




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELENICE MONTE ALVARENGA

**“TERRITÓRIOS HETEROCROMÁTICOS EM
Triatoma infestans Klug E *Panstrongylus megistus* (Burmeister):
COMPOSIÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES
EPIGENÉTICOS E RESPOSTA A INIBIDORES DE
DEACETILASES DE HISTONAS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Elenice Monte Alvarenga

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

AL86t Alvarenga, Elenice Monte, 1988-
Territórios heterocromáticos em *Triatoma infestans*
Klug e *Panstrongylus megistus* (Burmeister):
composição, identificação de marcadores epigenéticos e
resposta a inibidores de deacetilases de histonas /
Elenice Monte Alvarenga. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

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

1. *Triatoma*. 2. *Panstrongylus*. 3. Sequência rica
em AT. 4. Sequência rica em GC. 5. Heterocromatina.
6. Epigênese genética. I. Mello, Maria Luiza Silveira,
1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Heterochromatic territories in *Triatoma infestans* Klug and *Panstrongylus megistus* (Burmeister): composition, identification of epigenetic markers and response to histone deacetylase inhibitors

Palavras-chave em Inglês:

Triatoma

Panstrongylus

AT rich sequence

GC rich sequence

Heterochromatin

Genetic epigenesis

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Luiza Silveira Mello [Orientador]

Maria Tercilia Vilela de Azeredo Oliveira

Flávia Saldanha Kubrusly

Data da defesa: 13-12-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 13 de dezembro de 2011.

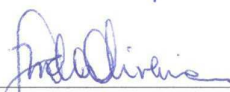
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira



Assinatura

Profa. Dra. Flávia Saldanha Kubrusly



Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Assinatura

Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Raimundo Antonio e Zilmar, e ao meu irmão Leônidas, o meu maior agradecimento, pela paciência, compreensão, apoio e amor incondicionais.

Ao Jardel, também pela enorme paciência, confiança, pelos constantes incentivos e, principalmente, pelo empréstimo do seu bom-senso nos momentos de desequilíbrio.

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, que creditou a mim essa tarefa e tornou seu desempenho possível por meio de seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pela co-orientação informal e sua contribuição ao meu crescimento enquanto ser humano.

À Vera Rodrigues pelo auxílio na realização de experimentos e cessão dos insetos e do espaço na SUCEN - Mogi Guaçu.

Ao Prof. Dr. Mateus Mondin e à sua aluna Larissa Mara de Andrade pelos esclarecimentos, contribuição à qualidade dos trabalhos e cessão do espaço na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz para o desenvolvimento de experimentos.

À Universidade Estadual de Campinas que, provendo-me da melhor estrutura física e acadêmica, em muito contribuiu para a realização desse trabalho. Aqui também se inclui o Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural e o Serviço de Apoio ao Estudante, que, com seus auxílios, me permitiu esta escalada desde o início da graduação até hoje.

Ao CNPq, pelas bolsas a mim concedidas desde a iniciação científica, à FAPESP e à CAPES, pela estrutura física e financeira disponível.

Às Profas. Dras. membros desta banca, pela sua contribuição à melhoria do trabalho.

Aos colegas de Moradia Estudantil: Joel, Éder, Talita, Érika, Thaís, Fabíola e Danielle, que, por anos, aturaram pacientemente minhas esquisitices.

A todos os colegas de laboratório: Murilo, James, Alberto, Flávia Paoli, Flávia Ghiraldini, Felipe, Meire, Marina, Lara, Isabela, Juliana e Luana, e ao técnico Eli Heber pelos agradáveis momentos de convivência.

E a todos que, mesmo indiretamente, tenham estimulado o alcance deste objetivo pessoal e profissional.

SUMÁRIO

Abreviaturas	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Introdução	1
I. Arquitetura cromatínica e composição genômica.....	1
II. Estruturação cromatínica e fatores epigenéticos	5
III. <i>Triatoma infestans</i> e <i>Panstrongylus megistus</i>	11
Objetivos	17
Capítulo I	
Spatial distribution of AT- and GC- rich DNA within interphase cell nuclei of <i>Triatoma infestans</i> Klug	19
Capítulo II	
Contribution of AT-, GC-, and methylated cytidine-rich DNA to chromatin composition in Malpighian tubule cell nuclei of <i>Panstrongylus megistus</i> (Hemiptera, Reduviidae)	65
Capítulo III	
Hipermetilação e hipoacetilação de histonas contribuem para a manutenção da heterocromatina em <i>Triatoma infestans</i> Klug e <i>Panstrongylus</i> <i>megistus</i> (Burmeister)	91
Discussão	165
Conclusões	169
Referências	171

ABREVIATURAS

TC. território cromossômico

FISH. hibridação *in situ* fluorescente

CI. compartimento intercromatina

HP1- α . *heterochromatin protein 1*

HDACs. enzimas deacetilases de histonas

TSA. tricostatina A

VPA. ácido valproico

NaBt. butirato de sódio

DAPI. 4-6-diamidino-2'-fenilindol

CMA₃. cromomicina A3

AMD. actinomicina D

DA. distamicina

5-AZA. 5-aza-2'-deoxicitidina

Sc%. área de cromatina condensada em relação à área nuclear

AAR. contraste entre cromatina condensada e não condensada

AgNOR. regiões organizadoras nucleolares argirofílicas

DMSO. dimetilsulfóxido

ITS-2. segundo espaçador interno transcrito

H_D. núcleo com descondensação da heterocromatina

G. núcleo gigante

A. núcleo apoptótico

A_S. núcleo suspeito de apoptose

NE. núcleo necrótico

N. núcleo normal

N_{ID}. núcleo com identificação prejudicada

H3K9Ac. histona H3 acetilada na lisina 9

H4K8Ac. histona H4 acetilada na lisina 8

H4K16Ac. histona H4 acetilada na lisina 16

H3K9Me. histona H3 metilada na lisina 9

H3K9Me₂. histona H3 dimetilada na lisina 9

H3K9Me₃. histona H3 trimetilada na lisina 9

RESUMO

A cromatina pode existir em núcleos interfásicos em dois estados distintos: como eucromatina e como heterocromatina, podendo ser esta constitutiva ou facultativa. Em células somáticas do final da fase ninfal dos hemípteros reduvídeos *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* há núcleos grandes, poliploides, nos quais a heterocromatina apresenta-se como corpos conspícuos (cromocentros), daí tais células apresentarem-se como um bom modelo para investigação de características morfológicas e funcionais da cromatina. Em estudos sobre a constituição cromatínica, a composição em bases do DNA é algo muito explorado, dado o conteúdo informativo dos achados. Já quando se objetiva a investigação da funcionalidade da cromatina, mais recentemente, tem-se feito uso da abordagem epigenética.

