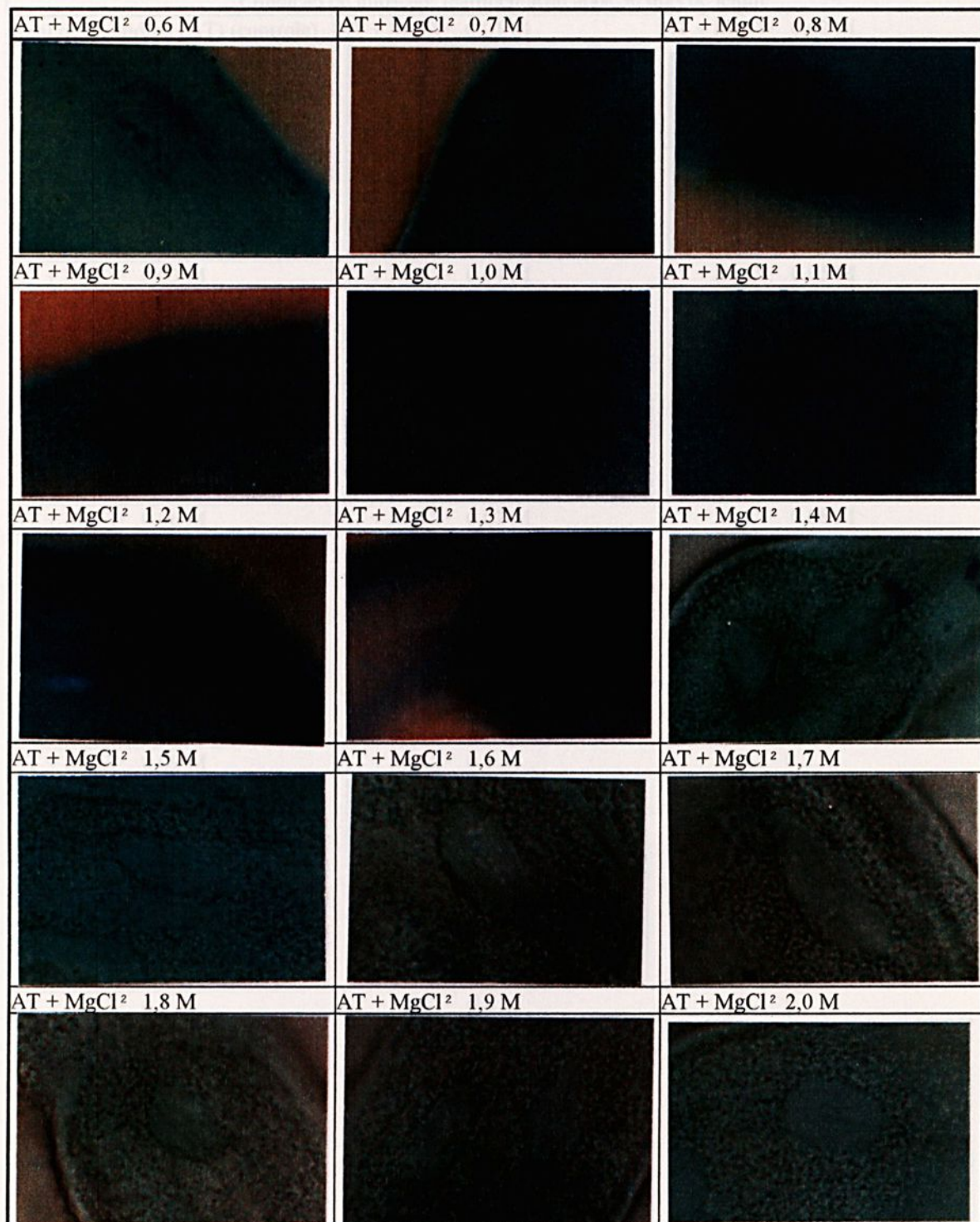


Figura 15: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta) sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4,0. Condição de alimentação: realimentação após 30 dias de jejum. CEC em 0,2 M

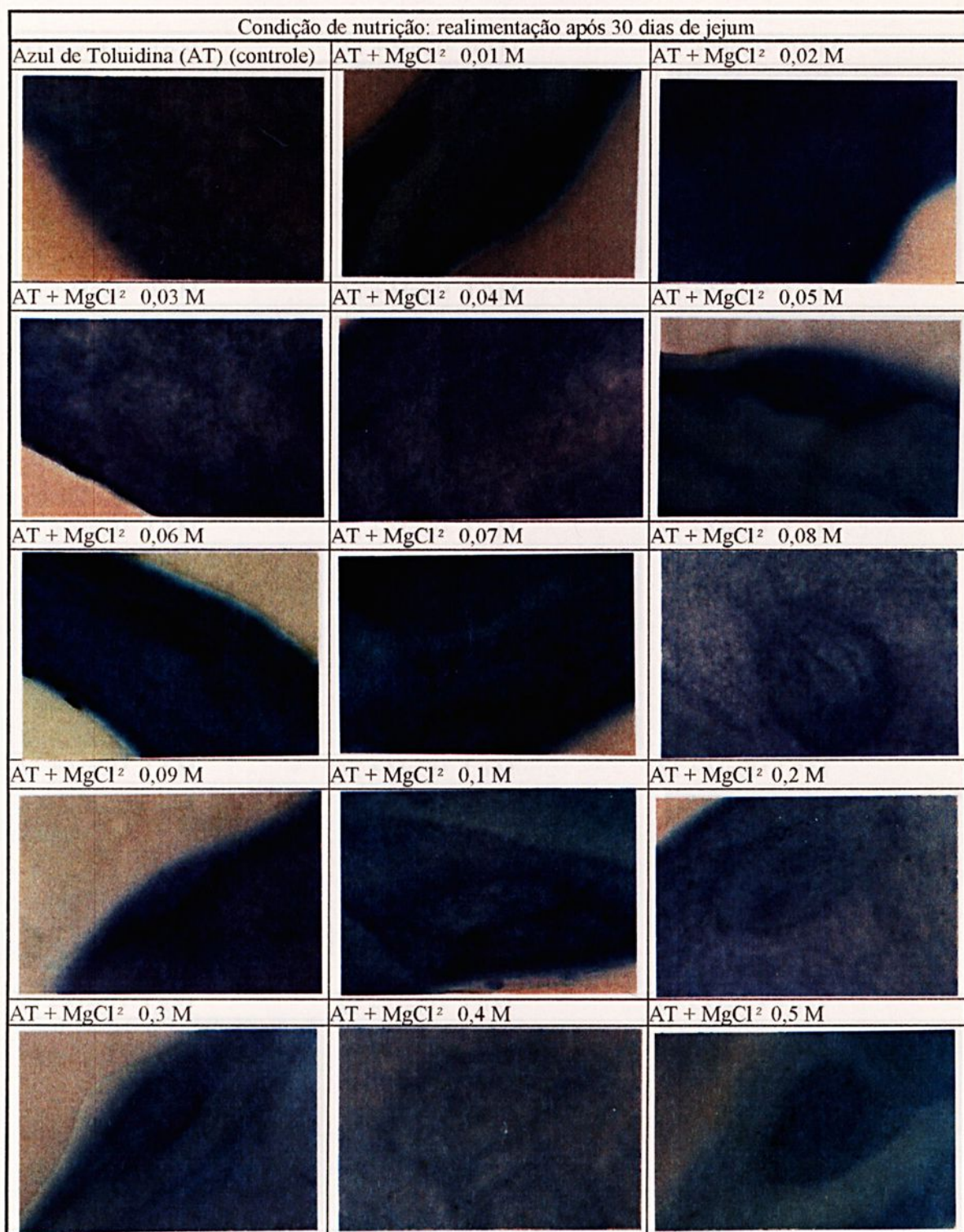


Figura 16: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmea adulta), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Condição de alimentação: realimentação após 30 dias de jejum. CEC em 0,2 M

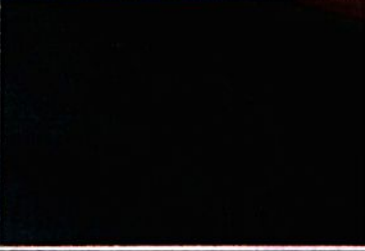
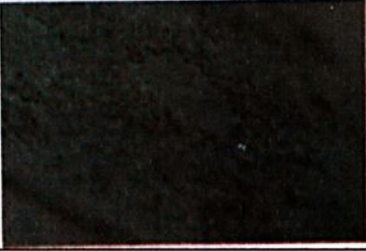
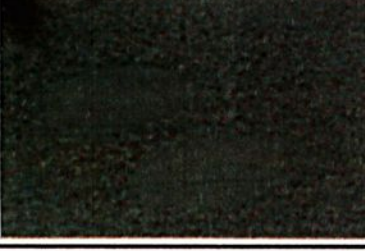
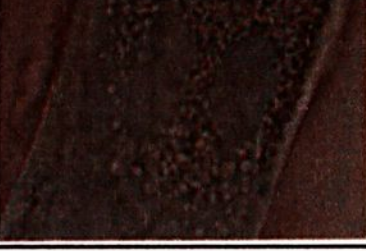
AT + MgCl ² 0,6 M	AT + MgCl ² 0,7 M	AT + MgCl ² 0,8 M
		
AT + MgCl ² 0,9 M	AT + MgCl ² 1,0 M	AT + MgCl ² 1,1 M
		
AT + MgCl ² 1,2 M	AT + MgCl ² 1,3 M	AT + MgCl ² 1,4 M
		
AT + MgCl ² 1,5 M	AT + MgCl ² 1,6 M	AT + MgCl ² 1,7 M
		
AT + MgCl ² 1,8 M	AT + MgCl ² 1,9 M	AT + MgCl ² 2,0 M
		

Tabela 10: Resultados obtidos em resposta ao método de CEC, nos núcleos dos túbulos de Malpighi de machos e fêmeas de *Rhodnius prolixus*, submetidos ao jejum de 30 dias e posterior realimentação.

Legenda: * Azul (metacromasia)
 * Verde (CEC)

Concentração de $MgCl^{2+}$	Machos	Fêmeas
contr. (At sem $MgCl^{2+}$)	•	•
0,01 M	•	•
0,02 M	•	•
0,03 M	•	•
0,04 M	•	•
0,05 M	•	•
0,06 M	•	•
0,07 M	•	•
0,08 M	•	•
0,09 M	•	•
0,1 M	•	•
0,2 M	•	•
0,3 M	•	•
0,4 M	•	•
0,5 M	•	•
0,6 M	•	•
0,7 M	•	•
0,8 M	•	•
0,9 M	•	•
1,0 M	•	•
1,1 M	•	•
1,2 M	•	•
1,3 M	•	•
1,4 M	•	•
1,5 M	•	•
1,6 M	•	•
1,7 M	•	•
1,8 M	•	•
1,9 M	•	•
2,0 M	•	•

Tabela 10: Resultados obtidos em resposta ao método de CEC, nos núcleos dos túbulos de Malpighi de machos e fêmeas de *Rhodnius prolixus*, submetidos ao jejum de 30 dias e posterior realimentação.

Legenda: • Azul (metacromasia)

• Verde (CEC)

3.1.2- Estudo do nucléolo e RNAs citoplasmáticos (variante da CEC)

Através do método variante de CEC, os corpúsculos nucleolares não são muito evidenciados, já que essa técnica não destaca papéis nucleares relacionados aos complexos ribonucleicos (RNA e proteínas).

Portanto, com o objetivo de observar essas regiões foi utilizada uma variação do método de CEC, onde o cátion inorgânico (Mg^{2+}) tem a função de extrair o conteúdo de compêndio, como ocorre na técnica original. Dessa forma, o nucléolo aparece metacromático (azul), enquanto que o DAPI aparece em tons de verde indicados na CEC (Taboga, S.R., Informação pessoal, 1997).

Foi utilizada essa variante do método de CEC em indivíduos machos e fêmeas, em períodos de 7, 10 e 15 minutos de exposição do material biológico (túbulos de Malpighi) à solução de $MgCl^{2+}$ a 0,05 M, após a coloração com Azul de Aluidina.

A figura 17, demonstra que tanto em machos quanto em fêmeas, alimentados (controles), somente após o período de 15 minutos de exposição à solução de Cloreto de Magnésio é que os corpúsculos nucleolares foram evidenciados.

No estresse provocado pelo jejum, em machos e fêmeas, os corpúsculos nucleolares foram evidenciados em diferentes períodos de tempo de exposição do material à solução aquosa de 0,05 M. Nos machos, após 14 e 21 dias de jejum, os corpúsculos nucleolares foram observados no tempo de incubação de 15 minutos; em 7 dias de jejum, o tempo correspondeu a 7 minutos, e em 28 dias de jejum a 3 minutos (figura 17 A).

Nas fêmeas, após 7, 14, 21 e 28 dias de jejum, os corpúsculos nucleolares foram evidenciados, respectivamente, com os seguintes tempos de exposição dos túbulos de Malpighi à solução de Mg^{2+} 0,05 M: 10, 3, 15 e 7 minutos (figura 17 B).

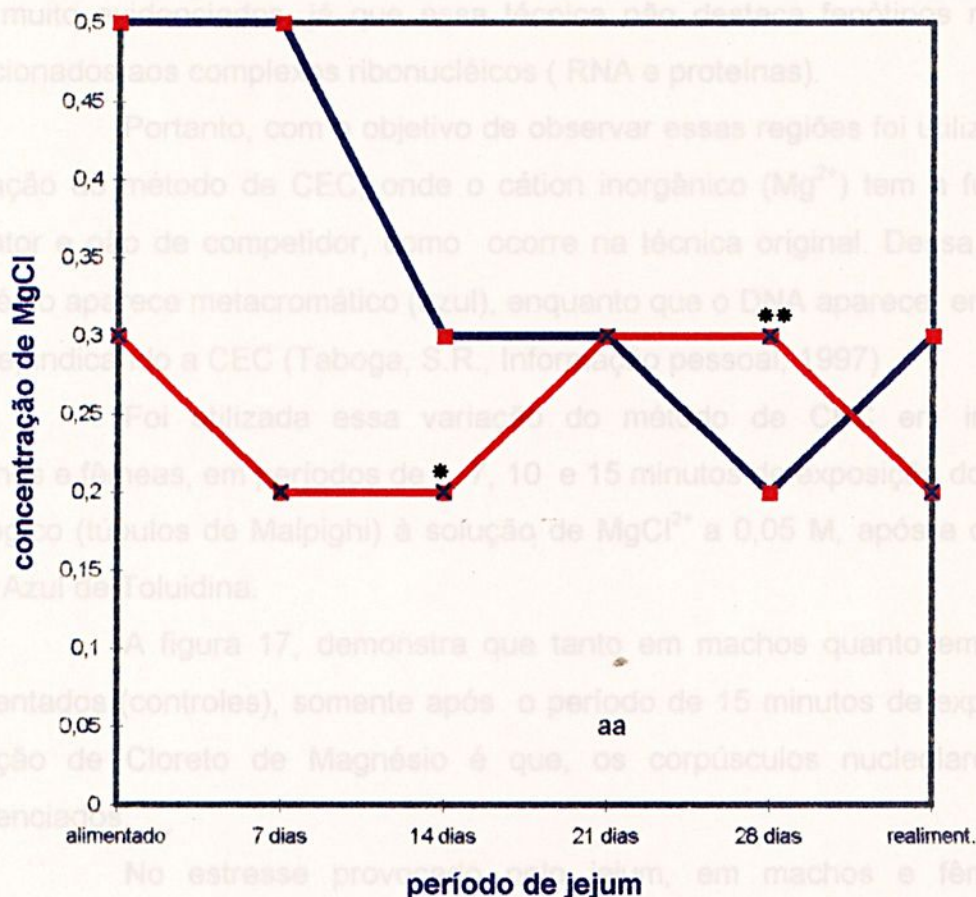
Figura V: Representação gráfica das concentrações de Mg^{2+} onde a CEC foi atingida nos núcleos das células dos túbulos de malpighi de indivíduos machos e fêmeas de *Rhodnius prolixus*, sob diferentes condições de alimentação (0: recém-alimentado, 7, 14 21 e 28 dias dias de jejum)

CEC entre 0,2-0,3 M

CEC entre 0,3-0,4 M

Legenda: — machos

— fêmeas



3.1_{3,2}- Estudo do nucléolo e RNAs citoplasmáticos (variante da CEC)

Através do método variante de CEC, os corpúsculos nucleolares não são muito evidenciados, já que essa técnica não destaca fenótipos nucleares relacionados aos complexos ribonucléicos (RNA e proteínas).

Portanto, com o objetivo de observar essas regiões foi utilizada uma variação do método de CEC, onde o cátion inorgânico (Mg^{2+}) tem a função de extrator e não de competidor, como ocorre na técnica original. Dessa forma, o nucléolo aparece metacromático (azul), enquanto que o DNA aparece em tons de verde, indicando a CEC (Taboga, S.R., Informação pessoal, 1997)

Foi utilizada essa variação do método de CEC em indivíduos machos e fêmeas, em períodos de 3, 7, 10 e 15 minutos de exposição do material biológico (túbulos de Malpighi) à solução de $MgCl^{2+}$ a 0,05 M, após a coloração com Azul de Toluidina.

A figura 17, demonstra que tanto em machos quanto em fêmeas, alimentados (controles), somente após o período de 15 minutos de exposição à solução de Cloreto de Magnésio é que, os corpúsculos nucleolares foram evidenciados.

No estresse provocado pelo jejum, em machos e fêmeas, os corpúsculos nucleolares foram evidenciados em diferentes períodos de tempo de exposição do material à solução aquosa de 0,05 M. Nos machos, após 14 e 21 dias de jejum, os corpúsculos nucleolares foram observados no tempo de incubação de 15 minutos; em 7 dias de jejum, o tempo correspondeu a 7 minutos; e em 28 dias de jejum a 3 minutos (figura 17 A).

Nas fêmeas, após 7, 14, 21 e 28 dias de jejum, os corpúsculos nucleolares foram evidenciados, respectivamente, com os seguintes tempos de exposição dos túbulos de Malpighi à solução de Mg^{2+} 0,05 M: 10, 3, 15 e 7 minutos (figura 17 B).

A figura 18 demonstra a resposta a este método variante nos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de insetos realimentados após 30

dias de jejum. Os machos tiveram os corpúsculos nucleolares evidenciados nos períodos de 5, 10 e 15 minutos de exposição à solução de Mg^{2+} 0,05 M (figura 18 A) e as fêmeas no período de 5 minutos (figura 18 B).

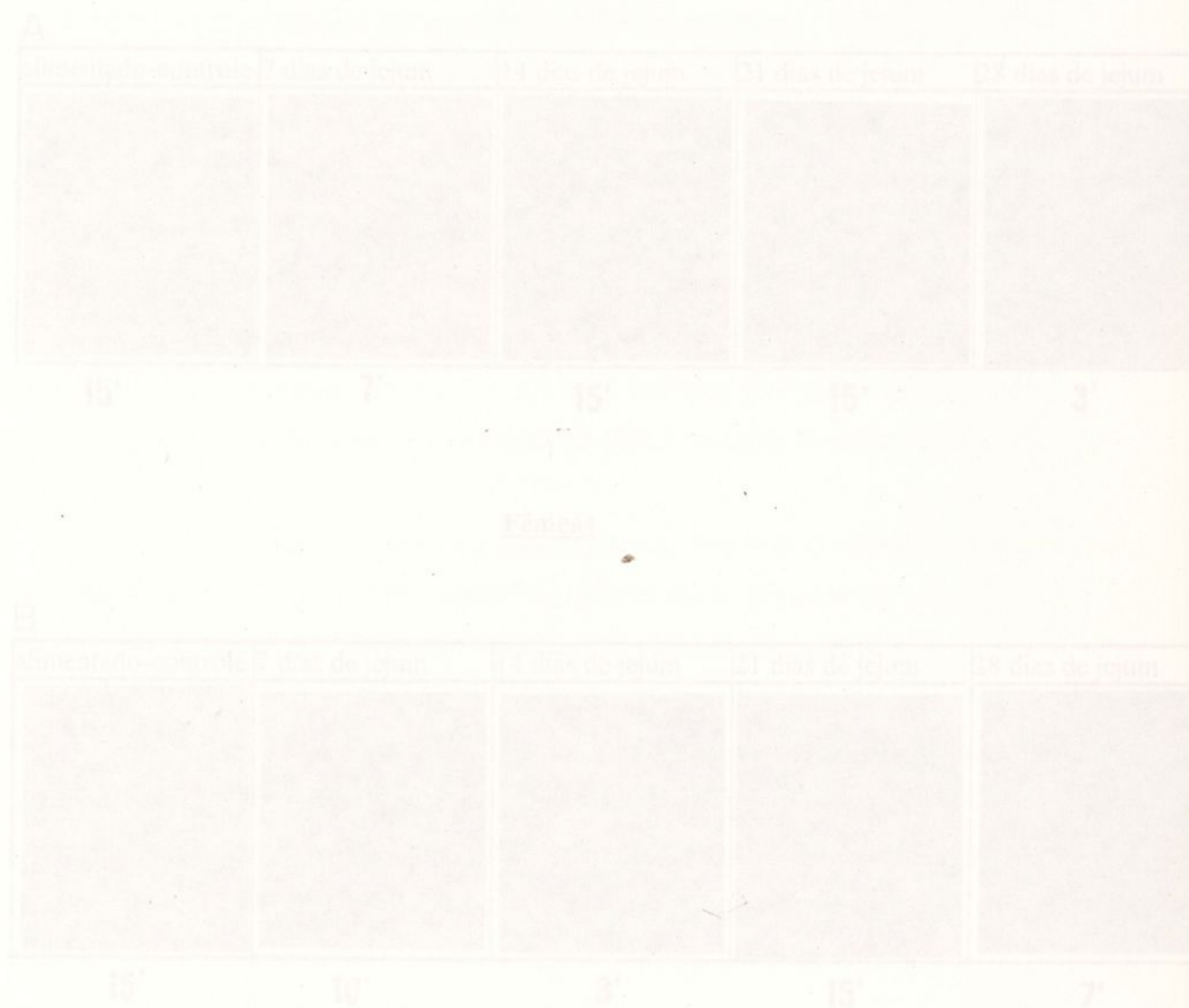
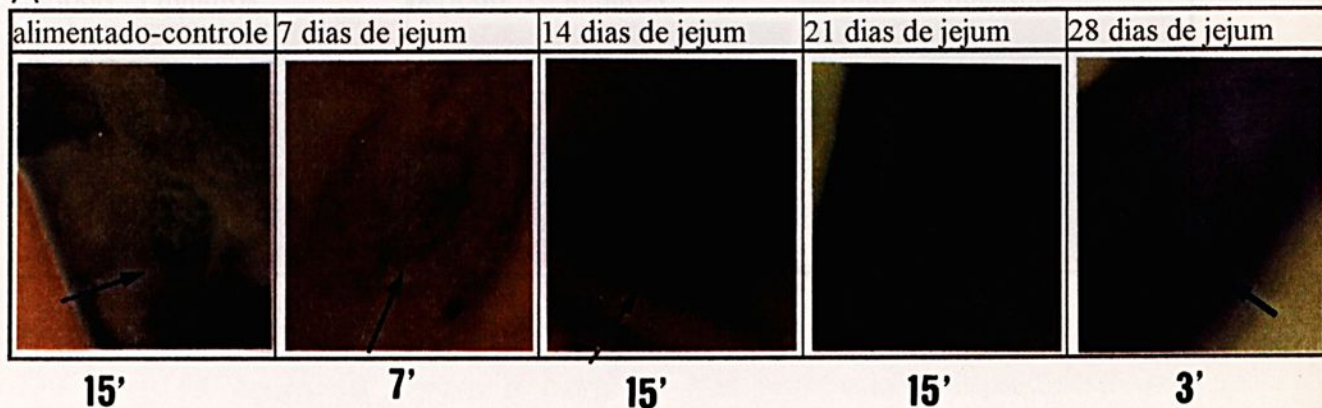


Figura 17: Resposta ao método de variante de concentração crítica de elementos (CEC) na granulose dos núcleos (nucleoli) das células dos túbulos de Malpighi de machos adultos (A) e fêmeas adultas (B) de *Rhodnius prolixus*, submetidos a diferentes condições de alimentação. Períodos de exposição à solução de Mg^{2+} 0,05 M: 3, 5, 7, 10 e 15 minutos. Observar os corpúsculos nucleolares evidenciados.