Neste trabalho buscou-se investigar a composição em bases do DNA destas células, associando-a aos domínios cromatínicos aí existentes e também à presença das NORs. Por meio de colorações fluorescentes com Cromomicina A3 (CMA3)/Distamicina e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)/Actinomicina D concluiu-se que o DNA dos cromocentros de *T. infestans* e *P. megistus* são ricos em sequências AT e pobres em GC. Isto foi ainda confirmado por imunodeteção de 5-metilcitosina, que ocorreu somente na eucromatina, e tratamento de ninfas de *T. infestans* com 5-aza-2'-deoxicitidina (agente demetilante), seguido da análise dos fenótipos nucleares e análise de imagem, em que se observou expansão somente da área eucromática. Com o método de AgNOR evidenciou-se que a região rica em bases GC ao redor do cromocentro coincide com um acúmulo de proteínas argirofílicas, o que sugere associação com NORs. A presença de modificações epigenéticas nas caudas das histonas na cromatina destes insetos foi investigada por meio do uso de anticorpos contra marcadores epigenéticos específicos, permitindo identificar a participação diferencial dos mesmos na composição e na estrutura dos territórios heterocromáticos. Assim, observou-se hipoacetilação e hipermetilação de histonas na região do corpo heterocromático, o que indicaria

uma possível ação da modificação de histonas na manutenção da estrutura heterocromática nas células somáticas de ambas as espécies de reduviídeos. Por meio da avaliação da ação de drogas inibidoras de deacetilases de histonas sobre a cromatina dos insetos percebeu-se que, quando ninfas de *T. infestans* e *P. megistus* foram tratadas com as drogas, houve aumento na frequência de necroses e, no caso específico do tratamento com tricostatina A (TSA) e butirato de sódio (NaBt), ocorreu descompactação da heterocromatina. Sugere-se que o tratamento com TSA e NaBt afete o processo de deacetilação de histonas, o qual seria, então, um fator importante na estruturação dos cromocentros. A observação da ocorrência de mudas e da sobrevivência de ninfas de *T. infestans*, realizada a fim de se avaliar a ação do ácido valproico (VPA) sobre o desenvolvimento dos insetos, mostrou que a droga, assim como a injeção de solução salina, reduziu seu período de sobrevivência, além de afetar a ocorrência de mudas.

Palavras – chave: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, DNA rico em AT, DNA rico em GC, heterocromatina, epigenética.

ABSTRACT

Chromatin in interphase cell nuclei can be present in two distinct states: euchromatin and heterochromatin, which may be constitutive or facultative. In somatic cells at the end of the nymphal stage of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* there are large nuclei, in which heterochromatin is presented as conspicuous bodies (chromocenters). These cells are an appropriate model for investigation of morphological and functional characteristics of the chromatin. In studies about chromatin constitution, the base DNA composition is explored due to the informational content of the findings. If the objective is to investigate the chromatin functionality, recently has been used the epigenetic approach.

In the current study, the aim was to investigate the DNA base composition in these cells, associating with the chromatin domains therein and also the presence of NORs. Through fluorescent stains with Chromomycin A3 (CMA3)/Distamycin and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)/Actinomycin D was found that the chromocenters DNA of *T. infestans* and *P. megistus* were AT-rich and GC-poor. This was also confirmed by immunodetection of 5-methylcytidine, which occurred only in the euchromatin, and by *T. infestans* nymphs treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (demethylating agent), followed by nuclear phenotypes analysis and image analysis, in which expansion was observed only in the euchromatic area. AgNOR test evidenced that the GC-rich region around the chromocenter coincides with an accumulation of argyrophilic proteins, suggesting association with NORs. Epigenetic modifications on histone tails in chromatin of these insects were investigated by using antibodies against specific epigenetic markers, in order to identify their differential participation in the composition and structure of these heterochromatic regions. It was observed hypoacetylation and hypermethylation in heterochromatic body area, suggesting a possible action of histones modification in the maintenance of the heterochromatic structure in somatic cells of both species

of reduviids. Through evaluation of histones deacetylases inhibitors action on the chromatin, it was observed that when *T. infestans* and *P. megistus* nymphs were treated with these drugs there was an increase in the frequencies of necrosis, and in the specific case of Trichostatin A (TSA) and sodium butyrate (NaBt), occurred heterochromatin decondensation. It is suggested that treatments with TSA and NaBt could affect the histones deacetylation process, which would be an important factor in chromocenters structuring. Observations of the molting occurrence and survival of *T. infestans* nymphs, carried out in order to evaluate the action of valproic acid (VPA) on the development of insects, showed that this drug, as well as injection of saline, reduced the survival period, besides affecting the molting occurrence.

Keywords: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, AT-rich DNA, GC-rich DNA, heterochromatin, epigenetics.

I. Arquitetura cromatínica e composição genômica

O núcleo interfásico eucariótico é composto por envoltório nuclear, cromatina e nucléolo. A cromatina é uma estrutura complexa formada por interações entre DNA, proteínas histônicas e não histônicas, e RNA, organizada em diferentes níveis de enovelamento. A cromatina, com base em estudos de Heitz nos anos 1930, foi definida segundo dois estados distintos: a eucromatina e a heterocromatina. A heterocromatina foi originalmente descrita como a porção do genoma que permanece condensada e intensamente corada (heteropicnótica), ao longo de todo o ciclo celular, e que geralmente está associada aos telômeros e regiões pericentroméricas dos cromossomos (Richards & Elgin, 2002). Somem-se a isso outras características, que a definem como a cromatina com replicação do DNA mais lenta e certa inatividade gênica ou como não codificadora. Já a eucromatina constituiria a maior parte da cromatina, transcricionalmente ativa ou expressa, e que, após a divisão celular, torna-se mais descompactada e difusa.

Genes ativos, presentes na eucromatina, podem ser silenciados, demonstrando o fenótipo da variação, por exemplo, em que há expansão dos domínios heterocromáticos adjacentes (Elgin & Grewal, 2003). Assim, levando-se em conta as características do processo de heterocromatinização, podem-se definir dois tipos básicos de heterocromatina. A heterocromatina constitutiva é geralmente rica em DNA repetitivo e predominantemente não codificadora. Já a heterocromatina facultativa é representada por regiões genômicas com composição de DNA heterogênea, como a eucromatina, mas que exibe um alto nível de compactação apenas em um grupo de células ou somente em um dos homólogos ou ainda apenas durante certo período de tempo, após o qual volta a se descompactar. Assim, a manutenção de um estado silenciado da heterocromatina facultativa depende primariamente de modificações covalentes no DNA, associação de proteínas não histônicas e padrões específicos de

modificação covalente nas caudas das histonas, que alteram o arranjo nucleossomal (contato internucleossomal e espaçamento) (Richards & Elgin, 2002).

Sabe-se que os cromossomos, mesmo em seu estado não condensado (durante a intérfase), não se distribuem casualmente nos núcleos de células interfásicas, mas sim obedecendo a posições precisas, estando em alguns casos compartimentalizados em territórios próprios (Borden & Manuelidis, 1988; Cremer & Cremer, 2001) e com atividades biológicas distintas (Rippe, 2007). Esse posicionamento específico dos cromossomos no núcleo foi primeiramente sugerido por Carl Rabl em 1885 e, em 1909, quando Theodor Boveri cunhou o termo “território cromossômico” (TC), referindo-se às tais regiões distintas ocupadas pelos cromossomos (Figura 1). Muito embora a dinâmica da cromatina dependa do tipo celular, do período de observação e do estado de diferenciação celular, evidências concretas da organização territorial dos cromossomos vêm sendo demonstradas por meio da hibridação *in situ* fluorescente (FISH), principalmente em células de mamíferos e plantas, em uma abordagem conhecida como pintura cromossômica (Hübner & Spector, 2010; Cremer & Cremer, 2010). No caso específico de humanos, as posições dos cromossomos podem variar dependendo do tipo celular e do tamanho dos cromossomos, admitindo-se que, neste caso, cromossomos menores normalmente se localizam no interior dos núcleos, enquanto cromossomos maiores se encontram na periferia nuclear (Hübner & Spector, 2010).

Além dos TCs, descreve-se a existência de compartimentos intercromatina (CI), havendo um modelo teórico para explicar a associação espacial entre estes subcompartimentos nucleares. Segundo este modelo “TC – CI”, os CIs representam uma rede tridimensional de lacunas e canais, surgidos a partir dos complexos de poro e que se expandem entre os TCs e no interior dos mesmos (Figura 1). Admite-se que os CIs e a interface entre os TCs e os CIs, denominada região pericromatina, possuem uma topologia definida essencial para a ocorrência

da transcrição, *splicing*, replicação e reparo (Cremer & Cremer, 2001; Cremer et al., 2004).

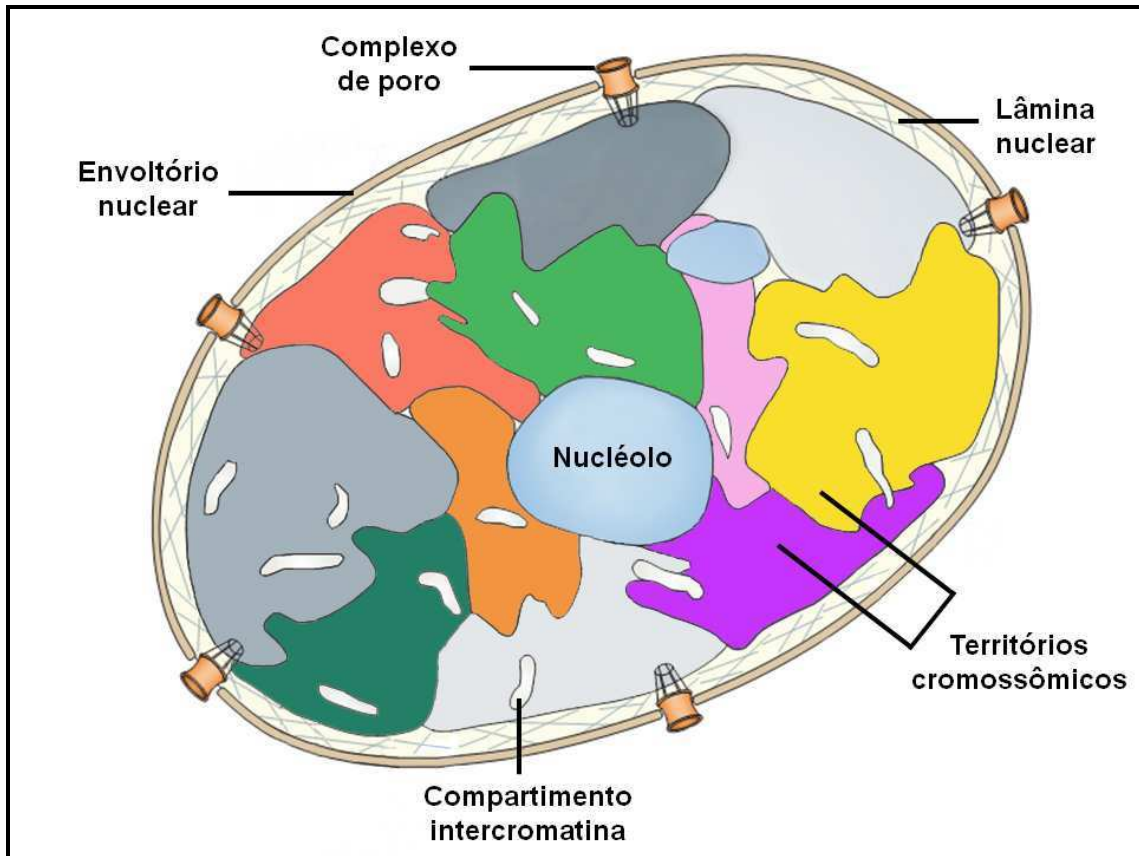


Figura 1. Diferentes domínios subnucleares, encerrados no espaço nuclear delimitado pelo envoltório nuclear, que contém os complexos de poro responsáveis pelo intercâmbio de componentes e substâncias com o citoplasma. A cromatina estabelece ligação com as proteínas laminas que compõem a lâmina nuclear. Os cromossomos estão organizados em territórios no núcleo interfásico e a rede de canais entre os territórios cromossômicos e dentro dos mesmos compõem os compartimentos intercromatínicos (adaptado de Lanctôt et al., 2007).