Machos

A



Fêmeas

B

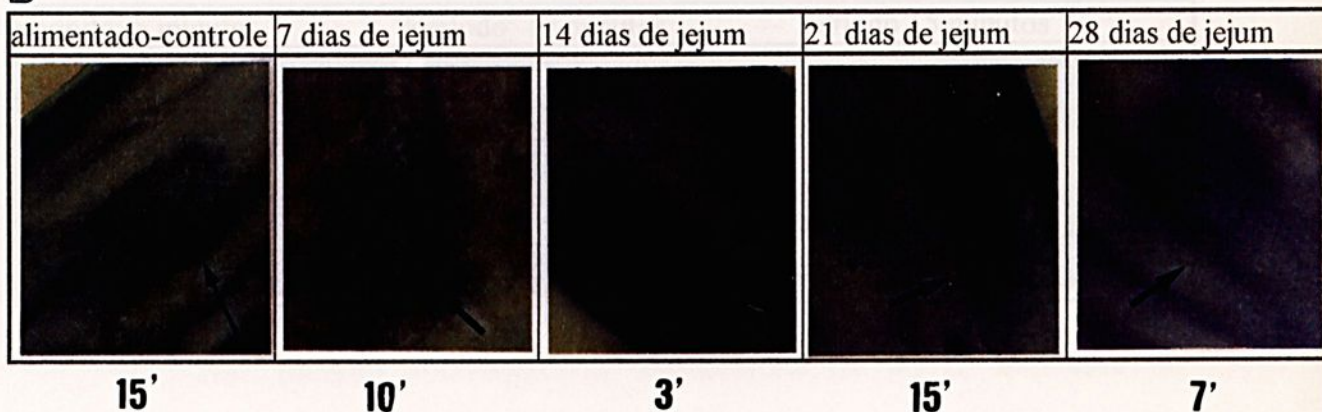
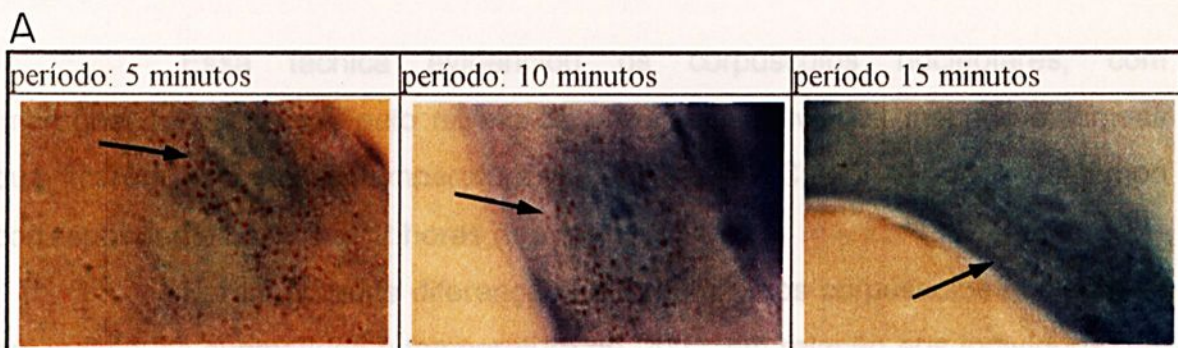


Figura 17: Resposta ao método de variante da CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos (setas) das células dos túbulos de Malpighi de machos adultos (A) e fêmeas adultas (B) de *Rhodnius prolixus*, submetidos a diferentes condições de alimentação. Períodos de exposição à solução de Mg^{2+} 0,05 M: 3, 5, 7, 10 e 15 minutos. Observar os corpúsculos nucleolares evidenciados.

3.2- Temperatura como fator de estresse.

Machos



foram submetidos à temperatura de 40°C.

A figura 19 mostra a estrutura dos corpúsculos nucleolares em indivíduos machos, que foram submetidos a estas diferentes temperaturas.

Na temperatura de 40°C observa-se fusão de corpúsculos nucleolares, tanto no período de 1 hora, quanto de 6 e 12 horas (figura 19 A-C).

Fêmeas



Nas fêmeas submetidas à temperatura de 40°C, expostas ao período de 1 hora, observa-se que os corpúsculos nucleolares estão localizados dispersamente no núcleo, distantes um do outro (figura 20 A). No período de 6 horas, nota-se que os corpúsculos nucleolares estão reunidos na região central do núcleo, com impregnação diferencial pela prata em algumas regiões dos nucléolos (figuras 20 B,C). No período de 12 horas, nota-se o mesmo comportamento dos corpúsculos nucleolares em relação ao período de 6 horas

Figura 18: Resposta ao método de variante da CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos (setas) das células dos túbulos de Malpighi de machos adultos (A) e fêmeas adultas (B) de *Rhodnius prolixus*, submetidos ao jejum de 30 dias e posterior realimentação. Períodos de exposição à solução de Mg^{2+} 0,05 M: 5, 10 e 15 minutos. Observar que após 5 minutos os corpúsculos nucleolares já são visíveis em machos e fêmeas.

3.2- Temperatura como fator de estresse.

3.2.1- Impregnação pelo nitrato de prata.

Essa técnica evidenciou os corpúsculos nucleolares, com impregnação diferencial pelo nitrato de prata, em indivíduos machos e fêmeas que ficaram expostos à temperatura de -4°C e 40°C , em períodos de tempo correspondentes a 1, 6 e 12 horas (figuras 19 e 20).

Foram notadas diferenças na estrutura dos corpúsculos nucleolares em indivíduos submetidos à temperatura de -4°C , em relação aos indivíduos que foram submetidos à temperatura de 40°C .

A figura 19 mostra a estrutura dos corpúsculos nucleolares em indivíduos machos, que foram submetidos a estas diferentes temperaturas.

Na temperatura de 40°C , observa-se fusão de corpúsculos nucleolares, tanto no período de 1 hora, quanto de 6 e 12 horas (figura 19 A-C). Essa fusão dos corpúsculos nucleolares é mais acentuada no período relativo as 12 horas de exposição, à alta temperatura, enquanto que, em 1 hora a fusão é inicial e em 6 horas, a fusão dos corpúsculos é parcial.

Na temperatura de -4°C (figura 19 D-G), a fusão dos corpúsculos nucleolares é observada apenas após 12 horas de exposição desses insetos à temperatura baixa, mas essa fusão não ocorre em todos os núcleos nesse mesmo período, como pode ser observado na figura 19 G.

Nas fêmeas submetidas à temperatura de 40°C , expostas ao período de 1 hora, observa-se que os corpúsculos nucleolares estão localizados dispersamente no núcleo, distantes um do outro (figura 20 A). No período de 6 horas, nota-se que os corpúsculos nucleolares estão reunidos na região central do núcleo, com impregnação diferencial pela prata em algumas regiões dos nucléolos (figuras 20 B,C). No período de 12 horas, nota-se o mesmo comportamento dos corpúsculos nucleolares em relação ao período de 6 horas

(figura 20 D). Observando-se ainda a ocorrência de núcleos poliplóides, o que não acontece nos demais períodos de exposição (figura 20 E).

Na temperatura de -4°C , observa-se que os corpúsculos nucleolares estão localizados preferencialmente na região central dos núcleos (figura 20 F-J). No período de 1 hora e 6 horas nota-se início de fusão dos corpúsculos nucleolares (figuras 20 F-H). No período de 12 horas de exposição à temperatura baixa, observa-se em alguns núcleos fusão total dos corpúsculos nucleolares, e em outros, fusão parcial (figura 20 I,J).





Figura 19: Núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*, machos, submetidos a choques de temperaturas -4°C e 40°C . Coloração: Impregnação pelo nitrato de prata. **A-C:** Temperatura de 40°C , período de 1, 6 e 12 horas, respectivamente. Em A e B notar início de fusão dos corpúsculos nucleolares. Em C notar fusão total dos corpúsculos nucleolares. **D-E:** Temperatura de -4°C , períodos de 1 e 6 horas, respectivamente. Núcleos com corpúsculos nucleolares definidos, dispostos na região periférica. **F-G:** Temperatura de -4°C , período de 12 horas. Observar núcleo com corpúsculos nucleolares fusionados (F); núcleo com corpúsculos nucleolares não fusionados (G)

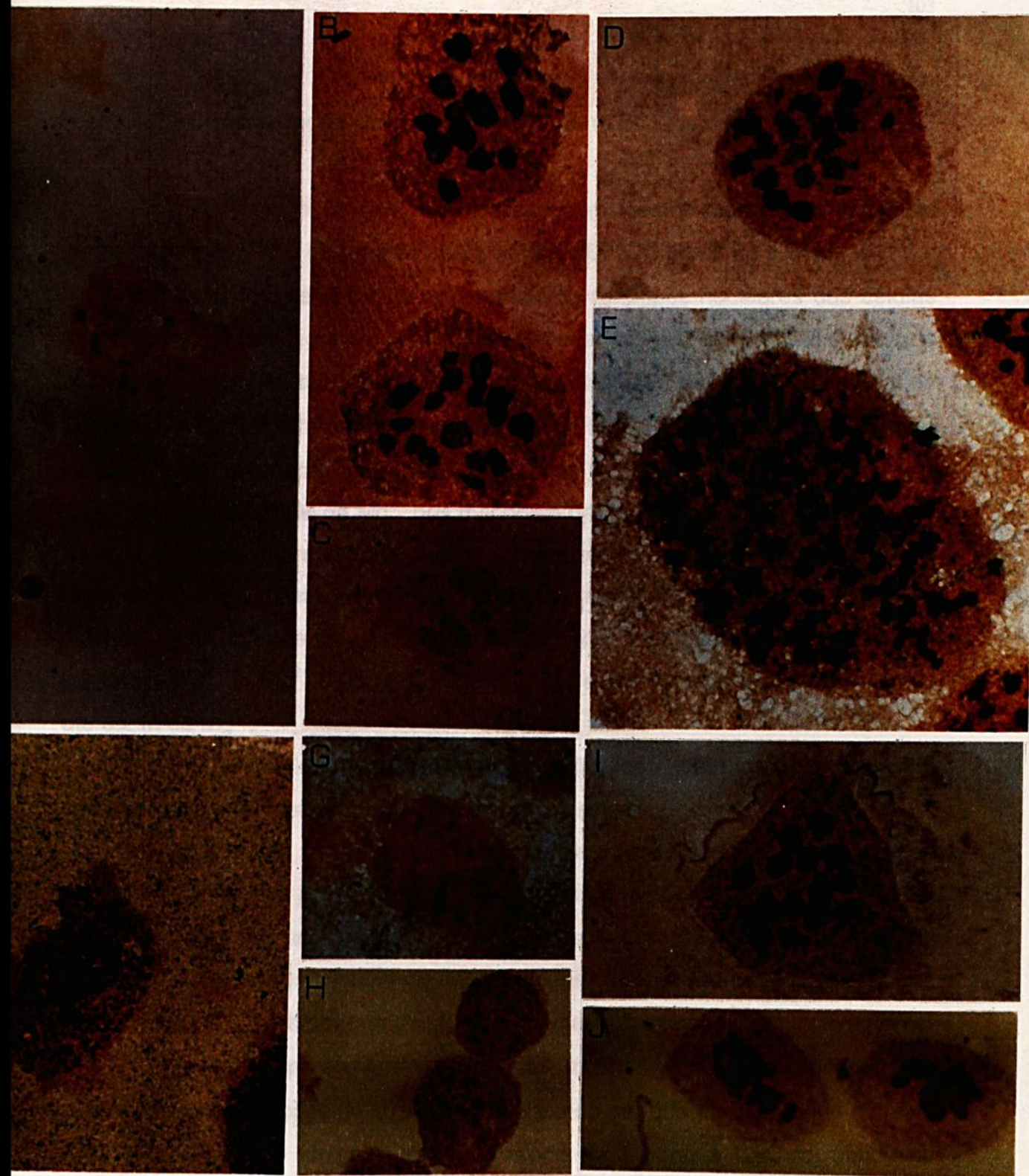


Figura 20: Núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*, fêmeas, submetidos a temperatura de -4°C e 40°C . Coloração: Impregnação pelo nitrato de prata. **A-E**: Temperatura de 40°C , período de 1 hora (A); 6 horas (B e C); 12 horas (D e E). Em A observar corpúsculos nucleolares localizados na periferia do núcleo, não associados; a seta indica núcleo de traquéia e em B, corpúsculos nucleolares não fusionados; em C corpúsculos nucleolares parcialmente fusionados e em D início de fusão. Em E observa-se núcleo poliplóide com inúmeros corpúsculos nucleolares. **F-J**: Temperatura de -4°C , período de 1 hora (F), 6 horas (G-H) e 12 horas (I-J). Observar corpúsculos nucleolares parcialmente fusionados (F,G,I); não fusionados (H) e totalmente fusionados (J).

3.2₂- Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC)

O método de CEC foi realizado em insetos machos e fêmeas às temperaturas de 21°C (figuras 21 e 22), -4°C e 40°C (figuras 23 e 24).

As figuras 21 e 22 apresentam os fenótipos nucleares das células dos túbulos de Malpighi de machos e fêmeas adultos de *Rhodnius prolixus* submetidos à temperatura de 21°C e posterior coloração em soluções de Azul de Toluidina (AT), com diferentes concentrações de Mg^{2+} (0,01 M a 2,0 M). Observa-se que, pela coloração da cromatina (verde), as CECs foram obtidas nas concentrações de 0,5 M de Mg^{2+} nos machos e 0,3 M de Mg^{2+} nas fêmeas. Alguns núcleos exibiram coloração diferencial dos corpúsculos nucleolares (azul violeta), tanto em machos como em fêmeas, antes de atingirem o ponto da CEC. Em machos, esse fenômeno é notado principalmente nos núcleos submetidos às soluções de AT + Mg^{2+} 0,05 M; 0,09 M e 0,1 M e em fêmeas, a partir de 0,01 M até 0,2 M de Mg^{2+} .

Os núcleos submetidos às soluções controles (apenas AT) apresentaram total metacromasia, em ambos os sexos.

A tabela 11 resume as respostas ao método de CEC, em túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (machos e fêmeas), à temperatura de 21°C.

As figuras 23 e 24 resumem os resultados obtidos com o método da CEC nos núcleos dos túbulos de Malpighi dos insetos submetidos ao choque hipotérmico (-4°C) e hipertérmico (40°C), em machos e fêmeas, respectivamente.

Na temperatura de -4°C, nos machos, a CEC foi obtida com diferentes concentrações de Mg^{2+} , dependendo do período de tempo que o inseto ficou exposto a esta temperatura. No período de 1 hora, a CEC foi obtida na concentração de 0,6 M de Mg^{2+} e nos períodos de 6 e 12 horas, as CECs foram atingidas nas concentrações de 0,4 M de Mg^{2+} (figura 23 A).

Os núcleos dos machos submetidos à temperatura de 40°C tiveram o ponto de CEC na concentração de 0,6 M de Mg^{2+} nos períodos de 1 e 6 horas

de exposição a esta alta temperatura. No período de 12 horas, os núcleos tiveram a CEC atingida com solução de AT a 0,4 M de Mg^{2+} (figura 23 B). A tabela 12 resume os dados acima descritos para machos adultos de *Rhodnius prolixus*.

Em fêmeas, à temperatura de $-4^{\circ}C$, os pontos de CECs foram atingidos nos períodos de 1 e 6 horas, em soluções de AT com Mg^{2+} 0,6 M e no período de 12 horas de exposição à esse choque hipotérmico, em soluções de 0,2 M de Mg^{2+} (figura 24 A). Os insetos submetidos ao choque hipertérmico ($40^{\circ}C$), atingiram os pontos de CEC nos núcleos dos túbulos de Malpighi, em solução de AT a 0,6 M de Mg^{2+} , durante o período de 1 hora de exposição. Nos demais períodos (6 e 12 horas) a coloração esverdeada da cromatina (CEC) foi observada com solução de AT a 0,4 M de Mg^{2+} (figura 24 B).

A tabela 13 resume os dados acima descritos para fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus*.

A resposta ao método de CEC em núcleos dos túbulos de Malpighi de machos e fêmeas de *Rhodnius prolixus* submetidos à temperatura de $21^{\circ}C$ e aos choques hipotérmicos ($-4^{\circ}C$) e hipertérmico (40°), durante diversos períodos de tempo, está representada graficamente nas figuras VI e VII.

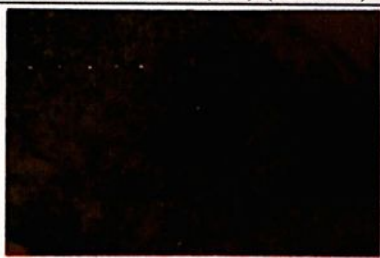
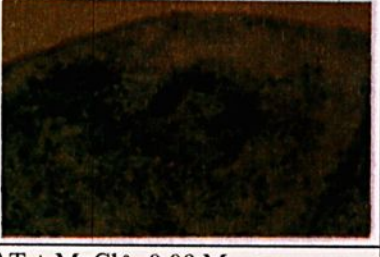
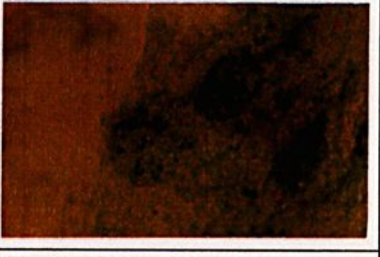
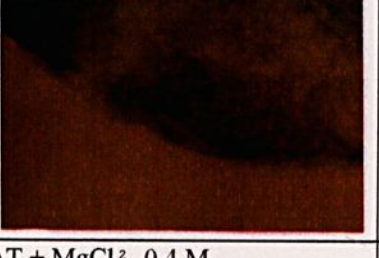
temperatura: 21°C		
Azul de Toluidina (AT) (controle)	AT + MgCl ² 0,01 M	AT + MgCl ² 0,02 M
		
AT + MgCl ² 0,03 M	AT + MgCl ² 0,04 M	AT + MgCl ² 0,05 M
		
AT + MgCl ² 0,06 M	AT + MgCl ² 0,07 M	AT + MgCl ² 0,08 M
		
AT + MgCl ² 0,09 M	AT + MgCl ² 0,1 M	AT + MgCl ² 0,2 M
		
AT + MgCl ² 0,3 M	AT + MgCl ² 0,4 M	AT + MgCl ² 0,5 M
		

Figura 21: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (machos adultos), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg²⁺: 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Temperatura: 21°C. CEC em 0,5 M

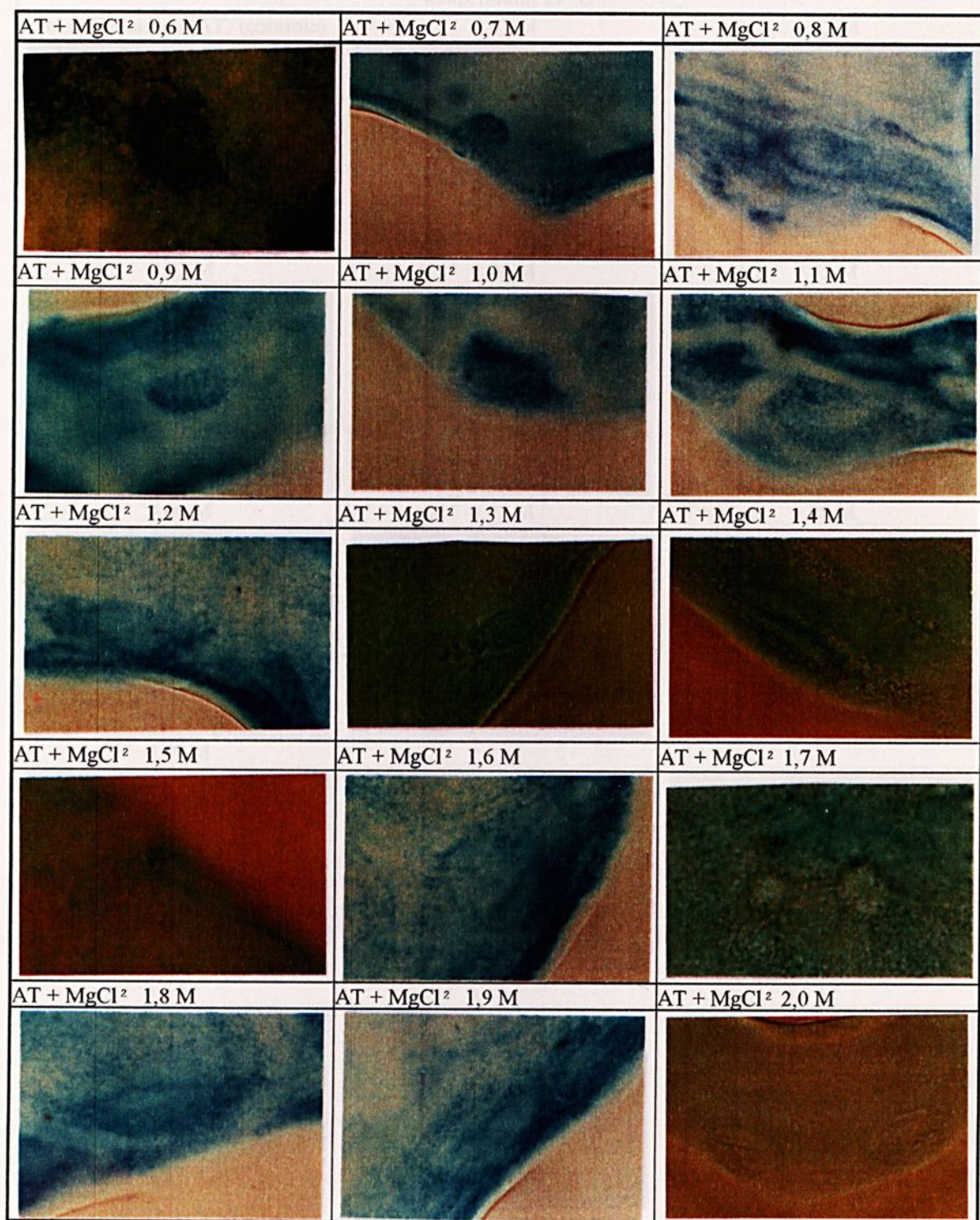


Figura 22: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Meisighi de *Rhodnius prolixus* (fêmeas adultas), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg^{2+} : 0,6 M a 2,0 M) em Ázido de Toluídina (AT) a pH 4,0. Temperatura: 21°C, CEC em 0,3 M.