Essas características relacionadas à dinâmica e organização da cromatina são importantes, porque permitem correlacionar a configuração e localização dos territórios cromossômicos ao seu nível de expressão gênica. Os territórios cromossômicos são ainda subdivididos em compartimentos ou domínios cromossômicos reconhecidos como os próprios braços do cromossomo, regiões centroméricas e teloméricas e *loops* de cromatina (Cremer et al., 1996). Nestes

domínios, mais do que uma simples partição entre eucromatina e heterocromatina, tem-se estabelecida certa relação entre composição genômica, densidade gênica e nível de compactação das fibras de cromatina. Sabe-se que, nos genomas eucarióticos, porções descompactadas da cromatina contêm regiões mais ricas em genes, com alta proporção de bases GC, mas não há necessariamente uma maior ocorrência de atividade gênica nestas regiões (Gilbert et al., 2004).

Além da relação entre a riqueza em bases GC e a configuração da cromatina, há também associações da localização periférica da cromatina com seu conteúdo em bases GC. Estruturas subnucleares pobres em bases GC estariam localizadas periféricamente (Bernardi, 1993; Saccone et al., 2002; Federico et al., 2008). A periferia nuclear apresenta microdomínios de diferentes composições, associando-se a diferentes regiões do genoma e tendo provavelmente diferentes efeitos sobre a função genômica (Deniaud & Bickmore, 2009). Isto estaria de acordo com a hipótese de que na dependência do ambiente nuclear e de modificações específicas dos seus componentes químicos possa ocorrer rearranjo estrutural dos subcompartimentos nucleares (Rippe, 2007).

Várias outras características da cromatina também têm sido associadas, em certos tipos celulares humanos, com a definição de sua localização nuclear, ressaltando-se a densidade gênica, o tempo de replicação, a presença de sequências repetitivas e o conteúdo em bases GC, muito embora ainda não se saiba a amplitude da participação de cada um desses fatores na organização cromatínica (Parada et al., 2004; Pederson, 2004; Foster & Bridger, 2005; Bartova & Kozubek, 2006).

O conteúdo em bases do DNA adquiriu tamanha importância na definição das características da cromatina, que foram definidas classificações para os segmentos de DNA com base em seu conteúdo GC. No caso de cromossomos metafásicos humanos, as bandas R (reversas) têm sido descritas como detentoras de grande densidade gênica, heterogêneas, com regiões mais e menos ricas em bases GC, e que se replicam logo no início do ciclo celular. Já as bandas G, mais homogêneas, costumam ser pobres em GC e possuem uma estrutura cromatínica

mais compactada, com baixa densidade gênica, replicando-se mais tardiamente no ciclo celular (Bernardi, 1989; Bernardi, 1993; Craig & Bickmore, 1993; Bernardi, 2000). Os padrões de coloração destas regiões genômicas, obtidos principalmente com o uso de fluoróforos (4-6-diamidino-2'-fenilindol e Cromomicina A3), refletem a composição em bases do DNA, enovelamento e compactação da cromatina (Holmquist et al., 1982; Craig & Bickmore, 1993; Saitoh & Laemmli, 1994; Furey & Haussler, 2003; Mandrioli et al., 2011). Níveis de expressão e características de bandas G ou R não implicam em um posicionamento distinto com respeito ao centro ou periferia nucleares, sendo ainda objeto de controvérsias a influência da atividade transcricional no posicionamento de sequências dentro do núcleo (Küpper et al., 2007).

II. Estruturação cromatínica e fatores epigenéticos

As proteínas histônicas são proteínas globulares, de caráter básico que fazem parte da cromatina. Acham-se classificadas em cinco tipos principais, tendo por base seu teor em resíduos de lisina e arginina (H1, H2A, H2B, H3 e H4). As histonas H3 e H4 são altamente conservadas. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 se associam ao DNA formando os nucleossomos, que consistem de um segmento de DNA de 147 pb envolvendo um *core* histônico constituído de um tetrâmero H3-H4 e dois dímeros H2A-H2B. Tornando ainda mais compactas as estruturas cromatínicas, tem-se ainda a associação da histona H1, aproximando os nucleossomos entre si (Figura 2), as condensinas e os fatores associados à cromatina e relacionados à arquitetura da mesma, sendo uma das mais relevantes a *heterochromatin protein 1* (HP1- α) (Kimmins & Sassone-Corsi, 2005; Allis et al., 2007; Alberts et al., 2008; Suganuma & Workman, 2011).