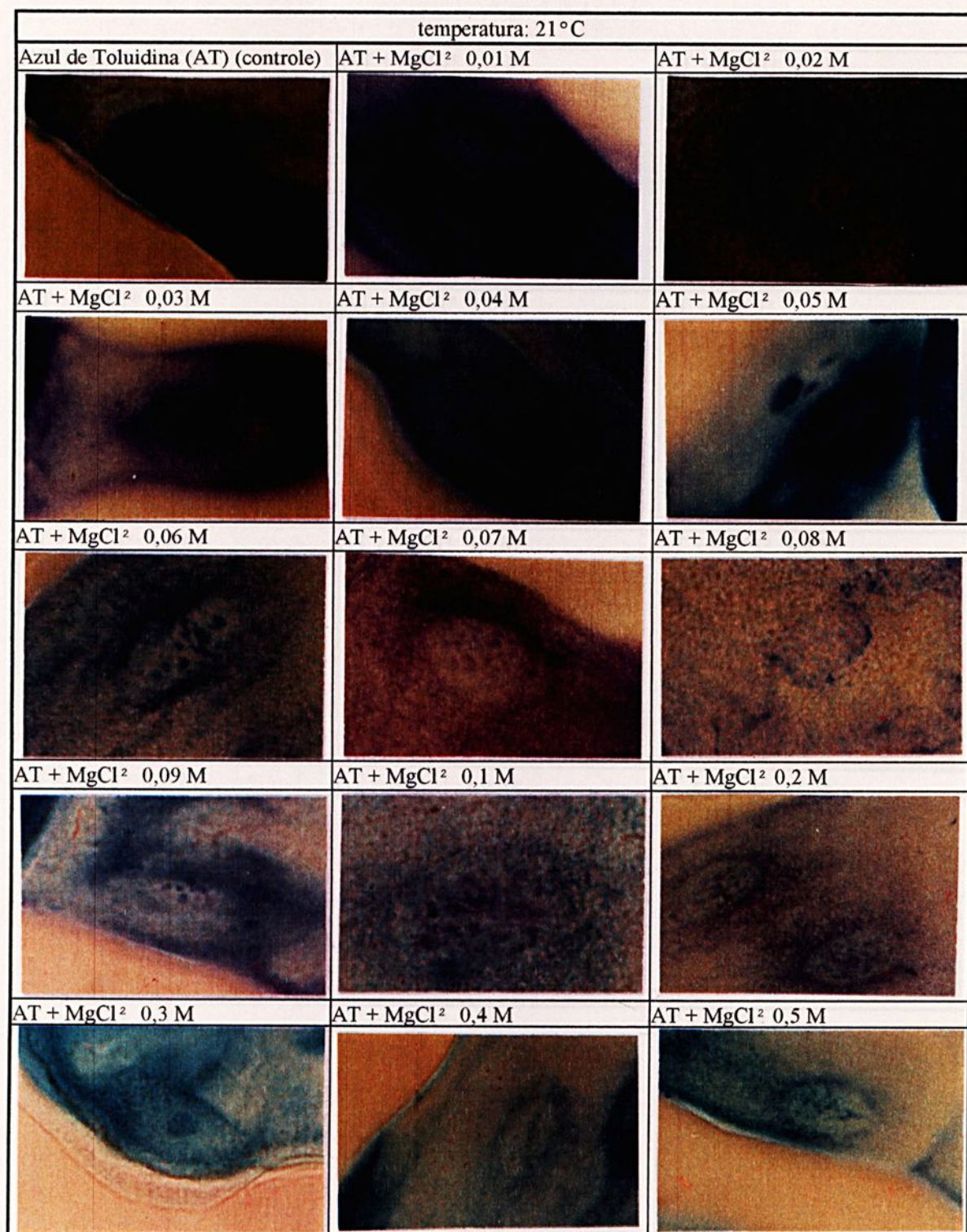


Figura 22: Resposta ao método de CEC (concentração crítica de eletrólitos) na cromatina dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (fêmeas adultas), sob diferentes condições de concentrações de cloreto de magnésio (Mg²⁺: 0,01 M a 2,0 M) em Azul de Toluidina (AT) a pH 4.0. Temperatura: 21°C. CEC em 0,3 M.

concentração de Machos Fêmeas

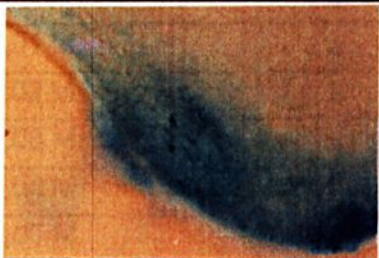
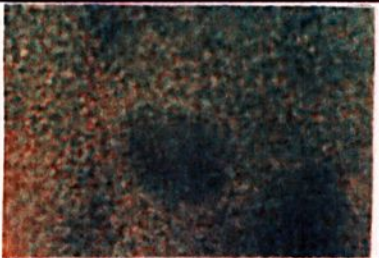
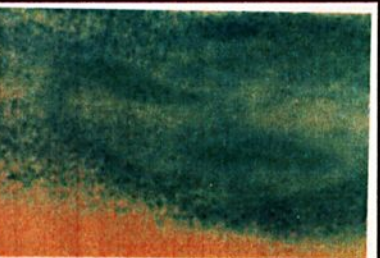
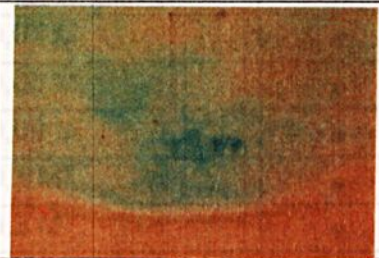
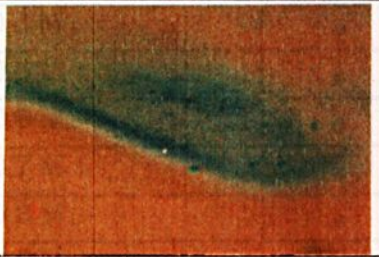
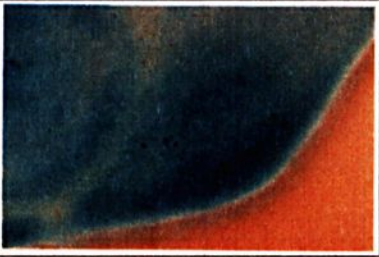
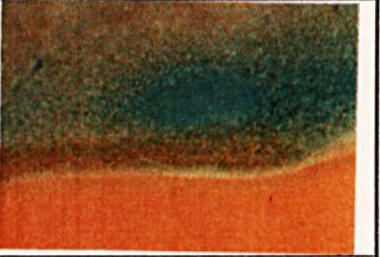
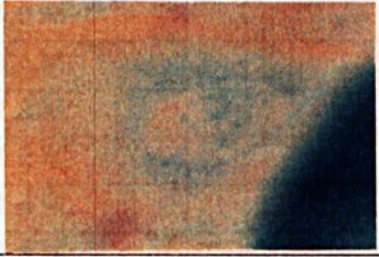
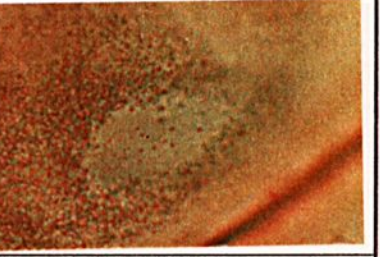
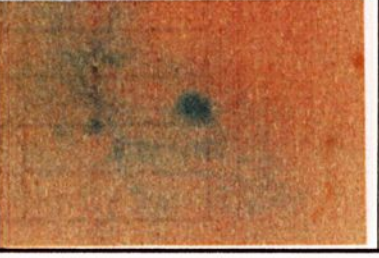
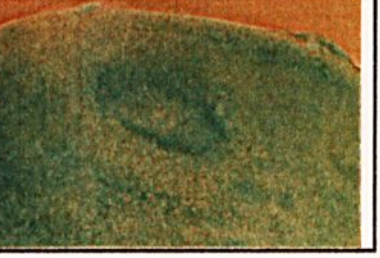
AT + MgCl_2 0,6 M	AT + MgCl_2 0,7 M	AT + MgCl_2 0,8 M
		
AT + MgCl_2 0,9 M	AT + MgCl_2 1,0 M	AT + MgCl_2 1,1 M
		
AT + MgCl_2 1,2 M	AT + MgCl_2 1,3 M	AT + MgCl_2 1,4 M
		
AT + MgCl_2 1,5 M	AT + MgCl_2 1,6 M	AT + MgCl_2 1,7 M
		
AT + MgCl_2 1,8 M	AT + MgCl_2 1,9 M	AT + MgCl_2 2,0 M
		

Tabela 11: Resumo dos resultados da resposta ao método de CEC, obtidos em núcleos de túbulos de Mespighi de *Rhodnius prolixus* (machos e fêmeas), submetidos à temperatura de 21°C. Soluções de AT com diferentes concentrações de MgCl_2 (0,01 M a 2,0 M).

Legenda: * Azul (metacromesias)

* Verde (CEC)

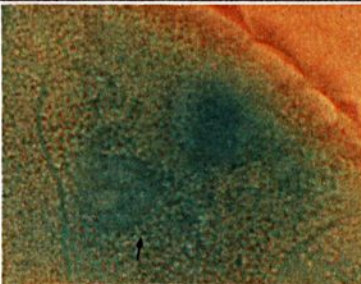
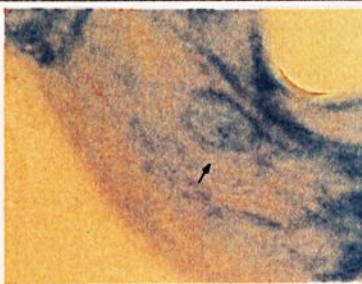
concentração de $MgCl^{2+}$	Machos	Fêmeas
con. (AT sem $MgCl^{2+}$)	•	•
0,01 M	•	•
0,02 M	•	•
0,03 M	•	•
0,04 M	•	•
0,05 M	•	•
0,06 M	•	•
0,07 M	•	•
0,08 M	•	•
0,09 M	•	•
0,1 M	•	•
0,2 M	•	•
0,3 M	•	•
0,4 M	•	•
0,5 M	•	•
0,6 M	•	•
0,7 M	•	•
0,8 M	•	•
0,9 M	•	•
1,0 M	•	•
1,1 M	•	•
1,2 M	•	•
1,3 M	•	•
1,4 M	•	•
1,5 M	•	•
1,6 M	•	•
1,7 M	•	•
1,8 M	•	•
1,9 M	•	•
2,0 M	•	•

Tabela 11:Resumo dos resultados da resposta ao método de CEC, obtidos em núcleos de túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (machos e fêmeas), submetidos à temperatura de 21°C. Soluções de AT com diferentes concentrações de $MgCl^{2+}$ (0,01 M a 2,0 M).

Legenda: • Azul (metacromasia)
• Verde (CEC)

Temperatura -4°C

A

1 hora	6 horas	12 horas
		
AT + MgCl ² 0,6 M	AT + MgCl ² 0,4 M	AT + MgCl ² 0,4 M

Temperatura 40°C

B

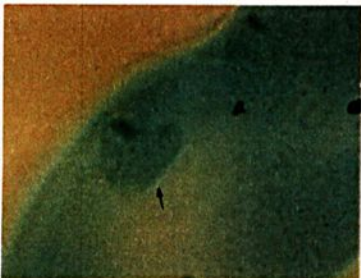
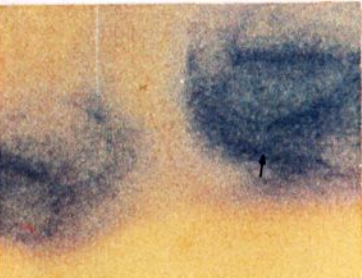
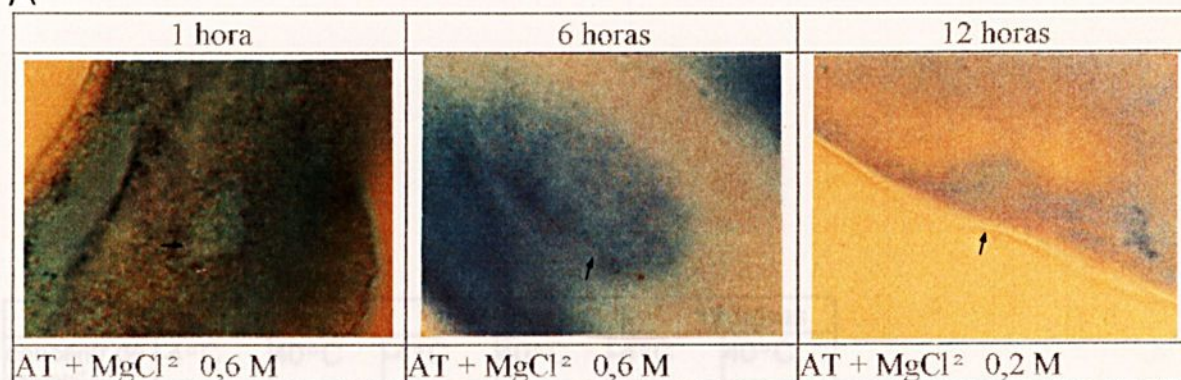
1 hora	6 horas	12 horas
		
AT + MgCl ² 0,6 M	AT + MgCl ² 0,6 M	AT + MgCl ² 0,4 M

Figura 23 A,B: Resumo dos resultados obtidos com o método de CEC (Concentração Crítica de Eletrólitos) nos núcleos (setas) dos túbulos de Malpighi de machos adultos de *Rhodnius prolixus* submetidos ao choque hipotérmico (A: -4°C) e hipertérmico (B: 40°C), durante diferentes períodos de exposição à essas situações de estresses (1, 6 e 12 horas). As figuras dos núcleos indicam o ponto da CEC e a molaridade correspondente da solução de Mg²⁺.

Temperatura -4°C

A



Temperatura 40°C

B

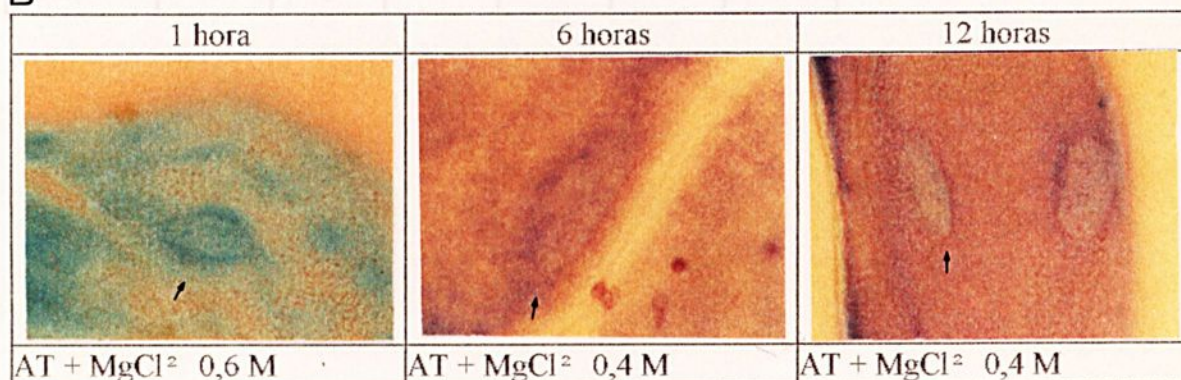


Tabela 12: Resumo dos resultados obtidos pelo método de CEC, em núcleos dos túbulos de Malpighi de machos adultos de *Rhodnius prolixus* submetidos a diferentes temperaturas (-4°C e 40°C) e expostos em diferentes períodos de tempo (1, 6 e 12 horas).

Legenda: * Azul (metacromasia)

* Verde (CBC)

Figura 24 A,B: Resumo dos resultados obtidos com o método de CEC (Concentração Crítica de Eletrólitos) nos núcleos (setas) dos túbulos de Malpighi de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* submetidos ao choque hipotérmico (A: -4°C) e hipotérmico (B: 40°C), durante diferentes períodos de exposição à essas situações de estresses (1, 6 e 12 horas). As figuras dos núcleos indicam o ponto da CEC e a molaridade correspondente da solução de Mg²⁺.

	1 hora		6 horas		12 horas	
concentr.de MgCl ²⁺	-4°C	40°C	-4°C	40°C	-4°C	40°C
controle (AT sem MgCl ²⁺)	•	•	•	•	•	•
0,2 M	•	•	•	•	•	•
0,4 M	•	•	•	•	•	•
0,6 M	•	•	•	•	•	•
0,8 M	•	•	•	•	•	•
1,0 M	•	•	•	•	•	•
2,0 M	•	•	•	•	•	•

Tabela 12: Resumo dos resultados obtidos pelo método de CEC, em núcleos dos túbulos

Tabela 12: Resumo dos resultados obtidos pelo método de CEC, em núcleos dos túbulos de Malpighi de machos adultos de *Rhodnius prolixus* submetidos a diferentes temperaturas (-4°C e 40°C) e expostos em diferentes períodos de tempo (1, 6 e 12 horas).

Legenda: • Azul (metacromasia)
• Verde (CEC)

	1 hora		6 horas		12 horas	
concentr. de $MgCl^{2+}$	-4°C	40°C	-4°C	40°C	-4°C	40°C
controle (At sem $MgCl^{2+}$)	•	•	•	•	•	•
0,2 M	•	•	•	•	•	•
0,4 M	•	•	•	•	•	•
0,6 M	•	•	•	•	•	•
0,8 M	•	•	•	•	•	•
1,0 M	•	•	•	•	•	•
2,0 M	•	•	•	•	•	•

Tabela 13: Resumo dos resultados obtidos pelo método de CEC, em núcleos dos túbulos de Malpighi de fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* submetidas a diferentes temperaturas (-4°C e 40°C) e expostas em diversos períodos de tempo (1, 6 e 12 horas)

Legenda: • Azul (metacromasia)
• Verde (CEC)

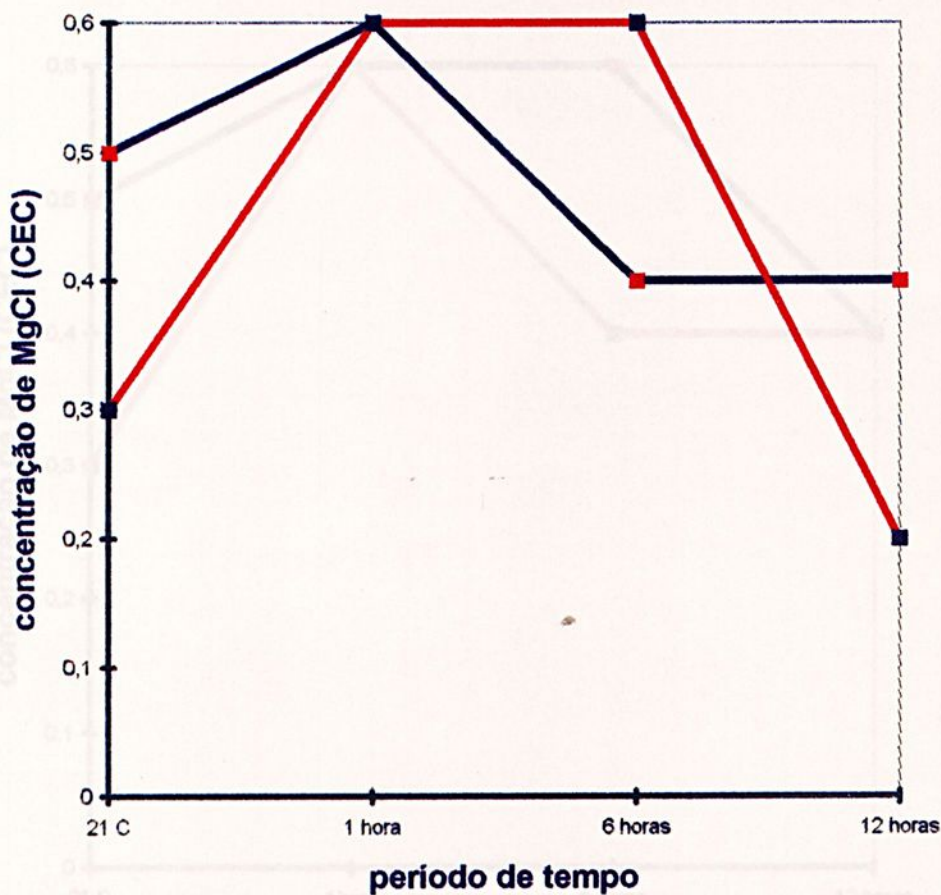
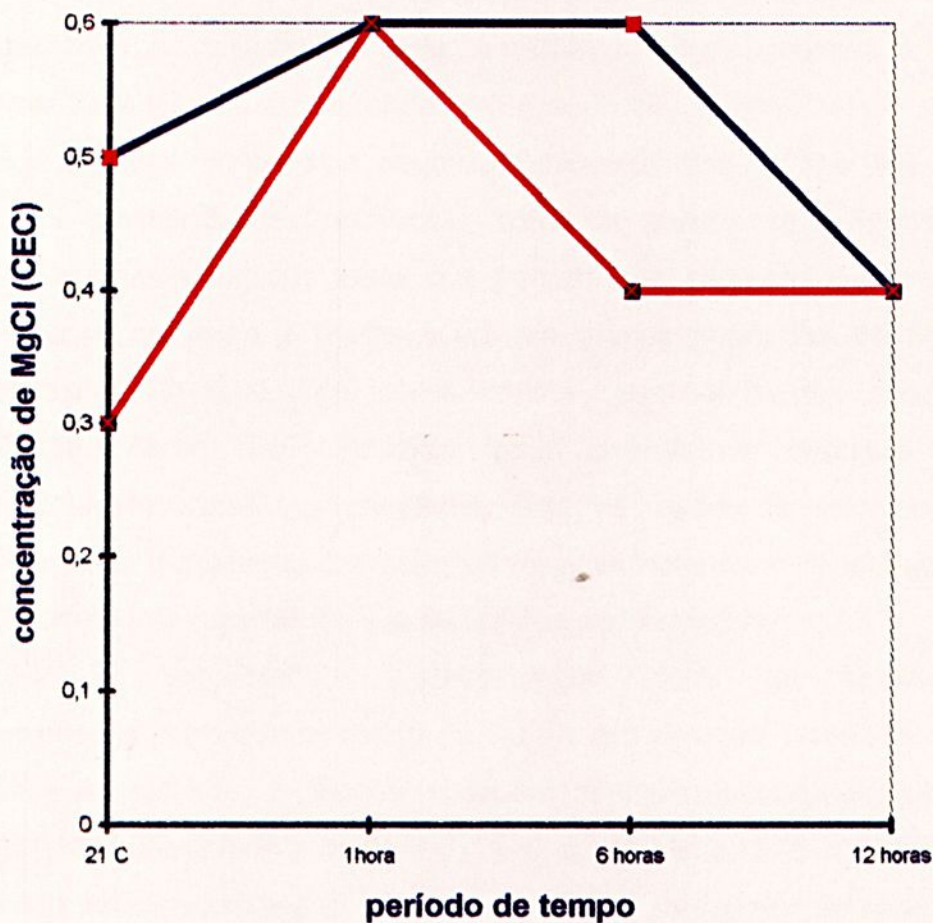


Figura VI: Representação gráfica da resposta ao método de CEC, em núcleos dos túbulos de Malpighi de machos e fêmeas de *Rhodnius prolixus* submetidos às temperaturas de 21°C e -4°C, durante diversos períodos de tempo (1, 6 e 12 horas).

Legenda: — machos

— fêmeas



4. Discussão

Figura VII: Representação gráfica da resposta ao método de CEC, em núcleos dos túbulos de Malpighi de machos e fêmeas de *Rhodnius prolixus* submetidos às temperaturas de 21°C e 40°C, durante diversos períodos de tempo (1, 6 e 12 horas).

Legenda: — machos

— fêmeas

4.1- Jejum como fator de estresse

4.1.- Coloração: Orceína lacto-ácida

A técnica de coloração pela orceína lacto-ácida com as proteínas básicas (histonas) ligadas ao DNA tornando possível o estudo da cromatina. Esta técnica compreende uma reação de coloração, isto é, a orceína é um corante ácido com carga negativa (ânionico) que se liga aos substratos carregados positivamente (catiônicos), como os aminoácidos de resíduos proteicos ($-NH_2^+$). Os grupos básicos totais que podem ligar corantes aniônicos são: ϵ -amino grupos da lisina e hidroxil-oxil de arginina; os imidazólicos da histidina e os amino terminais que são nitrogênio livre (Vidal & Mello, 1997). Portanto, todas as proteínas histônicas ligadas ao DNA ficam evidenciadas e consequentemente as regiões de maior compactação do DNA e maior quantidade das histonas (regiões heterocromáticas) apresentam-se mais fortemente coradas do que as regiões eucromáticas.

A definição e caracterização geral da eucromatina e heterocromatina ao longo da pesquisa e desenvolvimento em células de organismos eucarióticos vem sendo objeto de estudo em diversos materiais biológicos, em termos bioquímicos, biofísicos, citológicos e ultra-estruturais. Tais estudos sob a perspectiva da citogenética e citologia celular (Holt, 1979; Mello, 1979 a 1983) quando durante o processo de formação e manutenção da cromatina durante a interfase, corantes como a orceína lacto-ácida, metacromatina e a cromatina que se apresentava difusa, não compactada, durante esta mesma fase do ciclo celular foi denominada por Holt, de eucromatina.

A heterocromatina pode ser caracterizada como: baixa atividade de transcrição (Mello, 1971); alta densidade de DNA (Mello, 1979); metacromatina metacromática (Mello, 1980); alta concentração de DNA em dupla hélice (Vidal & Pimentel, 1980); afinidade por drogas intercalantes ao DNA, como a hidratação (Simoni & Mello, 1983); alta afinidade

4. Discussão

4.1- Jejum como fator de estresse

4.1.1- Coloração: Orceína lacto-acética

A técnica de coloração pela orceína lacto-acética cora as proteínas básicas (histonas) ligadas ao DNA tornando possível o estudo da cromatina. Esta técnica compreende uma reação de acidofilia. Isto é, a orceína é um corante ácido, com carga negativa (aniônico) que se liga aos substratos carregados positivamente (catiônicos), como os aminos de resíduos protéicos ($-NH_3^+$). Os grupos básicos totais que podem ligar corantes aniônicos são: E-amino grupos da lisina e hidroxili-lisina, os grupos guanidina da arginina, os imidazólicos da histidina e os amino terminais que são menos freqüentemente livres (Vidal & Mello, 1987). Portanto, todas as proteínas histônicas ligadas ao DNA ficam evidenciadas e conseqüentemente, as regiões de maior compactação do DNA e maior quantidade das histonas (regiões heterocromáticas) apresentam-se mais fortemente coradas do que as regiões eucromáticas.

A definição e caracterização geral da eucromatina e heterocromatina, vêm sendo objeto de estudo em diversos materiais biológicos, em termos bioquímicos, biofísicos, citoquímicos e ultra-estruturais. Tais estudos ganharam impulso a partir de Heitz (1928,-*apud* Mello, 1978 a, 1983), quando denominou heterocromatina a cromatina que permanecia condensada durante a intérfase, corando-se intensamente, como nos cromossomos metafásicos. A cromatina que se apresentava difusa, não compactada, durante esta mesma fase do ciclo celular foi denominada, por Heitz, de eucromatina.

A heterocromatina pode ser caracterizada como: baixa atividade de transcrição (Mello, 1971); notável resistência à hidrólise ácida (Mello, 1979); metacromasia mesmo após tratamento com RNase (Mello, 1980); alto conteúdo de DNA em dupla hélice (Vidal & Pimentel, 1980); afinidade por drogas intercalantes ao DNA, como a hicanona (Simoni & Mello, 1986); alta afinidade

pela clupeína, um tipo de protamina (Mello, 1985) e falta de atividade ATPásica dependente de Mg^{2+} (Azeredo-Oliveira & Mello, 1986).

O complexo DNA-proteínas, que é fundamental na organização cromossômica, pode existir em duas conformações distintas, difusa e condensada. A diferença no estado reflete diferentes níveis de condensação resultantes da interação do DNA com proteínas cromossômicas ou outras (Wuth, 1985, *apud* Verma, 1988). Estudos autorradiográficos usando uridina marcada com trítio fornecem evidências convincentes que a síntese do RNA é possível somente no estado difuso ou disperso, enquanto que a cromatina condensada é transcricionalmente inativa (Ris & Korenberg, 1979).

O estresse alimentar ao qual foi submetido os triatomíneos (machos e fêmeas) da espécie *Rhodnius prolixus*, alterou a distribuição da cromatina. Nos insetos alimentados a cromatina apresentou-se uniforme e compactada, e no decorrer do jejum, foi notada uma crescente descompactação da cromatina, que deve estar relacionada com a interação do DNA com proteínas básicas e a síntese de RNA.

A região heterocromática constitutiva difere da eucromatina pela composição predominante de DNA não codificador e altamente repetido. Ela está sem transcrever e não simplesmente reprimida, e assim representa uma espécie estrutural distinta da cromatina como em ambos os casos de eucromatina condensada tecido-específica (somente uma parte da informação disponível no genoma é expressada) e eucromatina facultativamente heterocromatinizada (segmentos cromossômicos, cromossomos inteiros, ou algumas vezes conjuntos cromossômicos, tornam-se inativos e condensados durante o início do desenvolvimento, permanecendo inativos durante muitas gerações celulares).

Grandes regiões de cromatina condensada que expõem propriedades da heterocromatina constitutiva, foram encontrados nos núcleos de alguns insetos hematófagos, como *Triatoma infestans* (Mello, 1971, 1975, 1976; Mello & Vidal, 1977). A heterocromatinização, como foi atribuída representa um mecanismo de isolamento reprodutivo da espécie (Schreiber *et al.*, 1972).

Mudanças nos padrões de heterocromatinização foram observadas nos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, como uma função do desenvolvimento ninfal (Mello, 1977).

A heterocromatina de *Triatoma infestans* e de *Panstrongylus megistus* pode descompactar parcialmente os filamentos cromatínicos sob a ação de íons cúpricos (Kubrusly, 1984; Randi & Mello, 1987) e também sob ação do jejum (Mello & Raymundo, 1980; Mello, 1983, 1987; Andrade & Mello, 1987). Alguns núcleos, no entanto, sofrem degeneração e lise em ambas situações (Kubrusly, 1984; Andrade & Mello, 1987; Mello, 1987).

O jejum parece encontrar-se entre as várias condições de estresse que induzem a descompactação cromatínica, possivelmente por ativação do mesmo sistema gênico que responde a choques de temperatura (Atkinson & Walden, 1985).

Nos insetos triatomíneos, não só a descompactação da heterocromatina e degeneração de alguns núcleos aparece como resposta ao estímulo do jejum em células somáticas, como também, processos de fusões nucleares (Wigglesworth, 1967 a, 1967 b, 1982; Mello & Raymundo, 1987), sendo que o número de núcleos envolvidos é muito variado e deve representar um mecanismo de sobrevivência celular em condições metabólicas extremamente baixas (Wigglesworth, 1967 a; Mello & Vidal, 1979).

Segundo Mello (1989), a mudança no estado de empacotamento da heterocromatina em resposta ao jejum, deve representar uma tentativa para ativar genes usualmente silentes.

Através de estudos em microscopia eletrônica, Mello *et al.*, 1990), revelaram que, com jejum extremo, as típicas zonas nucleolares, ricas em grânulos RNAr e que usualmente estão cercadas por cromocentros de *Triatoma infestans* são frequentemente substituídas por uma massa de estruturas parecidas com grânulos pericromáticos relatados em células de rato submetidos ao choque hipotérmico (Puvion *et al.*, 1977). De acordo com Monneron e Berhard (1969), os grânulos pericromáticos são carregadores de RNAm. Considerando que a

presença desses grânulos não persiste em núcleos de *Triatoma infestans* alimentados após o jejum, sua aparência está provavelmente relacionada às mudanças fisiológicas provocadas pelo jejum, que afetam a heterocromatina cromocêntrica (Mello *et al.*, 1989).

Pela observação em microscopia de luz, as células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* são binucleadas. Embora os túbulos apresentem um número constante de células, são mais largos no adulto do que em ninfas do 1º estágio. As células dos túbulos crescem sem divisão e, pelo tamanho aumentado do núcleo, é provável que seu conteúdo de DNA aumente (Maddrell *et al.*, 1985). Tais hipertrofias celulares, como base para crescimento do tecido, é freqüente entre os insetos (Pearson, 1974). Em larvas de dípteros este fenômeno está associado com a politenia, enquanto que em hemípteros, a endomitose é mais freqüente (Nur, 1968).

Foi observado, no presente trabalho, através da análise das lâminas e fotomicrografias, que o estresse alimentar induz fusões nucleares em *Rhodnius prolixus*, com maior frequência a partir da terceira semana de jejum.

Através da citofotometria visual e detalhes cariométricos, Mello e Raymundo (1980), indicaram que fusão nuclear ocorre também nos túbulos de Malpighi de outro triatomíneo, *Panstrongylus megistus*, em jejum, aumentando o grau de ploidia por endomitose.

A intensa heteropicnose exibida pela eucromatina destes núcleos indicou aos autores que os produtos nucleares como RNA e proteínas não se alteram durante o jejum em termos quantitativos (Mello, 1975, 1978 b).

De acordo com Palkowitz e Fischer (1968), o tamanho nuclear pode exceder três vezes o seu valor normal devido ao aumento nos níveis de hidratação no núcleo, ou inclusão da matriz citoplasmática durante a fusão ou ambos.

Ainda no presente estudo, a análise estatística dos dados cariométricos das células dos túbulos de Malpighi de machos e fêmeas adultos de *Rhodnius prolixus*, submetidos ao jejum durante 7, 14, 21 e 28 dias, permitiu



verificar que houve um aumento das áreas nucleares durante o transcorrer dessa situação de estresse. Os valores mais altos das áreas nucleares foram encontrados na terceira semana de jejum, tanto em machos como em fêmeas. Neste período também foi encontrada uma maior heterogeneidade das áreas nucleares, em ambos os sexos.

Diante destes resultados e com base nas citações anteriores pode ser sugerido que o jejum induz a descompactação cromatínica ocorrendo assim uma maior taxa de transcrição de moléculas de RNAm que serão traduzidas em proteínas específicas (**"proteínas de estresse"**) e necessárias para a manutenção celular nessa situação emergencial.

Deve ser considerado também que a fusão nuclear, mais comum na terceira semana de jejum, provavelmente foi um dos aspectos que também promoveu, em algumas ocasiões maior aumento da área nuclear. Além disso, nas mesmas situações de ausência de alimentação, as fêmeas tiveram evidências significantes de maior área nuclear quando comparadas com os machos. Em trabalho anterior (Azeredo-Oliveira, 1990), também foi realizada a cariometria das células da glândulas salivares e de túbulos de Malpighi de um outro triatomíneo da espécie *Triatoma vitticeps*, durante o desenvolvimento (do 3º estágio até a fase adulta) de machos e fêmeas. Verificou-se naquele estudo que a área média nuclear das fêmeas foi maior que a dos machos. Como na espécie estudada (*Triatoma vitticeps*), as regiões heterocromáticas eram evidentes, também pode ser constatado que as áreas das regiões heterocromáticas, ao contrário, eram menores nas fêmeas. Foi sugerido então, que a atividade metabólica nas fêmeas era maior do que dos machos.

A explicação encontrada para este fato foi que as fêmeas, por terem um desgaste maior com a atividade reprodutora, teriam necessidades transcricionais maiores que os machos. As áreas heterocromáticas menores nas fêmeas refletiam também, indiretamente, esse fenômeno pois, essas regiões, na maior parte dos exemplos da literatura, são genicamente inativas.

A espécie em estudo, *Rhodnius prolixus*, não apresenta área heterocromática visível nos núcleos das células das fêmeas. Os machos possuem apenas um pequeno corpúsculo heterocromático em seus núcleos. Portanto, apesar dos dados cariométricos aqui apresentados referirem-se apenas às regiões eucromáticas, pode ser constatado que eles corroboram a explicação da maior atividade metabólica das células das fêmeas.

4.1₂-Coloração:Impregnação por íons prata

Os núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* (machos e fêmeas) submetidos ao estresse alimentar, apresentaram uma coloração diferencial nos corpúsculos nucleolares pelos íons prata.

Essa impregnação diferencial pela prata foi observada com maior frequência no decorrer do estresse alimentar. A partir da terceira semana de jejum, a impregnação pela prata foi total, ou seja, não foi possível distinguir regiões intensamente coradas das regiões menos coradas. Este fato deve estar associado à descondensação da cromatina do DNAr, em uma tentativa para aumentar a transcrição de RNAr e conseqüentemente a síntese proteica, devido à baixa taxa metabólica provocada pelo estresse.

Em um prévio trabalho (Medina *et al.*, 1983), foi apontado que a RON, corada pela prata, no primeiro momento de atividade deve estar associada primeiro com a descondensação da cromatina DNAr e depois com a atividade transcricional.

Foi relatado a redução da densidade dos grânulos de prata nos componentes fibrilares densos. Entretanto, uma comparação com o tamanho das áreas coradas pela prata, nos leva a postular que nem todos os componentes estão cobertos por grânulos (Fernández-Gómez *et al.*, 1983; Medina *et al.*, 1983). Dentro dos componentes fibrilares densos, há áreas de dois tipos: algumas delas, de pequeno tamanho, são uniformemente cobertas por grânulos; outras, de

grande tamanho, mostram distribuição irregular dos grânulos. O conhecimento da estrutura nucleolar leva os autores a identificar essas duas classes de centros fibrilares como tipos homogêneos e heterogêneos, respectivamente (Risueño *et al.*, 1982). Os espaços distribuídos nos grânulos de prata correspondem à cromatina condensada.

Durante a mitose, as RONS cromossômicas são coradas. Entretanto, a distribuição dos grânulos de prata novamente é desigual. Isto corresponde a estrutura heterogênea da RON observada após coloração convencional, o mesmo ocorre com os centros fibrilares heterogêneos na intérfase, com inclusões de cromatina condensada e fibras de cromatina descondensada.

Achados citológicos e bioquímicos (Lischwe *et al.*, 1979), descrevem duas proteínas nucleolares coradas pela prata, C23 (nucleolina) e B23 (numatrina). Destas, somente C23 está associada com DNAr (Olson *et al.*, 1983), sugerindo ser a "verdadeira" proteína "Ag-Nor" (Ochs & Busch, 1984).

O padrão de coloração pela prata sugere que duas proteínas são responsáveis pela impregnação nucleolar; uma delas indica a presença de cromatina RON descondensada, a outra, a localização de pré-precursos ribossomais.

Achados citológicos junto com a literatura, sustentam a idéia que proteínas coradas pela prata estão associadas com duas funções nucleolares; o processo de decondensação cromatínica do DNAr, necessário, mas nem sempre envolvendo a transcrição, e processos iniciais de pré-RNAr.

Alguns resultados relataram que a nucleolina (C23) liga-se fortemente à histona H_1 , e sugere entretanto que, a nucleolina induz a descondensação cromatínica pelo deslocamento do domínio na ligação de H_1 . De fato, uma vez foi mostrado que a parte terminal COOH^- da H_1 é primeiramente responsável pelo forte dobramento da cromatina (Allan *et al.*, 1986), deve ser suficiente para a nucleolina enfraquecer a interação entre o domínio e a ligação do nucleossomo na seqüência, para realizar a descondensação da cromatina. A fosforilação da nucleolina pode ter um importante papel na interação, desde então

parece que a desfosforilação da nucleolina induz a ligação com H_1 . Além disso, a nucleolina, que tem forte afinidade pela H_1 , também contém sítios de fosforilação (Allan *et al.*, 1986).

Foi relatado também que a nucleolina pode modificar a estrutura da cromatina nucleolar. Esta função está relacionada com a identificação de dois domínios na sequência da nucleolina: o domínio carboxila terminal, homólogo às proteínas ligadas ao RNA (Bugler *et al.*, 1987), e domínio N-terminal homólogo às proteínas HMG (Lapeyre *et al.*, 1987). Estes achados podem explicar como a nucleolina pode influenciar o equilíbrio entre a atividade e a inatividade da cromatina nucleolar.

Nos núcleos dos insetos alimentados, estudados no presente trabalho, os corpúsculos nucleolares encontravam-se separados, e no mínimo cinco corpúsculos nucleolares eram visualizados por núcleo. Esses corpúsculos nucleolares, no decorrer do jejum apresentaram-se fusionados, com alterações morfológicas. Esse fato pode ser associado com um mecanismo nuclear de compensação para suprir a taxa metabólica baixa, como consequência do estresse.

Um ilustrativo exemplo estudado em detalhes é o dos linfócitos do sangue periférico, no estado ativo e inativo, estimulado *in vitro* pela fitohemaglutinina (PHA) (Petrzelka & Schroeder, 1979). Os linfócitos não estimulados são células pequenas, com núcleos densamente empacotados que usualmente contém um ou raramente dois pequenos nucléolos. Poucas horas após a ativação, as células começam a se transformar em grandes linfócitos. A primeira mudança morfológica do nucléolo, que na maioria dos casos é ainda simples, é um aumento no tamanho e uma transformação no seu interior com nucleolonema. O material do centro fibrilar (CF) está escasso, o centro fibrilar denso (CFD) está desenvolvido em uma grande rede, e o componente granular (CG) não está desenvolvido em nenhuma grande extensão. Medidas de volume de várias seções revelam que durante este estágio, CFD sofreu grande aumento (Hozak *et al.*, 1986, 1989). Com maior ativação, vários nucléolos desenvolvem-se

e tornam-se compactos, contendo primeiramente poucos CFs grandes e mais tarde muitos CFs pequenos, circundados por CFD que também forma uma interconexão em rede entre os CFs. Nas regiões periféricas do nucléolo, uma grande zona de CG desenvolve-se e todos os componentes do nucléolo aumentam de volume.

Algumas outras observações indicam que quando as células são ativadas, as RONS também são, mesmo estando previamente inativas. Foi mostrado que toda RON, em menor grupo de genes repetidos tornam-se desligados, um fato que deve ser considerado quando mecanismos de ativação de genes do RNAr são estudados. Segundo Vidal & Mello (1987), a sobrecarga funcional de alguma organelas citoplasmáticas influencia a área do nucléolo; quanto maior a sobrecarga das organelas citoplasmáticas, maior a área nucleolar.

Seguindo esse mesmo raciocínio pode ser também relacionado a maior área nuclear com maior atividade de transcrição e portanto de sobrecarga funcional. Existe então uma correlação direta entre a maior atividade nuclear e maior atividade citoplasmática, o que pode ser verificado com a correlação linear encontrada entre as áreas nucleares e nucleolares.

Foi verificado também que a área nucleolar aumentou significativamente ao longo do período de jejum e especialmente na terceira semana sem alimentação, nos machos e nas fêmeas. Esse aspecto provavelmente indica uma maior atividade sintética neste período, seguido por uma etapa refratária na quarta semana de jejum.

Ainda ficou constatado que insetos adultos machos da espécie *Rhodnius prolixus* possuem áreas nucleolares maiores que as das fêmeas, em todas as situações estudadas. Esta revelação estatística contradiz, em parte, os dados obtidos através da técnica de coloração com orceína lacto-acética. Portanto, a afirmação de que as células das fêmeas possuem um metabolismo mais ativo, não pode ser totalmente constatado, já que a área nucleolar maior encontrada nos machos reflete também uma maior atividade sintética.