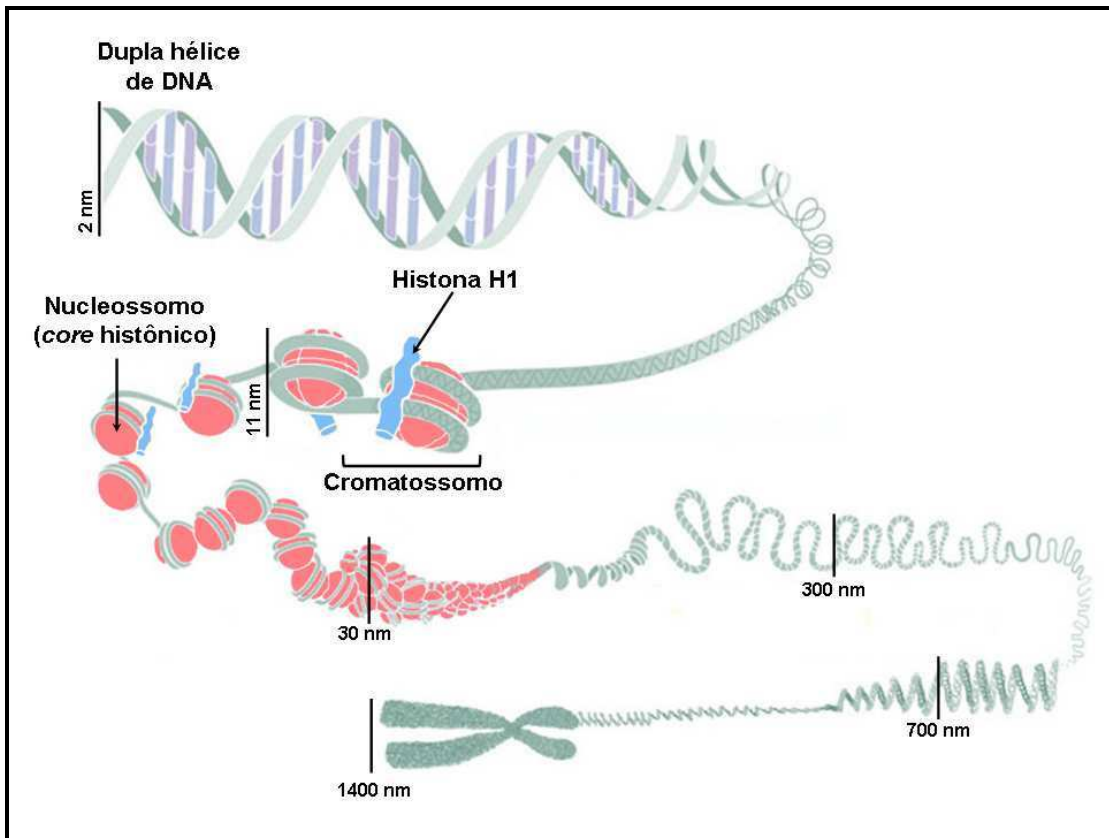


Figura 2. Visão esquemática dos níveis de compactação da cromatina. Cada cromossomo consiste de uma única longa molécula de DNA, compactada segundo diferentes níveis pela ação de proteínas histônicas e não histônicas (*scaffold*). As proteínas histônicas se organizam formando um octâmero ao redor do qual o DNA se enovela. A aproximação dos nucleossomos entre si é realizada pela histona H1. O enovelamento dos cromatossomos origina a fibra de 30 nm que, ao se enovelar ainda mais, poderá determinar o padrão de compactação observado nos cromossomos metafásicos (adaptado de Pray, 2008).

As histonas, embora constituam uma das classes de proteínas mais conservadas durante a evolução, apresentam-se também como as mais variáveis em termos de modificação pós-traducional. Suas caudas N-terminais, expostas para o exterior dos nucleossomos, estão sujeitas a modificações pós-traducionais covalentes específicas, tais como: acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, deiminação, carbonilação, glicosilação e ADP-ribosilação (Richards & Elgin, 2002; Nightingale et al., 2006; Allis et al. 2007). Esse conjunto de modificações de histonas provê, em associação à metilação de DNA, marcadores epigenéticos. A epigenética representa mudanças herdáveis

nos padrões de expressão gênica e silenciamento do genoma que não consistem em alterações na sequência de bases do DNA, mas dependem da soma das alterações moleculares na estrutura da cromatina (Allis et al., 2007). Dessa forma, algumas enzimas “escreveriam” o código, por inserir tais modificações na estrutura da proteína, e outras “leriam” o código, identificando uma modificação específica e se associando à cromatina naquele ponto para desempenhar suas funções. Por fim, um terceiro grupo de enzimas seria responsável por remover as modificações covalentes das caudas das histonas, mantendo um balanço no estado de compactação da cromatina (Allis et al., 2007; Suganuma & Workman, 2011). Admite-se que todas as modificações epigenéticas possam afetar a estrutura da cromatina, por meio do impedimento de certos contatos ou da ligação de proteínas que se associam à cromatina ou às histonas ou ainda provendo uma superfície de ligação alterada para as mesmas (Allis et al., 2007).

A metilação do DNA é uma modificação epigenética amplamente distribuída entre procariotos e eucariotos, particularmente prevalente em plantas e mamíferos e implicada no silenciamento da transcrição (Grewal & Moazed, 2003; Clouaire & Stancheva, 2008). Nos eucariotos, esta modificação contribui para a estabilidade da heterocromatina pericentromérica e cromossômica como um todo, regulando os níveis de expressão gênica e atuando na inativação do cromossomo X dos mamíferos placentários XX. Em algumas espécies, sua ocorrência é de fundamental importância nos estágios iniciais do desenvolvimento, podendo inclusive afetar as frequências de apoptose (Richards & Elgin, 2002; Field et al., 2004). Esses grupamentos metil que se ligam à citosina, normalmente encontram-se distribuídos nas ilhas CpG de regiões não codificantes e de elementos transponíveis do genoma (sequências virais, transposons, etc.) (Bird, 1986), o que indicaria uma possível função: silenciamento de genoma externo que veio a se integrar ao genoma da célula (Allis et al., 2007). Além da metilação de DNA em si, é importante também a participação de proteínas que se ligam a esse DNA metilado e são responsáveis por traduzir o sinal da metilação do DNA em estados funcionais da cromatina, cooperando com complexos correpressores e

participando da organização espacial dos domínios nucleares (Allis et al., 2007; Clouaire & Stancheva, 2008).

Quanto às modificações nas caudas das histonas, o grau de acetilação e de metilação varia ao longo dos cromossomos e de domínios da cromatina de animais e vegetais. A acetilação é mais frequente em áreas eucromáticas e tem sido associada à ativação de transcrição, recombinação e reparo do DNA (Ikura et al., 2000; McMurry & Krangel, 2000; Jasencakova et al., 2001). Em geral, a acetilação reversível de resíduos de lisina nas posições 5, 8, 12 e 16 (K5, K8, K12 e K16) da histona H4 e nas posições 9, 14, 18 e 23 (K9, K14, K18 e K23) da histona H3 são responsáveis pela descondensação da cromatina, por alterações nas interações DNA-histona nos nucleossomos, facilitando o acesso e ligação dos fatores de transcrição ao DNA (Garcia-Ramirez et al., 1995; Jasencakova et al., 2000). Mais especificamente, a acetilação do resíduo de lisina na posição 16 (K16) da histona H4 prejudica a formação de estruturas de ordem superior (níveis mais complexos de compactação) da cromatina, como a fibra de 30 nm (Shogren-Knaak et al., 2006). A metilação de histonas é mais intensa em domínios heterocromáticos, especialmente metilados no resíduo de K9 da histona H3 em muitos organismos (Peters et al., 2001; Schotta et al., 2002; Soppe et al., 2002). Esta modificação permite o recrutamento da proteína HP1- α (Figura 3), também apontada como responsável por silenciamento de regiões eucromáticas e, conseqüentemente, pela organização da heterocromatina por meio do recrutamento de enzimas, tais como as deacetilases e metiltransferases de histonas (Bannister et al., 2001; Jackson et al., 2002; Elgin and Grewal, 2003; Kouzarides, 2007).