Os triatomíneos do presente trabalho (*Rhodnius prolixus*) que foram realimentados após um período de 30 dias de jejum, não apresentaram uma total recuperação da morfologia nucleolar.

Esses insetos realimentados apresentaram núcleos com corpúsculos nucleolares parcialmente fusionados. Em machos, foi possível observar a impregnação diferencial pela prata; no entanto, em fêmeas, os corpúsculos nucleolares foram totalmente impregnados pela prata. Este fato pode estar associado com uma alteração mais drástica nos núcleos das células dos túbulos de Malpighi das fêmeas em relação aos machos.

Os dados estatísticos da cariometria revelaram que houve uma correlação linear entre a área nuclear e a área nucleolar ou seja, o aumento da área nucleolar foi sempre acompanhado pela área nuclear. Esta correlação foi positiva e relativamente alta em todas as situações de alimentação, em insetos machos e fêmeas, exceto na condição de fêmeas recém-alimentadas.

Azeredo-Oliveira (1990) constatou que as áreas médias nucleares e nucleolares dos túbulos de Malpighi de indivíduos machos e fêmeas de *Triatoma vitticeps* em desenvolvimento, são inversamente proporcionais entre o 3º e 4º estádios, com aumento acentuado da área nuclear e redução da área nucleolar. Porém, ambas aumentam entre o 4º e o 5º estádios, embora em níveis diferentes (muito mais acentuadamente a área nucleolar). Do 5º estágio para a fase adulta, nas fêmeas, ambas áreas aumentam, sendo o aumento da área nucleolar mais acentuado que o da área nuclear. No mesmo período dos machos, porém, a área nuclear mostra drástica redução enquanto a área nucleolar apresenta aumento.

Nanya e Bicudo (1995), estudaram as áreas nucleolares de tecido adiposo em cinco estágios de desenvolvimento de *Drosophila mulleri*. Dados deste trabalho revelaram variações das áreas nucleolares em machos e fêmeas, onde nas fêmeas as áreas nucleolares foram acentuadamente maiores que nos machos nos estágios analisados. Esses resultados estão relacionados com a síntese proteica nas células adiposas, indicando que áreas nucleolares são

maiores nos estádios de alta síntese proteica e menores quando os níveis de síntese diminuem.

Na literatura, mecanismos regulatórios decrevem que a produção de RNAr, pode ativar em várias situações, diferentes números de cístron de DNAr. Frequentemente, tais variações na produção do RNAr e ribossomos estão relacionadas à variação de número e tamanho nucleolar (Nanya & Bicudo, 1995).

4.1.3. Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) para Complexos DNA-proteína

Complexos DNA-proteína *in vitro* e *in situ*, se corados com soluções de Azul de Toluidina (AT) contendo concentrações crescentes de Mg^{2+} ou Ca^{2+} , mostram abolição da metacromasia em uma certa concentração, em molaridade, do cátion inorgânico. Esse fenômeno é chamado de concentração crítica de eletrólitos (CEC) e é aplicado em estudos de complexos DNA- e RNA-proteínas em associação com diferentes estados de supraorganização da cromatina (Vidal & Mello, 1989; Mello *et al.*, 1993; Mello & Falco, 1996).

A competição de A.T. e Mg^{2+} para a ligação nos sítios do substrato diferem, quando se compara heterocromatina e eucromatina, núcleos de espermatozóides entre diferentes espécies animais, pufes de DNA e RNA com heterocromatina e bandas dos cromossomos politênicos, e os mesmos núcleos sobre diferentes condições fisiológicas ou desenvolvimento (Mello & Vidal, 1989; Monteiro, 1993; Mello & Falco, 1996).

A primeira evidência da possibilidade de aplicação do conceito de CEC para a cromatina com o corante A.T. apareceu no trabalho de Vidal (1979), quando estudava cromossomos politênicos de glândulas salivares de *Trichosia pubescens*, e observou a abolição da metacromasia em cromossomos tratados com uma solução deste corante contendo altas concentrações de Mg^{2+} (Amaral, 1988).

Posteriormente, em experimentos *in vitro*, Vidal & Mello (1987), demonstraram que a CEC de complexos DNA/H₁ era mais baixa que a CEC de DNA puro, porém mais alta do que a de complexos DNA/protaminas, o que estaria de acordo com a organização destes complexos nucleoproteicos e com sua variação em grupos fosfatos disponíveis à ligação, seja com o corante, seja com os cátions. Por outro lado, em experimentos *in situ*, Mello & Vidal (1987), encontraram diferenças no valor de CEC entre heterocromatina e eucromatina de células de *Triatoma infestans*. Estas diferenças variam quando o mesmo material é tratado com íons cúpricos (Randi & Mello, 1987).

O método de CEC é vantajoso para estudos da cromatina na interação DNA-proteína *in situ*. Esta conclusão, está de acordo que diferentes valores de CEC detectados *in situ* em diferentes tipos de cromatina. Na heterocromatina (cromatina condensada não codificante) de células de insetos da espécie *Triatoma infestans* alimentados, altos valores de CEC foram achados em contraste com valores de CEC da eucromatina (potencialmente transcrevendo). O valor de CEC da heterocromatina iguala-se ao da eucromatina (Amaral, 1988).

Nos insetos *Rhodnius prolixus* (machos) alimentados, no presente trabalho, o valor da CEC correspondeu a 0,5 M. Esse valor decresceu a medida que o período de estresse aumentou, sendo que na última semana de jejum, o valor da CEC atingiu 0,2 M. Em fêmeas, o estresse alimentar foi menos drástico, sendo que o valor de CEC em insetos alimentados atingiu 0,3M, e na última semana de jejum, a CEC atingiu 0,2M.

Pode ser sugerido que o estresse provocado pela ausência de alimentação cause uma maior descompactação da cromatina, levando a uma maior liberação dos grupos fosfatos dos ácidos nucleicos disponíveis. Dessa forma, uma solução contendo uma menor concentração de Cloreto de Magnésio poderá abolir a metacromasia mais facilmente, pois os íons catiônicos existentes na solução são suficientes para ligarem-se aos substratos aniônicos dos ácidos nucleicos levando à coloração esverdeada da cromatina. Aparentemente, os

núcleos dos insetos machos apresentam uma maior compactação da cromatina do que as fêmeas.

Segundo Amaral (1988), o decréscimo dos valores de CEC pode indicar uma certa descompactação cromatínica, que talvez pudesse se manifestar apenas em atividades metabólicas extremamente baixas, como resposta ao estresse (Amaral, 1988). Os resultados destas situações *in situ*, entretanto, esclarecem não somente em termos das diferenças de disponibilidade dos fosfatos de DNA para ligação do corante ou Mg^{+2} , mas também em termos da concentração de DNA afetado pelo estado de compactação da cromatina.

Os valores de CEC da heterocromatina diferem daqueles da eucromatina, em condições de nutrição e são diferentemente afetados pelo jejum e realimentação. Isto é explicado pelas diferenças na composição e estrutura da cromatina, quando considera-se hetero-e eucromatina de diferentes espécies e a resposta a estes tipos de cromatina ao jejum (Amaral, 1988).

Em insetos *Rhodnius prolixus*, a heterocromatina é pouco visualizada, em relação as outras espécies de triatomíneos como *Triatoma infestans*. Desse modo, não foi possível analisar a CEC diferencial entre heterocromatina e eucromatina nestes insetos.

A ocorrência da descompactação cromatínica em núcleos tratados apenas com A.T. em pH 4,0, foi ilustrada observando-se a metacromasia. Em indivíduos alimentados, a metacromasia apresentou-se na coloração azul; a medida que o estresse desenvolveu-se, a coloração observada foi violeta. Isso indica que como consequência da descompactação cromatínica, ocorre maior liberação do substrato aniônico (grupos fosfatos), assim as moléculas do corante ligam-se a esse substrato na forma de trímeros ou tetrâmeros, promovendo um abaixamento do comprimento de onda e consequentemente um hipocromismo.

Nos insetos *Rhodnius prolixus*, machos, que após 30 dias de jejum foram realimentados, foram observadas alterações no valor da CEC, mostrando um valor mais alto do que o atingido na 4ª semana de jejum. Essa alteração deve

indicar um aumento no grau de empacotamento da cromatina, uma vez que são retomadas as condições normais do metabolismo do núcleo.

Em fêmeas realimentadas após 30 dias de jejum, o valor da CEC, em contraste com o valor encontrado em machos, diminuiu em relação à 4ª semana de jejum. Pode ser deduzido que os núcleos das células das fêmeas sofreram mais alterações metabólicas com o estresse, não sendo observada mudança no empacotamento da cromatina.

Portanto, os núcleos das células dos túbulos de Malpighi dos triatomíneos realimentados após um período de 30 dias de jejum alcançaram a CEC com baixas concentrações de Cloreto de Magnésio na solução de Azul de Toluidina. Estes resultados indicam que não há um retorno imediato do nível de compactação dos nucleofilamentos após uma situação de estresse que leva à descondensação cromatínica.

4.1.3.1. Variante da CEC para Complexos RNA-proteína: Nucléolo e RNA citoplasmático

Baseado no fato que o ponto de CEC de RNA é sempre maior que o do DNA, uma variante do método de CEC foi proposta onde o tratamento com Mg^{2+} não é simultâneo mas segue-se a coloração com A.T. (Mello *et al.*, 1993). Sobre estas condições, enquanto o DNA cora-se em verde, o RNA permanece metacromático, seguindo discriminação diferencial do RNAr, localização e evidência de detalhes supraestruturais dos nucléolos e o acompanhamento do RNA durante a divisão celular (Mello *et al.*, 1993; Mello, 1995). Adicionalmente, este método está sendo proposto como simples e usual para identificação de células apoptóticas, onde a cromatina cora-se em verde (DNA) e a presença de RNA nos corpos apoptóticos é representada pela cor violeta (Vidal *et al.*, 1996).

A visualização do nucléolo em soluções de A.T. é freqüentemente impedida pela forte afinidade das moléculas do corante no DNA. Isto faz com que em preparações de alguns materiais não submetidos a digestão enzimática, o

nucléolo não poderá ser distingüido das áreas heterocromáticas (Mello *et al.*, 1993)

No trabalho de Mello *et al.*, (1993), em algumas preparações, após a coloração com A.T., seguiu-se o tratamento com íons Mg^{2+} , onde o nucléolo é facilmente detectado, devido à concentração suficiente do Mg^{2+} para abolir a metacromasia do DNA. Foi observado que a metacromasia do RNA é mantida em concentrações mais altas de Mg^{2+} , do que aquelas requeridas para obtenção dos valores de CEC de DNA ou complexos DNA/proteína. Esta observação está de acordo com relatos de Scott (1973) na CEC *in vitro*, embora diferentes corantes e cátions inorgânicos foram utilizados. As concentrações de Mg^{2+} mais adequadas para visualização do nucléolo nos materiais estudados são 0,03-0,05 M. Nestas circunstâncias, o pico de absorção espectral foi de $\lambda=570$ nm e 610 nm em nucléolo de *Allium cepa* e cromatina, respectivamente.

Esta técnica razoavelmente simples não somente permite a identificação do nucléolo, como também pode ser usada em estudos morfométricos, devido a boa qualidade do contraste nucleolar. Em células de *Allium cepa*, esse método demonstrou alguns detalhes da subestrutura nucleolar, que não são distingüidos em poucos nucléolos discriminados com a coloração de A.T. Os detalhes dessas subestruturas foram descritos somente com a técnica de impregnação pelos íons prata, onde foi realizado o acompanhamento da distribuição dos componentes nucleolares como função da fisiologia celular (Fernández-Gomez *et al.*, 1972; Fernández-Gomez *et al.*, 1983; Stockert *et al.*, 1969).

Essa técnica foi aplicada nos núcleos das células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*, machos e fêmeas, alimentados e submetidos ao estresse alimentar.

Os complexos ribonucleoproteicos (nucléolos) foram evidenciados nos núcleos dos insetos alimentados (machos e fêmeas), após 15 minutos de exposição a solução extratora de Cloreto de Magnésio a 0,05 M. Os núcleos dos insetos submetidos ao maior tempo de jejum (28 dias) tiveram os corpúsculos



nucleolares visíveis (metacromáticos) com menor tempo de exposição à solução de Cloreto de Magnésio (machos: 3 minutos; fêmeas: 7 minutos). Pode ser sugerido que a cromatina mais descompactada dos núcleos dos insetos em jejum, tenha sua metacromasia abolida mais facilmente do que as dos núcleos normais.

Portanto, enquanto a metacromasia do DNA é abolida, a metacromasia do RNA é bem discriminada. Este fenômeno ocorre mais rapidamente nos núcleos submetidos ao estresse de ausência de alimentação.

Os insetos (machos e fêmeas) realimentados após o período de 30 dias de jejum tiveram os corpúsculos nucleolares evidenciados (metacromasia do RNA) após poucos minutos de exposição à solução de Mg^{2+} (5 minutos). Este resultado confirma que a cromatina descompactada após o estresse do jejum, não retorna à condição normal e dessa forma a metacromasia do DNA é abolida mais rapidamente. No entanto, a melhor visualização dos corpúsculos nucleolares foi constatada no período de 15 minutos de exposição à solução de Cloreto de Magnésio.

Através dessa técnica variante da CEC, foi possível confirmar os dados observados na impregnação pelos íons prata, onde ocorreu fusão dos corpúsculos nucleolares no desenvolvimento do estresse alimentar, em alguns núcleos analisados. No entanto, os corpúsculos nucleolares impregnados pela prata apresentaram uma área aparentemente maior em relação aqueles evidenciados pelo método de CEC. Este fato deve estar relacionado com a impregnação dos íons prata nas proteínas nucleolares, enquanto que no método de CEC, apenas o RNA citoplasmático é evidenciado.



4.2- Temperatura como fator de estresse

4.2.1- Coloração: Impregnação por íons prata

Choques hipotérmicos (-4°C) e choques hipertérmicos (40°C), afetaram os fenótipos nucleares de *Rhodnius prolixus* (machos e fêmeas).

Na literatura já foi verificada que alterações significantes afetam parte da população nuclear ocorridas em células epiteliais dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*. Os fenótipos nucleares que foram observados predominantemente ou exclusivamente em espécies submetidas aos choques hipo e hipertérmicos, foram relatados em ninfas submetidas a outras condições de estresse, tais como ação de metais pesados, radiação gama e longos períodos de jejum (Mello, 1983,1989; Kubrusly, 1984; Álvares-Garcia, 1988). Estas observações sustentam a idéia que diferentes estressores podem induzir a resposta ao choque térmico (Hightower *et al.*, 1985; Schlesinger, 1985).

Nos insetos *Rhodnius prolixus*, aqui estudados, o choque hipertérmico afetou mais drasticamente os núcleos das células dos túbulos de Malpighi do que o choque hipotérmico, em períodos de tempo correspondentes a 1 hora, 6 horas e 12 horas.

As alterações nucleares foram representadas pelas fusões dos corpúsculos nucleolares, aumento da poliploidia, e impregnação diferencial pelos íons prata.

Como observado anteriormente no estresse alimentar, os núcleos das células das fêmeas foram mais alterados do que os núcleos dos machos.

No choque hipertérmico, foram notadas fusões de corpúsculos nucleolares mais acentuadas e endomitose. As fusões nucleolares iniciaram-se após 6 horas de exposição ao choque hipertérmico, não ocorrendo no choque hipotérmico no mesmo período, exceto em fêmeas, onde as alterações foram mais drásticas.



As fusões nucleolares foram mais acentuadas nos períodos mais prolongados de exposição aos choques de temperatura (12 horas), em machos e fêmeas da espécie analisada.

A reunião dos corpúsculos nucleolares induzida pelas alterações drásticas de temperatura, talvez possa refletir uma necessidade metabólica celular para uma mais rápida transcrição de moléculas de RNAs ribossômicos. Essa demanda transcricional deve estar ligada a indução da síntese de proteínas de estresse que serão importantes para manter a taxa de sobrevivência dos insetos.

Este fenômeno possivelmente desencadeia um aumento da atividade transcritiva pós-choque, permitindo não só a recuperação das atividades celulares normais, mas também estimulando o metabolismo, como em outros casos já relatados de resposta ao choque hipertérmico (Atkinson & Walden, 1985).

A origem do núcleo poliplóide sem nenhuma elaboração do fuso, citocinese ou ruptura da membrana nuclear, foi primeiramente descrito em *Gerris lateralis* e outros heterópteros (Geitler, 1938, 1939 a,b). Este achado tem sido mostrado em vários grupos.

Poliploidia em células com atividade aumentada pode refletir, como em outros casos, a grande demanda para produção de RNAs pelas células. É um processo adaptativo em que as células economizam tempo fisiológico e síntese protéica, isto é, não havendo a formação do aparelho mitótico e membrana nuclear necessários para uma divisão somática (Mello & Raymundo, 1980).

Poliploidia somática deve ser funcionalmente comparada aos cromossomos politênicos e plumosos, uma vez que a poliploidia em células de grande atividade funcional deve refletir, como em outros casos, no aumento da demanda da produção de RNA por todas as células (Simões, 1967).

As células dos túbulos de Malpighi de *Rhodnius* possuem dois núcleos e esses são normalmente poliplóides. As células desses órgãos não se dividem e o número de células em um túbulo permanece constante embora os



túbulos sejam maiores nos adultos do que no primeiro estágio. Pelo tamanho aumentado do núcleo nos diferentes estádios, é provável que o conteúdo de DNA aumente e neste caso, por endomitose (Nur, 1968). Segundo Pearson (1974), essa forma de crescimento não é perturbada pela divisão celular e ainda o aumento do tamanho celular pode ser igualado por aumentos apropriados no conteúdo de DNA. Segundo Maddrell *et alii* (1985), pelo menos em *Rhodnius* (triatomíneo), está claro que mesmo quando ocorre a replicação do DNA, a ação normal do túbulo não é afetada, como observaram os autores pelas taxas de secreção e excreção do fluido. De fato, a produção de precursores ribossômicos parece ser interrompida pela replicação do DNA durante um curto período de tempo. Os nucléolos são proeminentes nas células dos túbulos de *Rhodnius* exatamente antes dos cromossomos se condensarem e se dividirem, e reaparecem após um dia. Segundo os autores, provavelmente os ribossomos e o RNAm, produzidos no período antes da divisão dos cromossomos, persistem tempo suficiente no citoplasma para permitir a função normal da célula durante a replicação do DNA, condensação cromossômica e subsequente expansão.

Mello e Lima (1978), observaram que o tamanho nuclear aumenta nos túbulos de *Rhodnius prolixus* durante o desenvolvimento larval, numa proporção que excede ao aumento do conteúdo de DNA. De acordo com esses autores essas observações concordam com os padrões cariométricos de outro triatomíneo (*T. infestans*) observados por Mello (1971) e foram atribuídas, segundo revisão da autora, ao conteúdo de proteínas não histônicas e/ou ao transporte do RNA do núcleo ao citoplasma, que varia em função da expressão gênica.

A observação no presente estudo de núcleos altamente poliplóides, com grande número de corpúsculos nucleolares, pode ser explicada também pela brusca alteração do metabolismo do inseto, induzida pelos choques térmicos. A resposta a esses estresses leva ao aumento dos componentes nucleoprotéicos com a finalidade de maior transcrição de RNAr e conseqüentemente de síntese de "proteínas termoprotetoras". Como já mencionado anteriormente, esse mecanismo

leva a manutenção da taxa de sobrevivência dos triatomíneos após os choques térmicos.

A impregnação diferencial pelos íons prata encontrada nos corpúsculos nucleolares dos núcleos dos túbulos de Malpighi dos indivíduos submetidos aos estresses térmicos, refletem em parte o mecanismo da coloração e a atividade celular.

Como já relatado, nesta técnica os componentes que se coram pela prata são as proteínas não histônicas (acídicas) representadas especificamente pelas proteínas C23 e B23, que se acumulam em torno das RONS ou nos nucléolos. Estudos de híbridos celulares somáticos homem/rato indicaram que somente as regiões que produzem RNAr e presumivelmente tenham funcionado como RON na intérfase precedente, coram-se pela prata. A aplicação da técnica aos cromossomos de ovócito de grilo levou à mesma conclusão, sugerindo que a prata liga-se às proteínas que se associam rapidamente ao RNAr logo após sua transcrição (Bicudo, 1979 *apud* Azeredo-Oliveira, 1990). Entretanto, outros trabalhos tem colocado em dúvida essas indicações como Clavaguera *et al.* (1983, 1984). Conforme o primeiro desses trabalhos, baseado na afinidade dos íons prata pelos diferentes constituintes da cromatina (DNA, RNA, histonas, proteínas não-histônicas totais), a colorabilidade das RONS pelos mesmos não pode ser atribuída a um componente isolado da cromatina pois, todos eles se ligam a esses íons, sendo a ligação mais forte com o DNA. A utilização de enzimas proteolíticas e nucleases, no segundo trabalho, não impediu a coloração das RONS. Ambos os resultados levaram os autores a sugerir que a coloração diferencial das RONS pela prata está relacionada com a descondensação diferencial da cromatina.

Portanto, podemos atribuir essas duas explicações à impregnação não homogênea dos íons prata nos corpúsculos nucleolares, isto é, apenas as regiões ativas e descondensadas da cromatina (DNAr) é que ficam mais evidentes. Tanto a descondensação diferencial da cromatina como a atividade transcricional são induzidas pelos choques hipo e hipertérmicos.

Além disso, em baixas temperaturas, os componentes nucleolares distribuem-se diferentemente como já verificado por Jordan *et al.* (1985). Esses autores analisaram os efeitos da temperatura e envelhecimento sobre os nucléolos das células do meristema apical da raiz de *Triticum aestivum*, durante o desenvolvimento.

Os autores observaram que, após a germinação, as raízes mostram um período de rápida divisão celular e crescimento. Seguindo a germinação, o volume nucleolar das células meristemáticas aumenta progressivamente em todas as temperaturas estudadas e os estágios iniciais foram acompanhados de um aumento na taxa de RNAr. Quanto à ultraestrutura nucleolar, foi verificado que o crescimento a 5°C pode causar um acúmulo de partículas pré-ribossômicas através do efeito de baixa temperatura sobre alguma etapa do processamento que possui alta ativação da energia. Os resultados morfométricos mostraram um aumento do componente granular, demonstrando, possivelmente um efeito da temperatura sobre o processamento. Os autores concluíram através dos resultados, que essas mudanças quantitativas do nucléolo, relacionam-se à regulação dos processos que ocorrem nessa organela.