Para o estudo das alterações epigenéticas nas caudas das histonas, o uso de anticorpos específicos na detecção de cada modificação nas proteínas tem sido o mais aplicado em diversas técnicas, como por exemplo, imunocitoquímica, *immunoblotting* e imunoprecipitação de cromatina. Espectrometria de massa e hibridação *in situ* fluorescente (FISH), em combinação com processamento de imagens em alta resolução para estudos envolvendo microscopia também vem

sendo utilizados. Já para analisar a relevância destas modificações específicas nas caudas das histonas, o estudo de mutantes vem sendo aconselhado. Todas essas abordagens, em conjunto, nos permitem o desenvolvimento das habilidades para caracterizar as modificações presentes na cromatina como um todo ou em regiões com sequências de DNA específicas (Jasencakova et al., 2001, 2003; Kouzarides, 2007; Kimura et al., 2008).

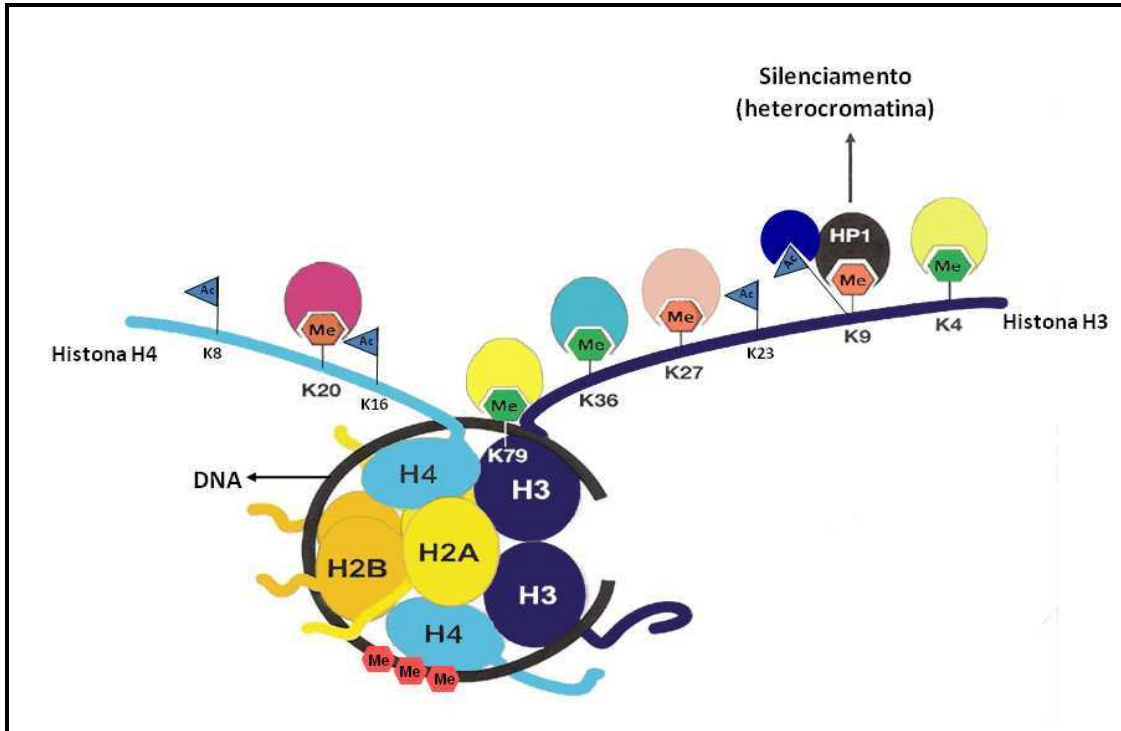


Figura 3. Alguns sítios característicos de acetilação e metilação de histonas são mostrados. A metilação de DNA ocorre em domínios CpG (sequências ricas em bases CG). A acetilação de histonas ocorre mais comumente nos resíduos de lisinas das regiões N-terminais das histonas H3 e H4. A metilação de histonas frequentemente ocorre em resíduos de lisina nas histonas H3 e H4. Certos resíduos de lisina metilados estão relacionados à ativação da transcrição (resíduos em verde), enquanto outros estão envolvidos com repressão transcricional (resíduos em vermelho), onde podem se ligar proteínas que promovam o silenciamento, como HP1- α (adaptado de Allis et al., 2007).

As enzimas responsáveis pela remoção das acetilações, as deacetilases de histonas (HDACs), costumam ser divididas em 4 classes (I, IIa, IIIb e IV), com base no seu nível de homologia em relação às HDACs de leveduras, sua localização celular e sua atividade enzimática.

Vários inibidores de deacetilases de histonas, responsáveis por um acúmulo de acetilações, têm sido apontados como indutores de atraso do ciclo celular, diferenciação e apoptose em linhagens celulares. Por isso, estão sendo testados ou já vem sendo utilizados como agentes promissores em intervenções terapêuticas direcionadas à reversão de estados epigenéticos aberrantes associados, por exemplo, ao câncer, com toxicidade relativamente baixa às células normais (Bolden et al., 2006). Um dos mais efetivos inibidores de deacetilases é a Tricostatina A (TSA), um antibiótico fungistático, que inibe reversivelmente as quatro classes de HDACs de mamíferos em concentrações nanomolares, ligando-se ao sítio catalítico dessas enzimas e, portanto, impedindo a ligação do substrato (Siavoshian et al., 2000; Herold et al., 2002; Tóth et al., 2004). Em culturas celulares submetidas à TSA, observou-se um atraso das células nas fases G1 e G2 do ciclo celular, a indução da diferenciação e, por vezes, a reversão da morfologia transformada das células (Vigushin et al., 2001). O ácido valproico (VPA), inibidor de HDACs das classes I e IIa, é um ácido graxo de cadeia curta amplamente utilizado em humanos predominantemente como agente anticonvulsivo e estabilizador de humor (Phiel et al., 2001). Admite-se que o VPA esteja principalmente relacionado ao aumento das funções do GABA (ácido γ -aminobutírico) e suas interações com canais de cálcio e sódio (Eyal et al., 2004), bem como ative transcrição de diversos promotores (Phiel et al., 2001) e induza efeitos teratogênicos dado sua ação como inibidor de deacetilases de histonas (Phiel et al., 2001; Jergil et al., 2011) e afete a organização da cromatina (Felisbino et al., 2011). Já o butirato, que também inibe HDACs das classes I e IIa, é produzido naturalmente por alguns organismos a partir da oxidação catabólica de cadeias longas de ácidos graxos saturados (Sawa et al., 2001; Flores-Ancona et al., 2009). O seu sal, butirato de sódio (NaBt), inibe reversivelmente as deacetilases de histonas, acabando por alterar o padrão de expressão gênica, o que poderia levar a alterações na conformação da cromatina. Em algumas linhagens celulares, ao se modificar a expressão de genes específicos, o NaBt

aumenta a suscetibilidade das células às ações citotóxicas das células NK do sistema imune (Zhang et al., 2009).

III. *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*

Os insetos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae são hematófagos, hábito relativamente recente no curso da evolução, classificados em 144 espécies (Galvão et al., 2003; Forero et al., 2004; Poinar, 2005; Costa et al., 2006; Galvão & Angulo, 2006; Costa & Felix, 2007; Sandoval et al., 2007; Bérenger & Blanchet, 2007; Martinez et al., 2007, Jurberg et al., 2009), distribuídos predominantemente nas Américas, ocupando diversos habitats (Tartarotti & Ceron, 2005; Schofield & Galvão, 2009). Dois importantes membros desta subfamília são *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* (Figura 4), vetores da Doença de Chagas, a tripanossomíase reconhecidamente mais preocupante na América Latina, com um número estimado de cerca de 8 milhões de pessoas infectadas e outras 28 milhões sob risco de infecção (WHO, 2010; Avila et al., 2011).

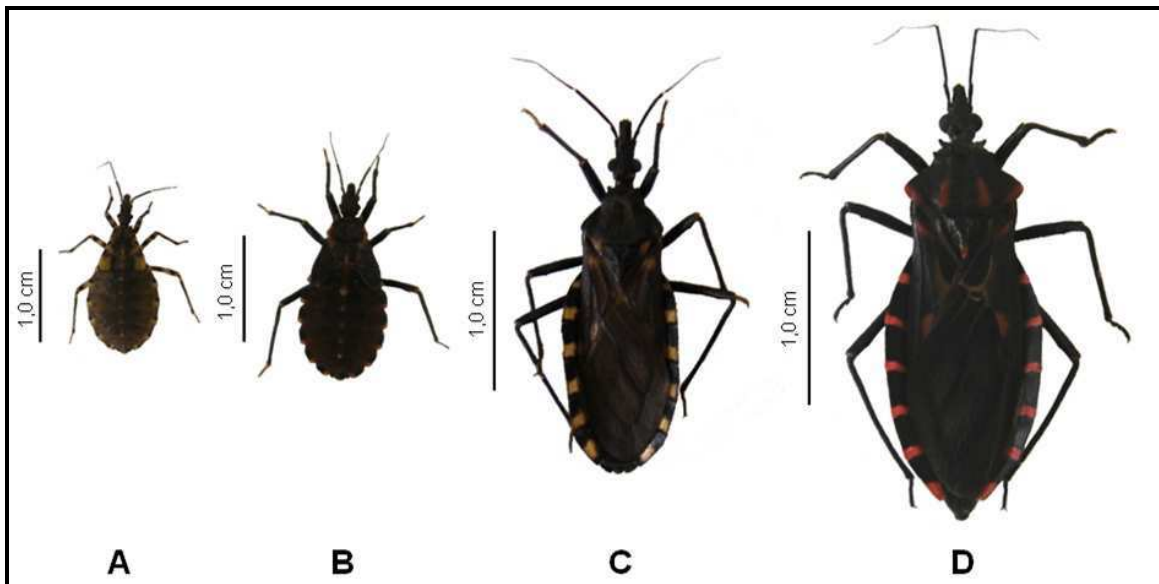


Figura 4. Imagens de duas fases do ciclo das espécies de triatomíneos utilizadas no estudo. Em A e B, ninfas de 5º estadio de *T. infestans* e *P. megistus*, e em C e D, adultos de *T. infestans* e *P. megistus*.

Além de sua importância médica, esses triatomíneos representam excelentes modelos de estudo em Citogenética, pela presença de cromossomos holocêntricos e outras características únicas de seu sistema genético, e em Biologia Celular, dado o seu mecanismo de poliploidização e fusão de núcleos e células e também no que se refere à organização da cromatina (Schreiber & Pellegrino, 1950; Hughes-Schrader & Schrader, 1961; Mello, 1971, 1975; Mello et al., 1986; Mello & Raymundo, 1980). Frequentemente, utiliza-se para estudo órgãos como testículos, glândulas salivares e túbulos de Malpighi (Figura 5), sendo estes últimos aqui empregados.

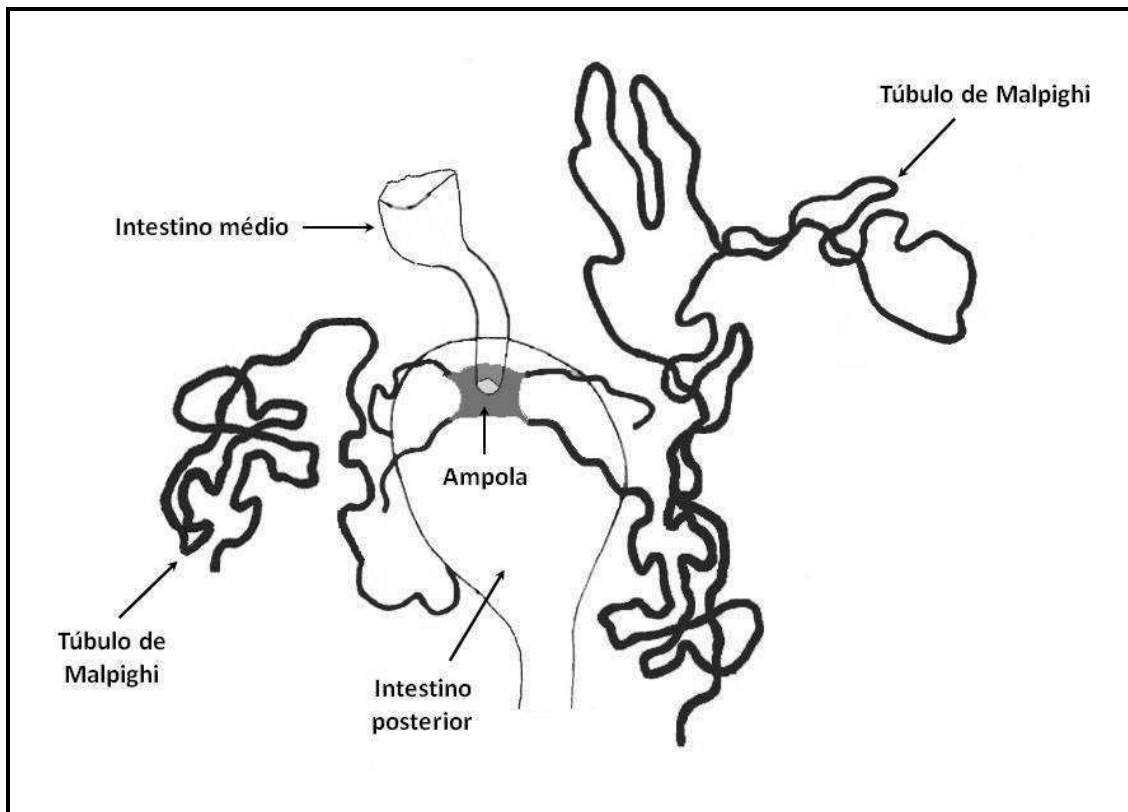


Figura 5. Localização, em relação ao intestino, e inserções dos túbulos de Malpighi na ampola (adaptado de Wigglesworth, 1965).