Fakan e Hernandez-Verdum (1986), relacionaram formato nucleolar variável com variações da atividade transcricional dessa organela, de acordo com a fase do desenvolvimento do inseto e/ou ritmo circadiano. Sobre esse aspecto no presente estudo, poderíamos acrescentar mais uma justificativa para a alteração do formato nucleolar, ou seja, os choques de temperatura.

4.2- Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC)

Os triatomíneos, *Rhodnius prolixus*, submetidos à temperatura de 21°C, tiveram valores de CEC correspondentes à 0,5 M e 0,3 M, em machos e em fêmeas, respectivamente.



Esses valores de CEC indicam que nas fêmeas o grau de descompactação cromatínica é maior, talvez provocado por uma alteração no metabolismo referente à produção de ovos ou desenvolvimento embrionário, já que todas as fêmeas dissecadas, apresentavam ovos em desenvolvimento.

As fêmeas adultas teriam assim, um maior requerimento de síntese do que os machos. Esse fato foi também verificado nas fêmeas adultas de *Triatoma vitticeps*, através de estudos de cariometria nos túbulos de Malpighi e glândulas salivares (Azeredo-Oliveira, 1992).

Insetos machos submetidos à temperatura de 40°C e -4°C, durante o período de 1 hora, 6 horas e 12 horas, apresentaram alterações nos valores de CEC.

Na temperatura de -4°C, o valor de CEC em machos aumentou em relação a temperatura de 21°C, no período de 1 hora de exposição (0,5M à 21°C e 0,6M à -4°C), decresceu no período de 6 horas (atingindo o valor de 0,4 M) e permaneceu constante após 12 horas de exposição. Em fêmeas, o valor de CEC decresceu após 12 horas de exposição à temperatura de -4°C (0,2M). Esses valores indicam que o choque hipotérmico afetou mais rapidamente o grau de descompactação da cromatina em machos do que nas fêmeas. No entanto, nas fêmeas, a CEC atingiu valores menores (0,2 M) do que nos machos.

No início da exposição dos núcleos aos dois choques térmicos (-4°C; 40°C), no período de 1 hora, a cromatina apresentou abolição da metacromasia (cor verde) com a concentração de Mg^{2+} 0,6 M em todas as situações. Sugere-se que, no início dos estresses por alteração de temperatura, ocorra uma maior compactação dos nucleofilamentos em resposta ao primeiro contato com as alterações bruscas de temperatura.

No choque hipertérmico (40°C), os valores de CEC em machos decresceram com 12 horas de exposição, atingindo o mesmo valor que em fêmeas. Esse fato, mostra que a temperatura alta é um fator mais estressante para as fêmeas do que para os machos, indicando uma possível descompactação cromatínica em maior grau nas fêmeas.

Tanto no choque hipotérmico (-4°C) como no hipertérmico (40°), os núcleos dos insetos (machos e fêmeas) tiveram o ponto de CEC atingido com menor concentração de Cloreto de Magnésio, quando o tempo de exposição foi maior (12 horas). Portanto, houve uma descompactação da cromatina ao longo dos períodos de exposição aos estresses, levando à abolição da metacromasia dos complexos DNA-proteínas.

Pode-se concluir que as temperaturas mais altas afetam mais drasticamente machos e fêmeas do que temperaturas mais baixas. Esse fato pode estar associado às proteínas de estresse (*hsp*), que devem se tornar ativas nas temperaturas mais altas.

De acordo com Southgate *et al.* (1985), a presença das proteínas *hsp* certamente participa de uma parte da taxa de sobrevivência do inseto sob condições hipertérmicas.

Com relação ao choque hipotérmico não há relato de que o mesmo induza a síntese de proteínas de estresse, como no caso do choque hipertérmico. Isto, porém, não é descartado, desde que o estresse produzido possa induzir a presença de proteínas desnaturadas e/ou anormais, que sejam como tal reconhecidas pela célula e desencadeiam uma resposta típica como aquela esperada de um choque hipertérmico (Ananthan *et al.*, 1986; Edington *et al.*, 1989).

5. Conclusões

Os núcleos das células dos lúbulos de Malpighi de machos e fêmeas de *Rhodnius prolixus* apresentaram várias alterações durante os dois tipos de estresses estudados no presente trabalho observados através das diferentes técnicas citológicas.

5.1- Ausência de Alimentação

- 1- Diferentes fenótipos de distribuição da cromatina e do nucleolo; irregularidade no contorno nuclear; fusão nuclear e nucleolar.
- 2- Aumento das áreas nucleares e nucleolares e correlação linear entre elas, com valores mais altos especialmente na terceira semana de jejum.
- 3- Descompactação gradual da cromatina ao longo do jejum e correlação da maior compactação dos núcleos dos machos.
- 4- Após a situação de realimentação de insetos em jejum prolongado, não ocorre um retorno imediato do nível de compactação dos nucleolitos.
- 5- A aplicação de metacromasia dos complexos DNA/proteínas e análise discriminatória de metacromasia do DNA nucleolar, ocorreu rapidamente e com menor concentração de ions salínicos (Mg^{2+}) induzidas pelo jejum.

5.2- Alteração de temperatura (choques hipó e hipertérmicos)

- 1- Fusão nucleolar verificada nos núcleos expostos tanto a 40°C como a -4°C, e mais acentuadamente nos períodos mais prolongados de exposição aos choques térmicos.
- 2- Aumento da ocorrência de núcleos poliploides e dos corpúsculos nucleolares durante o choque hipotérmico com 12°C.
- 3- Impregnação dos nucleolitos com corantes nucleolares, indicando a presença de metacromasia nos lúbulos de Malpighi, indicando a cromatina portadora de DNA e variação de metacromasia.

5. Conclusões

Os núcleos das células dos túbulos de Malpighi de machos e fêmeas de *Rhodnius prolixus* apresentaram várias alterações durante os dois tipos de estresses estudados no presente trabalho observadas através das diferentes técnicas citológicas:

5.1- Ausência de Alimentação

- 1- Diferentes fenótipos de distribuição da cromatina e do nucléolo; irregularidade no contorno nuclear; fusão nuclear e nucleolar.
- 2- Aumento das áreas nucleares e nucleolares e correlação linear entre elas, com valores mais altos especialmente na terceira semana de jejum.
- 3- Descompactação gradual da cromatina ao longo do jejum e constatação da maior compactação dos núcleos dos machos.
- 4- Após a situação de realimentação de insetos em jejum prolongado, não ocorre um retorno imediato do nível de compactação dos nucleofilamentos.
- 5- A abolição da metacromasia dos complexos DNA/proteínas e discriminação da metacromasia do DNA nucleolar, ocorrem rapidamente, e com menor concentração de íons catiônicos (Mg^{2+}) induzidos pelo jejum.

5.2- Alteração de temperatura (choques hipo e hipertérmicos)

- 1- Fusão nucleolar verificada nos núcleos expostos tanto a 40°C como a -4°C, e mais acentuadamente nos períodos mais prolongados de exposição aos choques térmicos.
- 2- Aumento da ocorrência de núcleos poliplóides e dos corpúsculos nucleolares durante o choque hipertérmico, com 12 horas de exposição.
- 3- Impregnação não homogênea dos íons prata nos corpúsculos nucleolares indicando descondensação diferencial dos nucleofilamentos da região da cromatina portadora de DNAr e variação da atividade transcricional.

4- Compactação dos nucleofilamentos no início da exposição aos dois tipos de choques térmicos (1 hora) e posterior descompactação ao longo dos períodos de exposição mais prolongados (6 e 12 horas). Este fenômeno foi verificado pela abolição da metacromasia dos complexos DNA-proteínas em menores concentrações de íons catiônicos ($MgCl^{2+}$).

5- Alteração mais drástica da cromatina dos núcleos dos indivíduos expostos ao choque hipertérmico (40°).

Nos dois tipos de estresses estudados pode ser verificado, indiretamente, que ocorrem mecanismos metabólicos nucleares que levam à síntese de "proteínas de estresses" necessária para a proteção e manutenção da célula.

Esses mecanismos envolvem basicamente a alteração da distribuição da cromatina e nucléolo; aumento das áreas nucleares e nucleolares e descompactação da cromatina ao longo das situações de estresse.

6. Resumo

O presente trabalho estudou as alterações nos núcleos das células dos túbulos de Malpighi do triatômico *Rhodnius prolixus* frente aos estresses provocados pelo jejum alimentar e exposição a choques de temperatura (hipotérmicos e hipertérmicos).

Neste trabalho foi observado, através de diferentes técnicas citológicas que o estresse alimentar afeta mais drasticamente indivíduos que permaneceram 21 dias em jejum, tanto em machos como nas fêmeas.

Essas alterações foram visualizadas, utilizando-se a coloração pela proteína lacto-acética que cora proteínas totais ligadas ao DNA (reação de acidofilia) e impregnação pelos ions prata, responsável pela coloração das proteínas presentes nos corpúsculos nucleolares, a nucleolina (C23), e a nucleína (B23) (reação de acidofilia).

As alterações mais comumente observadas no estresse alimentar referem-se às mudanças na distribuição da cromatina, aumento das áreas nucleares e nucleolares, núcleos com contorno irregular e fusão dos corpúsculos nucleolares. Essas alterações foram acentuadas no decorrer do jejum.

Através do método de Concentração Crítica de Eletrolitos, que se utiliza de solução de Azul de Toluidina (AT) com tampão Machavaine e diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio, foi possível confirmar citologicamente a descompactação da cromatina.

Foi constatado que com o desenvolvimento do jejum, o ponto de CEC decresce, indicando descompactação da cromatina. Ocorre então liberação dos grupos PO_4^{3-} que se ligam aos cátions inorgânicos, representados pelo cloreto de magnésio. Dessa modo, os núcleos atingem uma coloração esverdeada, perdendo a metacromasia (azul violeta).

Através da técnica de Mello et al., 1993, é possível confirmar a fusão dos corpúsculos nucleolares no decorrer do jejum, observado na técnica de impregnação pela prata.

6. Resumo

O presente trabalho estudou as alterações nos núcleos das células dos túbulos de Malpighi do triatomíneo *Rhodnius prolixus*, frente aos estresses provocados pelo jejum alimentar e exposição à choques de temperatura (hipotérmicos e hipertérmicos).

Neste trabalho foi observado, através de diferentes técnicas citológicas que o estresse alimentar afeta mais drasticamente indivíduos que permaneceram 21 dias em jejum, tanto em machos como nas fêmeas.

Essas alterações foram visualizadas, utilizando-se a coloração pelaorceína lacto-acética, que cora proteínas totais ligadas ao DNA (reação de acidofilia) e impregnação pelos íons prata, responsável pela coloração das proteínas presentes nos corpúsculos nucleolares, a nucleolina (C23), e a numatrina (B23) (reação de acidofilia).

As alterações mais comumente observadas no estresse alimentar referem-se às mudanças na distribuição da cromatina; aumento das áreas nucleares e nucleolares; núcleos com contorno irregular e fusão dos corpúsculos nucleolares. Essas alterações foram acentuadas no decorrer do jejum.

Através do método de Concentração Crítica de Eletrólitos, que se utiliza de solução de Azul de Toluidina (AT) com tampão MacIlvaine e diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio, foi possível confirmar citoquimicamente a descompactação da cromatina.

Foi constatado que com o desenvolvimento do jejum, o ponto de CEC decresce, indicando descompactação da cromatina. Ocorre então liberação dos grupos PO_4^{2-} que se ligam aos cátions inorgânicos, representados pelo cloreto de magnésio. Desse modo, os núcleos atingem uma coloração esverdeada, perdendo a metacromasia (azul violeta)

Através da variante da CEC, proposta por Mello *et al.*, 1993, é possível confirmar a fusão dos corpúsculos nucleolares no decorrer do jejum, observado na técnica de impregnação pela prata.



Insetos que foram realimentados após 30 dias de jejum, apresentaram apenas uma leve recuperação da condensação cromatínica. Assim, no método de CEC, observou-se um aumento na concentração, em mol, do cloreto de magnésio. Em relação aos corpúsculos nucleolares, estes apresentaram-se não fusionados.

Para o estudo das alterações provocadas pelos choques de temperatura (choques hipotérmico e hipertérmicos), foram utilizadas as técnicas de impregnação pela prata e Concentração Crítica de Eletrólitos.

Nesse tipo de estresse, foram observadas as mesmas alterações provocadas pelo estresse alimentar (descompactação cromatínica, fusão nucleolar e também poliploidias). A ocorrência dessas alterações variou com o tipo de choque e o tempo de exposição.

Foi constatado que os núcleos foram alterados mais drasticamente com o choque hipertérmico (40°C), do que com o choque hipotérmico. No entanto, no maior período de exposição (12 horas) aos choques, tanto em temperaturas altas como em temperaturas baixas, ocorreu uma maior descompactação da cromatina, o que levou a abolição da metacromasia dos complexos DNA-proteínas com menores concentrações de Cloreto de Mgnésio.

Nesses dois tipos de estresses estudados pode ser verificado que ocorreram mecanismos metabólicos nucleares que à levam a proteção celular. Esses mecanismos envolvem basicamente o aumento das áreas nucleares e nucleolares e descompactação cromatínica, que refletem uma maior síntese de proteínas induzidas pelos estresses.

7. Summary



The present work studied changes in Malpighian tubules cells nuclei of the hematode *Rhodnius prolixus*, in conditions of stress produced by starvation and by heat shocks (hypothermic and hyperthermic).

In this work it was observed that, through different cytological techniques, starvation affects most drastically individuals with 21 days of starvation, in both males and females.

These alterations were visualized using lacto-acetic orcein, which stains total proteins complexed with DNA (acidophilic reaction) and impregnation by silver ions, responsible for the staining of proteins present in nucleolar corpuscles, a nucleolus (C23) and nucleolus (B23) (acidophilic reactions).

The alterations most commonly observed with starvation involve changes in chromatin distribution, increased nuclear and nucleolar areas, nucleus with irregular outlines and fusion of nucleolar these alterations were evident during starvation.

By the method of critical electrolyte concentration (CEC), which uses solution of toluidine blue (AT) with Mcllvaine buffer and different concentration of magnesium chloride, it was possible to confirm cytochemically the extension of the chromatin.

It was observed that with the continuation of starvation the CEC point decreases, which indicates extension of the chromatin. Liberation of PO_4^{2-} groups then occurs and these bind to inorganic cations in the form of magnesium chloride. In this manner, the nucleus become greenish, losing the metachromasy (violet blue).

By the variant of CEC (Mello et al., 1993), it is possible to confirm the fusion of nucleolar corpuscles during starvation, which was observed by silver impregnation.

7. Summary

Insects which were starved for 21 days showed only a slight recuperation of chromatin condensation. Thus, by the method of CEC there

was observed an increase in the concentration, in moles, of magnesium chloride. As to nuclei: The present work studied changes in Malpighian tubules cells nuclei of the triatomide *Rhodnius prolixus*, in conditions of stress produced by starvation and by heat shocks (hypothermic and hyperthermic).

critical electrolyte concentration were used. In this work it was observed that, through different cytological techniques, starvation affects most drastically individuals with 21 days of starvation, in both males and females.

The occurrence: These alterations were visualized using lacto-acetic orcein, which stains totals proteins complexed with DNA (acidophilic reaction) and impregnation by silver ions, responsible for the staining of proteins present in nucleolar corpuscles, a nucleolina (C23) and numatrina (B23) (acidophilic reactions).

periods of: The alterations most commonly observed with starvation involve changes in chromatin distribution; increased nuclear and nucleolar areas; nucleus with irregular outlines and fusion of nucleolar these alterations were evident during starvation.

By the method of critical electrolyte concentration (CEC), which uses solution of toluidine blue (AT) with MacIlvaine buffer and different concentration of magnesium chloride, it was possible to confirm cytochemically the extenuation of the chromatin.

consequence: It was observed that with the continuation of starvation the CEC point decreases, which indicates extenuation of the chromatin. Liberation of PO_4^{2-} groups then occurs and these bind to inorganic cations in the form of magnesium chloride. In this manner, the nucleus become greenish, losing the metachromasy (violet blue).

By the variant of CEC (Mello *et al.*, 1993), it is possible to confirm the fusion of nucleolar corpuscles during starvation, which was observed by silver impregnation.

Insects which were fed after 30 days of starvation showed only a slight recuperation of chromatin condensation. Thus, by the method of CEC there

was observed an increase in the concentration, in moles, of magnesium chloride. As to nucleolar corpuscles, these were unfused.

For the temperature shock studies (hypothermic and hyperthermic shocks) the techniques of silver impregnation and critical electrolyte concentration were used.

In this type of stress the same alterations were observed as in starvation stress (chromatin extenuation, nucleolar fusion and also polyploidy). The occurrence of these alterations varied with the type of shock and the time of exposition.

It was observed that nucleus were altered more drastically with a hyperthermic shock (40°C) than with a hypothermic shock. However with longer periods of exposition (12 hours), to the shocks, both with high and low temperatures, there occurred a greater extenuation of the chromatin, which ended the metachromasy of the protein-DNA complexes with lower concentration of magnesium chloride.

In the two types of stress studied there could be verified the occurrence of nuclear metabolic mechanisms which serve to protect the cell. These mechanisms involve basically an increased in nuclear and nucleolar areas and chromatin extenuation, which reflect a greater synthesis of proteins in consequence of these stresses.

8. Referências

Bibliográficas

ALLAN, J. MITCHELL, T. HARBORNE, N. BOHN, L. CRANE-ROBINSON, C. J. Mol. Biol., v.187, p. 591-601, 1986.

ALMEIDA, J.R. Exploratory study of the isoenzymes of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) hemolymph. Rev.Bras.Genet., v. 4(2) p. 233-234, 1981.

ALMEIDA, J.R. da Polymorphism of an alpha-esterase of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev.Bras.Biol., v 42(4) p.653-654, 1982a.

ALMEIDA, J.R. "Estudo explorativo de proteínas da hemolinfa de triatomíneos (Hemiptera:Reduviidae) vetores da doença de Chagas: *Leishmania* spp.Rev.Brasil.Malariol.D.Trop., v. 34, p.101-107, 1982b.

ALVARES-GARCIA, R.S. Efeitos da radiação gama sobre os fenótipos nucleares de alguns tipos celulares de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). Master's Thesis, UNICAMP, Campinas, 1989.

AMARAL, M.J.L.V. Concentração standard da cromatina em animais submetidos ao jejum. Campinas, 1988.75p. Dissertação de Mestrado, IBUNICAMP.

AMARAL, M.J.L.V. Concentration of heterochromatin and euchromatin in cells of starved animals.Cytobios., v.59, p.159-165,1989.

ANANTHAN, I. C. Heat shock proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. Science, v.232 p. 533-534, 1986.

¹8. Referências Bibliográficas

- ALLAN, J., MITCHELL, T., HARBORNE, N., BOHN, L., CRANE-ROBINSON, C. **J. Mol. Biol.**, v.187: p. 591-601, 1986.
- ALMEIDA, J.R. Exploratory study of the isoenzymes of triatominae (Hemiptera, Reduviidae) hemolymph. **Rev.Bras.Genet.**, v. 4(2): p. 233-234, 1981.
- ALMEIDA, J.R. de. Polymorphism of an alpha-esterase of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Rev.Bras.Biol.**, v.42(4): p.653-654, 1982a.
- ALMEIDA, J.R. Estudo explorativo de proteínas da hemolinfa de triatomíneos (Hemíptera:Reduviidae) vetores da doença de Chagas. I. *Triatoma* ssp. **Rev.Brasil.Malariol.D.Trop.**, v. 34: p.101-107, 1982 b.
- ÁLVARES-GARCIA, R.S. Efeitos da radiação gama sobre os fenótipos nucleares de alguns tipos celulares de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). Master Thesis, UNICAMP, Campinas, 1988.
- AMARAL, M.J.L.V. Concentração eletrolítica da cromatina em animais submetidos ao jejum. Campinas, 1988.75p. Dissertação de Mestrado, IB/UNICAMP.
- AMARAL, M.J.L.V ; MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of heterochromatin and euchromatin in cells of starved animals. **Cytobios**, v.59: p.159-165, 1989.
- ANANTHAN, I.; GOLDBERG, A.L.; VOELLMY, R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. **Science**, v.232: p. 522-524, 1986.



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

ANGELIER, N.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; BOITEILLE, M. Visualization of Ag-NOR proteins on nucleolar transcriptional units in molecular spreads. **Chromosoma**, v. 86: p. 661-672, 1982.

ATKINSON, B.G.; WALDEN, D.B. Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. **Orlando Academic Press**, 1985.

AXEL, R.; CEDAR, H.; FELSENFELD, G. Synthesis of globin ribonucleic acid from duck reticulocyte chromatin *in vitro*. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v.70: p. 2029-2032, 1973.

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Estudo citoenzimático em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug. Campinas, 1982. 175p. Dissertação de Mestrado, IB/ UNICAMP.

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

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Estudo citogenético em túbulos de Malpighi, glândulas salivares e testículos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera) São José do Rio Preto, 1990. 247p. Tese de Doutorado, IBILCE/ UNESP.

BALLAL, W.R.; KANG, Y.Y.; OLSON, M.O.J.; BUSCH, R.K.; BUSCH, H. **J.Biol.Chem.**, v. 250: p. 5921-5925, 1975.

WALLACE, M.O.; CHANG, J.H.; ALMARIC, F.; OLSON, M.O.J. **J.Biol.Chem.**, v. 262: p. 10922-10925, 1987.



- BARRETO, M.P. Transmissores do *Trypanosoma cruzi*: os triatomíneos. In: CANÇADO, R.J.- DOENÇA DE CHAGAS, 1968, Belo Horizonte.p.189-224.
- BERGEOIS, C.A.; HEMON, D.; BOITEILLE, M. Changes in the nucleolus envelop region during interphase in synchronized TG cells. **J.Ultrastruc.Res.**, v. 63: p. 328-340, 1982.
- BERGEOIS, C.A.; HUBERT, J. Spatial relationship between the nucleolus and the nuclear envelope: structural aspectes and functional significance. **Inst.Rev.Cytol.**, v. 111: p.1-52,1988.
- BERGERON, J.A.; SINGER, M. Metachromasy: An experimental and theoretical reevaluation.**J. Biophysic and Biochem. Cytol.**, v. 4 (4): p. 433-457,1958.
- BHORJEE, J.S. Differential phosphorylation of nuclear non-histone high mobility group proteins HMG 14 and HMG 17 during the cell cycle. **Pro.Natl.Acad.Sci., USA**, v. 78: p. 6944-6948, 1981.
- BICUDO, H.E.M.C. Regulação da atividade organizadora nucleolar em *Drosophila*. **Ciên. e Cult.**, v. 34(4): p. 465-469, 1982.
- BOITEILLE, M.; BOUVIER, D.; SEVE, A.P. Heterogeneity and territorial organization of the nuclear matrix and related structures. **Int.Rev.Cytol.**, v. 83: p.135-182, 1983.
- BRADLEY, T.J. Functional design of microvilli in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. **J.Cell Sci.**, v. 60: p.117-135,1983.
- BUGLER, B.; BOURBON, H.; LAPEYRE, B.; WALLACE, M.O.; CHANG, J.H.; ALMARIC, F.; OLSON, M.O.J. **J.Biol.Chem.**, v. 262: p.10922-10925, 1987.

- CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.; LACADENA, J.R.
BUREAU, J.; HUBERT, J.; BOITEILLE, M. Attachment of DNA to nucleolar and nuclear skeletal structures as visualized by Kleinschmidt molecular spreading. **Biol.Cell**, v. 56: p.7-16, 1986.
- CLARK, M.W.; YIP, M.L.R.; CAMPBELL, J.; ABELSON, J. SSD-1 of the yeast
BURKHOLDER, G.D.; WEAVER, M.G. Differential accessibility of DNA in extended and condensed chromatin to pancreatic DNase I. **Exp.Cell Res.**, v. 92: p. 518-522, 1975.
- BURSEL, E. Environmental aspects: Temperature. In: **M.Rockstein. The physiology of insecta**, v. 1: p. 283-321, 1964.
- BUSCH, H.; DASKAL, Y.; GYORKEY, F.; SMETANA, K. Silver staining of nucleolar granules in tumor cells. **Cancer Res.**, v. 39: p. 857-863, 1979.
- BUXTON, P.A. The biology of a blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Trans.Ent.Soc.Lond.**, v. 78: p.227-236, 1930.
- BUYS, C.H.C.M.; OSINGA, J. Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. A combined biochemical and cytochemical study on staining of NORs. **Chromosoma**, v.89:p.387-396, 1984.
- CASTRO, C.E.; ARMSTRONG-MAJOR, J.; RAMIREZ, M.E. Diet-mediated alteration of chromatin structure. **Federation Proceedings**, v.45(9): p.2394-2398, 1986.
- CATALÁ, S. The biting rate of *Triatoma infestans* in Argentina. **Med.Vet.Ent.**, v.5: p. 325-333, 1991.

- CERMEÑO, M.C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J.L.; LACADENA, J.R.
Nucleolar organizer activity in wheat rye and derivatives analyzed by a silver staining procedure. **Chromosoma**, v. 89: p. 370-376, 1984.
- CLARK, M.W.; YIP, M.L.R.; CAMPBELL, J.; ABELSON, J. SSB-1 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a nucleolar-specific, silver binding protein that is associated with the snR10 and snR11 small nuclear RNAs. **J.Cell Biol.**, v.111: p.1741-1751, 1990.
- CLAVAGUERA, A.; QUEROL, E.; COLL, D.; GENESCA, J.; EGOZCUE, J.
Cytochemical studies on the nature of NOR (nucleolus organizer region) silver stainability. **Cell Mol.Biol.**, v. 29: p. 255-259, 1983
- CLAVAGUERA, A.; QUEROL, E.; COLL, D.; EGOZCUE, J. In silver stainability on nucleolar organizer regions exclusively attributable to proteins. **Cell Mol.Biol.**, v. 30: p. 175-177, 1984.
- COMINGS, D.E. The structure and function of chromatin. **Adv.Human Genet**, v.3: p.237-431, 1972.
- CORRÊA, F.A.M. Estudo comparativo do ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* alimentado em diferentes animais (Hemiptera:Reduviidae). **Papéis Dep. Zool.**, São Paulo, v. 15: p. 177-200, 1962.
- COSTA, M.J.; PERONDINI, A.L.P. Resistência do *Triatoma brasiliensis* ao jejum. **Rev.Saúde Publ. São Paulo**, v. 1: p. 207-217, 1973.
- DANTAS, M.M.; MELLO, M.L.S. Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. **Rev.Brasil.Genet.**, v.15 (3): p. 509-519, 1992.



- DASKAL, Y.; SMETANA, K.; BUSCH, H. Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver staining proteins C23 and B23 are in fibrillar component. **Exp.Cell Res.**, v. 127: p. 285-291, 1980.
- DAVINSON, P.F.; BUTLER, J.A.V. The chemical composition of cell thymus nucleoprotein. **Biochem.Biophys.Acta.**, v.21: p. 568-573, 1956.
- DEMEREK, M.; KAUFMMAN, B.P. **Drosophila Guide**. Baltimore Press, Baltimore, Maryland, 1945
- DERENZINI, M.; THIRY, M. GOESSENS, G. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleus. **J.Histochem Cytochem**, v. 38: p. 1237-1256, 1990.
- DE VAIO, E.S.; CRUCCI, B.; CASTAGNENO, A.M.; FRANCA, M.E.; MARTINEZ, M.E. Meiotic differences between three triatominae species (Hemiptera, Reduviidae). **Genética**, v.67: p. 185-191, 1985.
- DIAS, J.C.P. Rural resource development and its potential to induce domestic vectors into new epidemiological situation. **Rev.Argentina de Microbiologia**, v. 20 (supl): p. 81-85, 1988. Diálogo médico. Doença de Chagas. Ano 5 (4)
- DIAS, J.C.P. Observações sobre o comportamento de triatomíneos brasileiros frente ao jejum, em laboratório. **Rev.Brasil.Malariol.e Doenças Trop.**, v.17: p.55-63, 1965.
- FAKAR, S. HERNANDEZ-VERDUN, O. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. **Biol.Cell**, v.55: p. 189-206, 1986

DIMOVA, R.N.; MARKOV, D.V. GAJDARDJIEVA, K.C.; DABEVA, M.D.; HADJIOLOV, A.A. Electron microscopic localization of silver staining NOR-proteins in rat liver nucleoli upon D-galactosamine block of transcription. **Eur.J.Cell Biol.**, v. 28: p. 272-277, 1982.

DOLDER, H.; MELLO, M.L.S. Ultrastructure of the Malpighian tubule cells of *Panstrongylus megistus* Burmeister. **J.Submicr.Cytol.**, v.11(3): p.385-394,1979.

FELSEFELD, G. Chromatin Nature, v. 271, p. 115-122, 1978.

EDINGTON, B.V.; WHELAN, S.A.; HIGHTOWER, L.E. Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. **J.Cell Physiol.**, v.139: p.219-228, 1989.

EGYHAZY, E.; PIGON, A.; OSSOINAK, A.; HOLST, M.; FAYEP, U. Phosphorilation of some chromosomal nonhistone proteins in active genes is blocked by transcription inhibitor 5,6-dichloro-1-D-ribofuranosylbenzemidozole (DRB). **J.Cell Biol.**, v. 98: p. 954-962, 1984.

Mol.Biol., v. 29: p. 161-167, 1983.

ERENPREISA, J.; FREIVALDS, T.; SELIVANOVA, G. Influence of chromatin condensation on the absorption spectra of nuclei stained with toluidine blue. **Acta Morphologica Hungarica**, v.40(1-4): p. 3-10,1992

FAKAN, S.; PUVION, E. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. **Int.Rev.Cytol.**, v.65: p.255-300, 1980.

Can.J.Zool., v. 43: p. 891-904, 1965.

FAKAN, S. HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. **Biol.Cell**, v.56: p. 189-206, 1986.

Ann.Insect Physiol., v.21
p.1081-1084,1975.



- FALCO, S.R.P.; TABOGA, S.R.; LIMA, P.C.A.; MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.
 Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) em modelos experimentais: I-
 Complexos DNA-polípeptídeos básicos. **Rev.Bras.Genet.**, v.17(35): p.197,
 1994.
- FAN, H.; PENMAN, S. Regulation of synthesis and processing of nucleolar
 components in metaphase-arrested cells. **J.Mol.Biol.**, v. 59: p. 27-42, 1971.
- FELSEFELD, G. Chromatin. **Nature**, v. 271: p. 115-122, 1978.
- FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; RISUEÑO, M.C.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.;
 STOCKERT, J.C. Cytochemical and ultrstructural studies on normal and
 segregated nucleoli in meristematic cells. **Protoplasma**, v.74: p. 103-112,
 1972.
- FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; SANCHEZ-PINA, M.A.; RISUEÑO M.C.;
 MEDINA, F.J. Differential staining of the nucleolar organizing region (NOR)
 and nucleolar componentes by a new silver techniqe in plants. **Cell**
Mol.Biol., v. 29: p. 181-187, 1983.
- FRIEND, W.G. The gorging response in *Rhodnius prolixus* Stål. **Canadian**
Journal of Zoology, v. 43: p. 125-132, 1965.
- FRIEND, W.G.; CHAY, C.T.H.; CARTWRIGHT, E. The effect of nutrient intake
 on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera,
 Reduviidae). **Can.J.Zool.**, v. 43: p. 891-904, 1965.
- FRIEND, W.G.; SMITH, J.J.B. Feeding in *Rhodnius prolixus*: increasing
 sensitivity to ATP during prolonged food deprivation. **J.Insect Physiol.**, v.21:
 p.1081-1084, 1975

- GOESSENS, G. Nucleolar structure. *Int.Rev.Cytol.*, v. 87: p. 107-156, 1984.
- FRIEND, W.G.; SMITH, J.J.B. Factores affecting feeding by bloodsucking insects. *A.Rev.Ent.*, v. 22: p.309-331, 1977.
- GAJARDO-TOBAR, R. Capacidad de ayuno de los triatomídeos chilenos. *Bol.Inf.Par.Chilenas*, v. 7: p.56-59,1952.
- GORLA, D.E.; SCHOPFIELD, C.J. Population dynamics of *Triatoma infestans*.
- GAREL, A.; AXEL, R. Selective digestion of transcriptionally active ovalbumin genes from oviduct nuclei. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, v. 73: p. 3966-3970,1976.
- GEITLER, L. Die entstehung der polyploiden somakerne bei heteropteren durch wiederholte chromosomenteilung ohne spindelbildung und kerteilung. *Naturwess*, v. 26: p.722-723,1938.
- GEITLER, L. Die inststehung der polyploiden somakerne der heteropteren, durch chromosomenteilung ohne kernteilung. *Chromosoma*, v. 1: p. 1-22, 1939 a.
- GEITLER, L. Das heterochromatin der geschlechtschromosomen bei heteropteren. *Chromosoma*, v.1: p. 197-229, 1939 b.
- GIOJALAS, L.C. Alteraciones in la eficiencia reproductiva de machos de *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) ocasionadas por exposicion a temperatura infraoptima. Doctoral Thesis. Facultad de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales. Universidad Nacional de Cordoba. Argentina, 158 p., 1991.
- HEITZ, E. Das heterochromatin der moose. *Jahrb.Wissensch Bot.*, v. 69: p.
- GIOJALAS, L.C.; MONTENEGRO, S.C. Efecto del ayuno sobre la eficiencia reproductiva en machos de *Triatoma infestans* (Klug, 1834). *Physis*, v.44: p. 55-62,1986.
- VERDUN, D. Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. *Meth.Achiev Exp.Path.*, v. 12: p. 26-32,1986.



GOESSENS, G. Nucleolar structure, **Int.Rev.Cytol.**, v. 87: p. 107-158, 1984.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 53: p. 37-50, 1975.

GORLA, D.E.; SCHOFIELD, C.J. Population dynamics of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentina, Chaco. **Med.Vet.Ent.**, v. 31: p.1-37,1985.

GOTTESFELD, J.M.; MURPHY, R.F.; BONNER, J. Structure of transcriptionally active chromatin. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v.72: p. 4404-4408, 1975.

HACK, W.H. Estudios sobre la biología del *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hem., Reduviidae). **An.Inst.Med.Reg.**, Tucamán, v.4: p. 125-147, 1955.

HADJIOLOV, A.A. The nucleolus and the ribosome biogenesis. **Wien. New York: Springer-Verlgo**, p. 1-268, 1985.

HARTUNG, M.; WACHTLER, F.; LANVERSIN, A.; FOUET, C.; SCHWARZACHER, H.G.; STAHL, A. Sequential changes in the nucleoli of human spermatogonia with special reference to rDNA location and transcription. **Tissue Cell**, v.22: p. 25-27,1990.

HEITZ, E. Das heterochromatin der moose. I. **Jahrb.Wissensch Bot.**, v. 69: p. 762-818, 1928.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. **Meth.Achiev Exp.Path.**, v. 12: p. 26-62,1986.



- HOCKING, B. Blood-sucking behaviour of terrestrial arthropods.
- HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus today. **Journal of Cell Science**, v. 99: p.465-471,1991.
- HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal gene activity silver stain proteins
- HERNANDEZ-VERDUN, D.; HUBERT, J.; BOURGEOIS, C.A.; BOITEILLE, M. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. **Chromosoma**, v.79: p. 349-362, 1980.
- HERNANDEZ-VERDUN, D.; DERENZINI, M.; BOITEILLE, M. The morphological relationship in electron microscopy between NOR-silver proteins and intranucleolar chromatin. **Chromosoma**, v. 85: p. 461-473, 1982.
- HERNANDEZ-VERDUN, D.; DERENZINI, M. Non-nucleosomal configuration of chromatin in nucleolar organizer regions of metaphase chromosomes *in situ*. **Eur.J.Cell Biol.**, v. 31: p. 360-365, 1983.
- HERNANDEZ-VERDUN, D.; DERENZINI, M.; BOITEILLE, M. Relationship between the Ag-NOR proteins and ribosomal chromatin *in situ* during drug-induced RNA synthesis inhibition. **J.Ultrastruct.Res.**, v. 88: p. 55-65, 1984.
- HERNANDEZ-VERDUN, D.; ROBERT-NICOUD, M.; GERAUD, G.; MASSON, C. Behaviour of nucleolar proteins in nuclei lacking ribosomal genes. **Journal of Cell Science**, v.98: p. 99-105,1991.
- HIGHTOWER, L.E.; GUIDON, Jr.P.T.; WHELAN, S.A.; WHITE, C.N. Stress responses in avian and mammalian cell. In: **Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress** (Atkinson, B.G.; Walden, D.B., eds.). Academic Press, Orlando, p.197-210, 1985.

- HOCKING, B. Blood-sucking behaviour of terrestrial arthropods. **Annu.Rev.Entomol.**, v.16: p. 1-26, 1971.
- HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal gene activity silver stain proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosome. **Chromosoma**, v. 62: p. 361-367, 1977.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I. step method. **Experientia**, v. 36: p.104-105, 1980.
- HOZAK, P.; ZATSEPINA, O.; VASILYEVA, I.; CHENTSON, Y. An electron microscopic study of nucleolus organizing regions at some stages of the cell cycle (G0 period, G2 period, mitosis). **Biol.Cell**, v. 57: p. 197-206, 1986.
- HOZAK, P.; NOVAK, J.T.; SMATANA, K. Three-dimensional reconstructions of nucleolus organizing regions in PHA-stimulated lymphocytes. **Biol.Cell**, v. 66: p.225-233, 1989.
- HUGLE, B.; HAZAN, R.; SCHER, U.; FRANKE, W.W. Localization of ribosomal protein S₁ in the granular component of the interphase nucleolus and its distribution during mitosis. **J.Cell Biol.**, v.100: p. 873-886, 1985.
- INGLE, J.; SINCLAIR, J. Ribosomal RNA genes and plant development. **Nature**, v. 269: p. 376-378, 1972.
- ITZHAKI, R.F. Studies on the accessibility of deoxyribonucleic acid in deoxyribonucleoprotein to cationic molecules. **Biochem.J.**, v.122: p.583-592, 1971.

JORDAN, E.G.; COOPER, P.J.; MARTINI, G.; BENNETT, M.D.; FLAVELL, R.B. The effect of temperature and ageing on root apical meristems during seedling growth of *Triticum aestivum* L.: a specific effect on nucleoli. **Plant.Cell and Environ**, v.8: p. 325-331, 1985.

JUAREZ, E. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. **Rev.Saúde Públ.**, São Paulo, v.4: p. 147-166, 1970.

KLEIN, F.; SZIRMAI, J.A. **Biochem.Biophys.Acta.**, v. 72: p. 48, 1963.

KLEIN, F.; SZIRMAI, J.A. **Biochem.Biophys.Acta.**,v. 186: p. 158 , 1969.

KUBRUSLY, F.S. Ação de cobre e mercúrio sobre a estrutura nuclear e atividade de alguns sistemas enzimáticos em *Triatoma infestans* Klug. Master Thesis, UNICAMP, Campinas, 1984.

LAPEYRE, B.; BOURBON, H.; ALMARIC, F. The major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. **Proc.Natn.Acad.Sci.USA**, v.84: p.1472-1476, 1987.

LAZZARI, C.R. Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 81: p. 273-276, 1991.

LEVY, W.B.; GJERSET, R.A.; MCCARTHY, B.J. Acetylation and phosphorylation of *Drosophila* histones. Distribution of acetate and phosphate groups in fractionated chromatin. **Biochem.Biophys Acta.**, v.475: p. 168-175, 1977a.

LEVY, W.B.; WONG, N.C.W.; DIXON, G.H. Selective association of the trout-specific H₆ protein with chromatin regions susceptible to Dnase I and Dnase II: possible location of HMG-T in the spacer region between core nucleosomes. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v.74 : p.2810-2814, 1977B.

LIMA, P.C.A.; FALCO, J.R.P.; TABOGA, S.R.; MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) em modelos experimentais: II- Complexos DNA-Colágeno. **Rev.Breast.Genet.**, v.17(35): p.198, 1994.

LISCHWE, M.A.; SMETANA, K.L.; OLSON, O.J.; BUSCH, H. **Life Sci.**, v. 25: p.701 p., 1978.

LISCHWE, M.A.; SMETANA, K.L.; OLSON, O.J.; BUSCH, H. Protein C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. **Life Sci.**, v.25:p. 701-708, 1979.

LISCHWE, M.A.; RICHARDS, R.C.; BUSCH, R.K.; BUSCH, H. Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions. **Exp.Cell Res.**, v.136: p. 101-109, 1981.

LISON, L. Variation de la basophilie pendant la maturation du spermatozoide chez le rat et sa signification histochemique. **Acta Histochem**, v.2:p. 47-67, 1955.

LISON, L. Histochemie et cytochemie animales. **Gauthier-Villars**, Paris, 1960.

LISON, L.; MUTSAARS, W. Metachromasy of nucleic acids.**Quarterly Journal of Microscopical Science**, v.91 (3):p. 309-313,1950.

- LWOFF, M.; NICOLLE, P. Nécessité de l'hyméne pour la nutrition de *Triatoma infestans* Klug (Reduvié: Hémophage). **Cr.Soc.Biol.**, Paris, v.139: p. 879-981,1945.
- MADDRELL, S.H.P. A diuretic hormone in *Rhodnius prolixus* Stal. **Nature**, Lond. v.194: p. 605-606, 1962.
- MADDRELL, S.H.P. Excretion in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus* Stål. I.The control of diuresis. **J.Exp.Biol.**, v.40: p. 247-256,1963.
- MADDRELL, S.H.P. Excretion in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus* Stål. II.The normal course of diuresis and the effect of temperature. **J.Exp.Biol.**, v. 41: p. 163-176,1964.
- MADRELL, S.H.P.; LANE, N.J.; HARRINSON, J.B.; GARDINER, B.O.C. DNA replication in binucleate cells of the Malpighian tubules of hemipteran insects.**Chromosoma**, v. 91:p. 201-209,1985.
- MADDRELL, S.H.P.; HERMAN, W.S.; FARNDAL, R.W.; RIEGEL, J.A. Synergism of hormones controlling epithelial fluid transport in an insect.**J.Exp.Biol.**, v. 174: p. 65-80,1993.
- MADDRELL, S.H.P.; O'DONNELL, M.J.; CAFFREY, R. The regulation of haemolymph potassium activity during initiation and maintenance of diuresis in fed *Rhodnius prolixus*. **J.Exp.Biol.**, v. 177: p. 273-285,1993.
- Mc ELWAIN, D.L.S. A theoretical investigation of fluid transport in the Malpighian tubules of an insect, *Rhodnius prolixus* Stål.**Proc.R.Soc.Lond.**, v.222: p.63-372,1984.



- MEDINA, F.J.; RISUEÑO, M.C.; SÁNCHEZ-PINA, M.A.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E. A study on nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. **Chromosoma**, v.88: p.149-155, 1983.
- MELLO, M.L.S. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduviidae:Hemiptera). **Cytologia**, p.42-49, 1971.
- MELLO, M.L.S. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. **Rev.Bras. de Pesquisas Méd. e Biol.**, v.8(2): p.101-107, 1975.
- MELLO, M.L.S. Heterocromatina constitutiva do *Triatoma infestans* Klug. **Ciênc.Cult.**, (São Paulo), v.28: p.257-258, 1976.
- MELLO, M.L.S. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero e eucromatinas. **Private docence dissertation**, Campinas, UNICAMP, 1976a.
- MELLO, M.L.S.. Valores Feulgen-DNA e algumas propriedades matemáticas de imagem nuclear digitalizada de células de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). **Monograph**, Campinas, UNICAMP, 1976 b.
- MELLO, M.L.S. Dados citoquímicos sobre as histonas de heterocromatinas e eucromatinas do *Triatoma infestans* Klug. **Rev.Bras.de Pesquisas Med. e Biol.**, v.10(5): p. 305-309, 1977.
- MELLO, M.L.S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in
- MELLO, M.L.S. Patterns of lability towards acids hidrolisis in heterochromatins and euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. **Cellular & Molecular Biology**, v.24: p.1-16, 1977.



- MELLO, M.L.S. Mechanism of polyploidization in the Malpighian tubes of blood-sucking reduviid hemipterans. **Rev.Brasil.Genet.**, v.1(2): p. 97-102,1978.
- MELLO, M.L.S. Hetercromatina. **Ciência e Cultura**, v.30(3): p. 290-303, 1978 a.
- MELLO, M.L.S. Feulgen-DNA absorption spectron of euchromatin and constitutive heterochromatin. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 26(12): p.1082-1086,1978.
- MELLO, M.L.S. Patterns of lability towards acid hydrolisis in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. **Cell Mol.Biol.**, v. 24: p. 1-16, 1979.
- MELLO, M.L.S. LINH, M.J.P. Somatic polyploidy in *Rhodnius prolixus* Stål. **The Nucleus**, v. 21 (1) p. 33-42, 1978.
- MELLO, M.L.S. Toluidine blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. **Histochemistry**, v.69: p. 181-187,1980.
- MELLO, M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromation. **Histochem J.**, v.15: p.739-751,1983.
- MELLO, M.L.S. Different affinity for clupein in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Rev.Brasil.Genet.**, v. VIII(4): p. 755-758,1985.
- MELLO, M.L.S. Nuclear fusion and heterochromatin unravelling in response to starvation in *Triatoma infestans*. **(in press)**, 1987.
- MELLO, M.L.S. VIDAL, B.C. Fusão nuclear e padrões cromatínicos em tubos
- MELLO, M.L.S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. **Rev.Brasil.Genet.**, v.12 (3): p. 485-498,1989.



- MELLO, M.L.S. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. **Acta Histochem.Cytochem.**, v.28(2): p.149-154,1995.
- MELLO, M.L.S.; DOLDER, H. Fine structure of the Malpighian tubes in the blood-sucking insect, *Triatoma infestans* Klug. **Protoplasma**, v.93: p.275-288,1977.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper *Staurorhectus longicornis* Giglio-Toss. **Adv.Invertbr.Reprod.**, v.1: p. 75-83, 1977.
- MELLO, M.L.S.; LIMA, M.J.P. Somatic poliploidy in *Rhodnius prolixus* Stahl. **Nucleus (in press)**, 1977.
- MELLO, M.L.S.; LIMA, M.J.P. Somatic polyploidy in *Rhodnius prolixus* Stål. **The Nucleus**, v. 21 (1): p. 39-42,1978.
- MELLO, M.L.S.; RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in starving blood-sucking hemipterans. **Rev.Micr.Elet.**, v. 5: p. 298-299,1978.
- MELLO, M.L.S.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Response to banding and hoeschst 33258 treatment in chromocentros of Malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, v.52: p. 175-184, 1987.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Fusão nuclear e padrões cromatínicos em tubos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug. In: Encontro de Geneticistas Paulistas, 2 São José do Rio Preto, Resumos. p.26-27, 1979.

- MELLO, M.L.S.; DOLDER, H. Aspectos ultra-estruturais de túbulos de Malpighi de ninfas jovens de *Triatoma infestans* Klug. **Cienc.Cult.**, v.32(7): p.903-907, 1980.
- MELLO, M.L.S.; RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a blood-sucking Hemipteran. **Cytologia**, v.45: p. 203-209, 1980.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular. Editora Edgard Blücher- FUNCAMP, São Paulo, 1980.
- MELLO, M.L.S.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Response to banding and Hoeschst 33258 treatment in chromocentres of the Malpighian tubules cells of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, v. 52: p. 175-184, 1987.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Critical eletrolyte concentration of hetro- and euchromatin in *Triatoma infestans*. **(in press)**, 1987.
- MELLO, M.L.S.; DOLDER, H.; DIAS, C.A. Nuclear ultrastructure of Malpighian tubule cells in *Triatoma infestans* under conditions of full nourishment and starvation. **Rev.Bras.Genet. (in press)**, 1989.
- MELLO, M.L.S.; RUSSO, J. Nuclear changes induced in NIH/3T3 cells by tranfection and tumorigenesis. **Cytobios**, v. 60: p. 135-149, 1989.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Critical eletrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, v. 59: p. 87-93, 1989.

- MELLO, M.L.S.; DOLDER, H.; DIAS, C.A. Nuclear ultrastructure of Malpighian tubule cells in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) under conditions of full nourishment and starvation. **Rev.Bras.Genet.**, v.13(1): p.5-17, 1990.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; DANTAS, M.M.; MONTEIRO, A.L.P. Discrimination of the nucleolus by a critical eletrolyte concentration method. **Acta Histochem.Cytochem.**, v. 26: p. 1-3, 1993.
- MELLO, M.L.S.; FALCO, J.R.P. Critical eletrolyte concentration of DNA-protein complexes in spermatozoal and somatic cell nuclei of the honey bee. **Insect Biochem.Mol.Biol.**, v. 26: p. 793-795, 1996.
- MELLO, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Brazilian journal of Genetics**, v.20 (2): p. 257-264, 1997.
- MILLER, O.J.; MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAHAHI, R.; CROCE, C.M. Expression of human and supression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. **Proc.Nat.Acad.Sci.**, v. 73: p. 4531-4535, 1976.
- MIRRE, C.; STAHL, A. Ultrastructural organization sites of transcription and distribution of fibrillar centres in the nucleolus of the mouse oocytes. **J.Cell Sci.**, v.48: p.105-126, 1981.
- MIURA, A.; OHBA, Y. Structure of nucleohistone. III.Interaction with toluidine blue. **Biochem.Biophys Acta**, v.145: p. 436-445, 1967.
- MONNERON, A. BERHARD, W. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. **J.Ultrastruct.Res.**, v.27: p. 266-278, 1969.

- MONTEIRO, A.L.P. Concentração crítica de eletrólitos em cromossomos politênicos de *Thrichosia pubescens* (Diptera, Sciaridae). **Masther Thesis**, UNICAMP, 1993.
- MONTENEGRO, S.C. Relaciones entre consumo de sangre y ovogenesis en *Triatoma infestans* Klug 1834 (hemiptera, Reduviidae). **Chagas**, v. 5: p.3-10, 1989.
- MORENO DIAZ de la ESPINA, S.; RISUEÑO, M.C.; FERNANDEZ-GOMEZ, M.E. Ultrastructural study of the nucleolar cycle in meristematic cells of *Allium cepa*. **J.Microsc.Biol.Cell**, v.25: p.265-278, 1976.
- MORENO, F.J.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; MASSON, C.; BOITEILLE, M. Silver staining of the nucleolar organizer regions (NORs) on lowicryl and cryoultrathin sections. **J.Histochem.Cytochem.**, v.33: p.389-399, 1985.
- NANYA, S.; BICUDO, H.E.M.C. Variation of nucleolar area in fat tissue of *Drosophila mulleri* during development. **Cytobios**, v.81: p.73-86, 1995.
- NEIVA, A. Informações sobre a biologia do *Tratoma infestans*. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v.5: p. 24-31, 1913.
- NUR, U. Endomitosis in the mealy bug, *Planococcus citri* (Homoptera, Coccoidea). **Chromosoma**, v. 24: p. 202-209, 1968.
- OCHS, R.L.; BUSCH, H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110 KD/pi 5.1) is the nucleolar silver staining protein. **Exp.Cell Res.**, v.152: p. 260-265, 1984.

- OLSON, O.J.; RIVERS, Z.M.; THOMPSON, B.A.; KAO, W.Y.; CASE, S.T. Interactions of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, v.22: p. 3345-3351, 1983.
- OUDET, P.; GROSS-BELLARD, M., CHAMBON, P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. **Cell**, v.4: p.281-300,1975.
- PALKOVITS, M.; FISCHER, J. Kariometric investigations. **Budapeste: Akad Kiadó**, 1968.
- PEARSON, M.J. Polyteny and the functional significance of the polytene cell cycle. **J.Cell Sci.**, v. 15: p. 457-479, 1974.
- PEBUSQUE, M.J.; SEITE, R. Electron microscopic studies of silver stained proteins in nucleoli of rat sympathetic neurons during light and dark periods. **J.Cell Sci.**, v. 51: p.85-94, 1981.
- PELLEGRINO, J. Observações sobre a resistência de *Triatoma infestans* ao jejum. **Rev.Brasil.Biol.**, v. 12: p. 317-320,1952.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* em condições de laboratório. **Rev.Brasil.Malariol.D.Tropical**, v. 5: p.35-47,1953.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. A eficácia do expurgo domiciliário com hexa-clorociclohexana no controle do vetor da doença de Chagas (a importância de algumas características biológicas dos triatomíneos no planejamento do ciclo de aplicação do inseticida). **Rev.Bras.Malariol.D.Trop.**, v.VI: p.63-100,1954.

- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Estudos sobre a biologia do *Triatoma infestans*, o principal vetor da doença de Chagas no Brasil (Importância de algumas de suas características biológicas no planejamento de esquemas de combate a esse vetor). **Rev.Bras.Malar.**, v.21: p. 117-159,1969.
- PERTZELKA, G.P.; SCHROEDER, M. Activation of human. I. lymphocytes. A kinetic and stereological study. **Cell Tissue Res.**, v. 2: p. 1-27, 1979.
- PIMENTEL, R.S.M.; MELLO, M.L.S.; CORDEIRO, J.A. Nuclear size in the salivary of *Bradysia spatitergum* (Diptera, Sciaridae). **Zool.Jb.Anat.**, v.116: p.137-143, 1989.
- PRASAD, R.S. Nutrition and reproduction in hematophagous arthropods. **Proc.Indian Acad Sci.**, (Animal Sci) v.96: p. 253-273,1987.
- PUVION, E.; VIRON, A; BERNHARD, W. Unusual accumulation of ribonucleoprotein constituents in the nucleus of cultured rat liver cells after hypothermal shock. **Biol.Cell**, v.29: p. 81-89, 1977.
- QUINTARELLI, G.; SCOTT, J.E.; DILLAVO, M.C. Chemical and histochemical properties of alcian blue. III.Chemical blocking and unblocking. **Histochemic**, v.4: p. 99-112, 1964.
- RAMAN, R.; SPERLING, K. Patterns of silver stain on NORs of prematurely condensed chromosomes following RNA inhibition. **Exp.Cell Res.**, v.135: p.373-378, 1981.
- RANDI, M.A.F.; MELLO, M.L.S. Variação na concentração eletrolítica nuclear de *Triatoma infestans* induzida por cobre. (**in press**), 1987.



RAO, S.V.V.; MANORACK, M.D.; OLSON, M.O.J. Localization of phosphorylated highly acidic regions in the NH₂-terminal half of nucleolar protein C23. **J.Biol.Chem.**, v. 257: p. 15035-15041, 1982.

RECCO-PIMENTEL, S.M.; MELLO, M.L.S.; CORDEIRO, J.A. Nuclear sizes in the salivary of *Bradysia spartitergum* (Diptera, Sciaridae). **Zool.Jb.Anat.**, v.116: p. 137-143, 1989.

RIS, H.; KORENBERG, R.D. Chromosome structure and levels of chromosme organization. In: **The structure and replication of genetic material**, ed. D.M.Prescott and L.Goldsten, New York: Academic Press, p.268-361, 1979.

RISUEÑO, M.C.; MORENO DIAZ de la SPINA, S.; FERNANDEZ-GOMEZ, M.E.; GIMENEZ-MARTIN, G. Ultrastructural study of the nucleolar material during plant mitosis in the presence of inhibitors of RNA synthesis. **J.Microsc.Biol.Cell**, v.26:p. 5-18, 1976.

RISUEÑO, M.C.; MEDINA, F.J.; MORENO DIAZ de la SPINA, S. Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiograph. **J.Cell Sci.**, v.58: p. 313-329. 1982.

RODRIGUES, V.L.C.C.; MELLO, M.L.S.; FERRAZ-FILHO, A.N.; DANTAS, M.M. Sobrevivência e ocorrência de muda em *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera,Reduviidae) após choque de temperatura. **Rev.Saúde Públ.S.Paulo**, v.25 (6): p. 461-467,1991.

SAHASRABUDDHE, C.G.; ADLAKHA, R.C. RAO, P.N. Phosphorilation of non-histone proteins associated with mitosis in HeLa cells. **Exp.Cell Res.**, v.153: p.439-450, 1983.



SÁNCHEZ-PINA, M.A.; MEDINA, F.J.; FERNÁNDEZ-GOMES, M.E.; RISUEÑO, M.C. "Ag-NOR" proteins are presents when transcription is impaired. **Biol.Cell**, v. 50: p. 199-202, 1984.

SATMARY, W.M.; BRADLEY, T.J. Dissociation of insect Malpighian tubules into single, viable cells. **J.Cell Sci.**, v. 72: p.101-109,1984.

SCHEER, U.; BINAVENTE, R. Functional and dynamic aspect of the mammalian nucleolus. **BIO.Essays**, v.12: p.14-21, 1990.

SCHLESINGER, M.J. Stress response in avian cells. In: **Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress** (Atkinson, B.; Walden, D.B., EDS) Academic Press, Orlando, p.183-195, 1985.

SCHOFIELD, C.J. The role of blood intake in density regulation of population of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera:Reduviidae). **Bull.Ent.Res.**, v.72: p.617-629,1982.

SCHREIBER, G.; BAGLIOLO, A.R.; PINHO, A.C. Cytogenetics of Triatominae: caryotipe, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autossomes. **Rev.Bras.Biol.**, v.32: p. 255-263, 1972.

SCHWARZACHER, H.G.; WACHTLER, F. The nucleolus. **Anat.Embryol.**, v.188: p.515-536,1993.

SCOTT, J.E. Aliphatic ammonium salts in the assay of acid polisaccharides from tissues. **Methods of biochemical analysis** (ed.D. Glick). New York: **Interscience Publ.**, v. 8: p. 145-197, 1960.



SCOTT, J.E. Affinity, competition and specific interactions in the biochemistry and histochemistry of polyelectrolytes. **Biochemical Society Transactions**, v. 1: p. 787-806, 1973.

SILVA, I.G. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. I. *Triatoma rubrovaria* (Blachard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). **Revta. Goiana Med.**, v. 3: p. 1-37, 1985.

SILVA, I.G. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. VII. *Rhodnius prolixus* Stahl, 1959 (Hemiptera, Reduviidae). **Revta. Pat. Trop.**, v. 17(2): p. 145-155, 1988 a.

SILVA, I.G.; SILVA, H.H.G. Influência da temperatura na biologia dos triatomíneos. V. *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae). **Rev. Pat. Trop.**, v. 17(2): p. 133-144, 1988 b.

SILVA, I.G.; SILVA, H.H.G. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. VI. *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). **Anais Soc. Ent. Bras.**, v. 17(2): p. 443-454, 1988 c.

SILVA, I.G.; SILVA, H.H.G. Influência da temperatura na biologia dos triatomíneos. II. *Rhodnius* (Lent, 1954) (Hemiptera, Reduviidae). **Revta. Goiana Med.**, v. 34: p. 29-37, 1988 d.

SILVA, I.G.; SILVA, H.H.G. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. IX. *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 84 (3): p. 377-382, 1989.



- SILVER, L.M.; ELGIN, S.C.R. Distribution patterns of three subfractions of *Drosophila* non-histone chromosomal proteins: possible correlations with gene activity. **Cell**, v.11: p. 971-1983, 1977.
- SIMÕES, L.C.G. Síntese de DNA durante o desenvolvimento larval de *Rhynchosciara* sp. **Ph.D. dissertation**. Instituto Central de Biologia, Belo Horizonte, UFMG, 78 p. 1967.
- SIMONI, I.C.; MELLO, M.L.S. Investigation of hycanthone binding to DNA in chromatin with different supra-organization, composition, and function. **Acta Histochem.**, v. 79: p. 97-105, 1986.
- SOMMERVILLE, J. Nucleolar structure and ribosome biogenesis. **Trends biochem. Sci.**, v. 11: p. 438-442, 1986.
- SOUTHGATE, R.; MIRAULT, M.E.; AYME, A.; TISSIERES, A. Organization sequences, and induction of heat shock genes. In: **Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress** (Atkinson, B.; Walden, D.B.. eds). Academic Press, Orlando, p. 183-195, 1985.
- SPIKER, S. Chromatin structure and gene regulation on higher plants. **Adv.Genet.**, v.22: p.145-208, 1984.
- STEINER, E.K.; EISSENBERG, J.C.; ELGIN, S.C.R. A cytological approach to the ordering of events in gene activation using the Sgs-4 locus of *Drosophila melanogaster*. **J.Cell Biol.**, v. 99: p. 233-238, 1984.
- STORKET, J.C.; COLMAN, O.D.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M.E.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Nucleolar structure in root-tipe cells of *Allium cepa*. **Experientia**, v.25: p.1306-1307, 1969.



- VERMA, R.S. Halochromatin molecular and structural aspects. Cambridge
- SYLVÉN, B. Metachromatic dye substrate interactions. **Quart.J.Microsc.Sci.**, v.95: p. 327-358,1954.
- VIDAL, B.C. Doppelbrechungsdispersion und lineardichroismus von Eu- and
- TABOGA, S.R. Concentração crítica de eletrólitos no estudo de elementos celulares e da matriz extracelular. **H B Científica**, v. III(3): p.266-270, 1996.
- TABOGA, S.R. Estudo citoquímico e morfométrico em núcleos e distribuição das fibras no estroma em lesões da próstata humana. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, p.102, 1997.
- VIDAL, B.C. The effect of clupein on anisotropy and basophilia of polystyrene
- TABOGA, S.R.; MELLO, M.L.S.; FALCO, J.R.P.; VIDAL, B.C. Cytochemistry and polarization microscopy of amphibian sperm cell nuclei presumed to differ in basic protein composition. **Acta.Histochem.Cytochem.**, v.29 (2): p.129-134, 1996.
- VIDAL, B.C. Anisotropia de complexos DNP durante a espermatogênese de rato. *Ciênc.Cult.*, São Paulo, v. 30: p.434-435, 1978.
- TAVARES, M.G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Aspectos biológicos e médico-sanitários dos triatomíneos. **HB Científica**, v.3 (2): p. 137-144,1996.
- VIDAL, B.C. The effect of clupein on anisotropy and basophilia of polystyrene
- THIRY, M.; SCHEER, U.; GOESSENS, G. Localization of nuclear chromatin by immunocytochemistry and *in situ* hibridization at the electron microscopic level. **Electron Microsc.Rev.**, v.4: p. 85-110, 1991.
- VIDAL, B.C. Anisotropia de complexos DNP durante a espermatogênese de rato. *Ciênc.Cult.*, São Paulo, v. 30: p.434-435, 1978.
- TOEPFER, K. Due thiazinfarbstoffe. **Prog.Histochem Cytochem**, v.1: p.277-354, 1970.
- VIDAL, B.C. Anisotropia de complexos DNP durante a espermatogênese de rato. *Ciênc.Cult.*, São Paulo, v. 30: p.434-435, 1978.
- TSANEV, R. Transcriptionally active chromatin. **Mol.Biol.Rep.**, v. 9:p. 9-17, 1983.



- VERMA, R.S. Heterochromatin molecular and structural aspects. **Cambridge University Press**, 301p, 1988.
- VIDAL, B.C. Doppelbrechungsdispersion und lineardichroismus von Eu- and Heterochromatin nach färbung mit toluidinblau nachweis eines cotton-effektes. **Butr.Pathol.**, v.145: p. 269-285, 1972.
- VIDAL, B.C. Cromossomos politênicos: diferenças estruturais reveladas pela basofilia metacromática. **Ciênc. Cult.**, São Paulo, v. 27:p. 54-56, 1975.
- VIDAL, B.C. The effect of clupein on anisotropy and basophilia of polytene chromossomes. **Histochemistry**, v. 60: p. 309-316, 1979.
- VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S.; ZANARDI, V.A. Alteração nos padrões de basofilia e anisotropia de complexos DNP durante a espermatogênese de rato. **Ciênc.Cult.**, São Paulo, v. 30: p.434-435, 1978.
- VIDAL, B.C.; PIMENTEL, E.R. DNA strand separation in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **VI th Intern.Histochem. Cytochem., Congr.**, London, Abstracts, p.396, 1980.
- VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. **Biologia Celular** São Paulo. Livraria Atheneu, 317p, 1987.
- VIDAL, B.C.; RUSSO, J. Nuclear phenotypical changes of human breast epithelial cells treated with carcinogens. **Micr.Electr.Biot.Cell**, v.11: p. 146-157, 1987.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. Critical eletrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes *in vitro*. **Acta Histochem.Cytochem.**, v. 22 (4): p. 471-478,1989.

VIDAL, B.C.; BARBISAN, L.F.; MARIA, S.S.; RUSSO, J.; MELLO, M.L.S. Apoptosis: identification by a critical eletrolyte concentration method. **Apoptosis**, v. 1: p.218-221, 1996.

WARRANT, R.W.; KIM, S.H. Alpha-helix double interaction showm in the structure of a protamine transfer RNA complex and a nucleoprotamine model. **Nature**, v. 271: p.130-135, 1978.

WATCHTLER, F.; HARTUNG, M.; SCHWARZACHER, H.G. Ribossomal DNA is localited in the dense fibrillar component of human nucleoli. **Exp.Cell.Res.**, v.184: p. 61-71,1989.

WEINTRAUBE, H.; GROUDINE, M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. **Science**, v.193: p. 848-856, 1976.

WELCH, W.J. How cells respond to stress.**Scientific American**, p. 34-41,1993.

WIDMER, R.; FUHRER, S.; PARISH, R.W. Biochemical evidence for a distinctive chromatin structure in nucleoli of *Dictyostelium*. **FEBS Lett.**, v.106: 363-369, 1979.

WIGGLESWORTH, V.B. The physiology of excretion in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera,Reduviidae). I. Composition of the urine.**J.Exp.Biol.**, v.8: p.411-451,1931 a.



WIGGLESWORTH, V.B. The physiology of excretion in a blood sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). III. The mechanism of uric acid excretion. **J.Exp.Biol.**, v.8: p.443-451, 1931 b.

WIGGLESWORTH, V.B.; SALPETER, M.M. Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera). **J.Insect Physiol.**, v. 8:p. 299-307, 1962.

WIGGLESWORTH, V.B. The principles of insect physiology. **Nethwen, London**, p. 496-531, 1965.

WIGGLESWORTH, V.B. Cytological changes in the fat body of *Rhodnius* during starvation, feeding and oxygen want. **J.Cell Sci.**, v. 2:p. 243-256, 1967.

WIGGLESWORTH, V.B. Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of *Rhodnius* (Hemiptera). **J.Cell.Sci.**, v. 2: p. 603-616, 1967.

WIGGLESWORTH, V.B. The principles of insect physiology. **Halsted, New York**, p.741, 1972.

WIGGLESWORTH, V.B. Fine structural changes in the fat body cells of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) during extreme starvation and recovery. **J.Cell Sci.**, v.53: p.337-346, 1982.

WIGGLESWORTH, V.B. Histochemical studies of uric acid in some insects. 3. Excretion of uric acid by the Malpighian tubules in *Calliphora vicina* and *Rhodnius prolixus*. **Tissue & Cell**, v.19 (2):p. 275-286, 1987.



WOOD, S. Influência de la temperatura ambiental como regulados de la zoonosis por *Trypanosoma cruzi* en vectores y hospedadores. **Prin.Med.Arg.**, v.63: p.462-469, 1976.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**, 2^a. edição, Prentice Hall, New JERSEY, 1984

ZELEDON, R.; GUARDIA, V.M.; ZÚÑIGA, A.; SWARTZWELDER, C. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). I. Life cycle amount of blood ingested, resistance to starvation, and size adults. **J.Med.Ent.**, v.7(3): p.313-319, 1970.

¹Referências Bibliográficas de acordo com a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), NBR. 6023: 19 p.1984