Cromossomos holocêntricos, como os apresentados por estes insetos, não apresentam um centrômero localizado e a placa cinetocórica ocorre ao longo de

todo o seu comprimento, exceto nas porções distais, na região externa de cada cromátide irmã (Buck, 1967; Guerra et al., 2010). Tais cromossomos não apresentam a estrutura trilaminar característica observada em cinetocoros de cromossomos com centrômero localizado, levando-nos a concluir que, durante a divisão celular, os microtúbulos do eixo se adiram diretamente à cromatina. Em mitose, tais cromossomos não apresentam uma região de constrição primária, apresentando-se homogeneamente condensados, e demonstram comportamento característico, com as cromátides irmãs orientadas paralelamente à placa equatorial na metáfase (Buck, 1967; Guerra et al., 2010). Evolutivamente, admite-se que tal padrão cromossômico apresente uma origem polifilética, tendo evoluído independentemente diversas vezes durante a evolução das plantas e animais (Mola & Papeschi, 2006).

Machos de *T. infestans* apresentam 22 cromossomos (2n), sendo 20 autossomos e 2 cromossomos sexuais (X e Y) (Schreiber & Pellegrino, 1950). Já os machos de *P. megistus* possuem 21 cromossomos (2n), sendo 18 autossomos e 3 cromossomos sexuais (X_1 , X_2 e Y) (Schreiber & Pellegrino, 1950; Panzera et al., 2010). Os mecanismos sexuais compostos, como o apresentado por *P. megistus* (X_1X_2Y), derivaram evolutivamente do sistema XY, acredita-se que, por fragmentação do cromossomo X (Ueshima, 1966).

No que concerne à estruturação da cromatina, as células somáticas de *T. infestans* caracterizam-se pela presença de um ou vários corpos de heterocromatina (cromatina condensada com propriedades químicas e fisiológicas especiais) (Mello, 1971) (cromocentro) formados pelos autossomos maiores A, B e C, além dos cromossomos sexuais X e Y. Nos 1º e 2º instares ninfais de *T. infestans* todas as células epiteliais dos túbulos de Malpighi contém um único cromocentro. Este fenótipo diversifica-se durante o 3º instar ninfal, quando dois diferentes fenótipos nucleares passam a ser observados nos túbulos de Malpighi: núcleos com um único grande cromocentro e núcleos com vários cromocentros menores (Mello, 1971, 1978, 1979). A heterocromatinização em *T. infestans* foi sugerida como um mecanismo citológico de isolamento reprodutivo da espécie

(Schreiber et al., 1972), além de refletir uma mudança genômica adaptativa que contribuiu para a sobrevivência, reprodução e dispersão desta espécie em diferentes ambientes biogeográficos (Panzera et al., 2004, 2010). Em *P. megistus* observa-se apenas um único corpo heterocromático nas células somáticas de machos, menor se comparado ao de *T. infestans* e que, durante o processo de poliploidização, sofre também replicações do DNA (Mello et al., 1986).

Os corpos conspícuos de heterocromatina (cromocentros) em *T. infestans* caracterizam-se também pela replicação mais lenta do DNA, pela relativa ausência de transcrição, riqueza em DNA repetitivo e particularidades citoquímicas (Mello, 1971, 1979, 1980, 1985; Mello & Recco-Pimentel, 1987). Dentre as últimas se salientam uma especial resistência do DNA à depurinação, e do ácido apurínico à despolimerização, com a hidrólise ácida, e ausência de afinidade de ligação do DNA à protamina (Mello, 1979, 1985). A formação dos cromocentros nas células somáticas dos barbeiros leva a uma proximidade espacial dos pares de autossomos que os formam e que apresentam bandas C (heterocromatina constitutiva), o que poderia inclusive facilitar a troca de regiões de heterocromatina constitutiva entre os cromossomos homólogos e não homólogos durante a prófase meiótica e mitótica (Panzera et al., 1995).

Sob a ação de agentes estressores como metais pesados, choques de temperatura isolados ou em sequência e seguidos à infestação por *Trypanosoma cruzi*, radiação gama e jejum, ficou demonstrado que as áreas heterocromáticas de alguns núcleos da população celular de *T. infestans* e de *P. megistus* podem se descompactar, o que foi considerado uma tentativa de ativação de gene(s) silente(s), possivelmente aí presentes, em resposta a condições desfavoráveis ao inseto (Álvares & Mello, 1987; Mello, 1989; Mello et al., 1990, 1995, 2001; Garcia et al., 2000a, b, 2002, 2011; Campos et al., 2002). Tal fenômeno guarda semelhanças com o que acontece em algumas regiões heterocromáticas de cromossomos politênicos, também sob a ação de agentes estressores (Simões et al., 1975). Além disso, esses agentes de “stress” podem também ocasionar morte celular por apoptose ou necrose (Mello et al., 2001; Garcia et al., 2000b). Metais

pesados e choques de temperatura também podem afetar as frequências de ocorrência de muda (Mello et al., 1995; Campos et al., 2002).

Nesses insetos, as células somáticas, especialmente dos túbulos de Malpighi, sofrem fenômeno de poliploidização ao longo do desenvolvimento ninfal (Mello, 1971, 1975, 1978). Altos graus de ploidia têm sido reportados para esses órgãos no final da fase ninfal, quando investigados por microespectrofotometria e análise de imagem, nas espécies *T. infestans* e *P. megistus* (Mello, 1971, 1975, 1978). A poliploidia é igualmente um fenômeno frequente em uma linhagem celular *in vitro* obtida para *T. infestans* (Mello & Pudney, 1987).

Considerando-se todas as características mencionadas, percebe-se que, embora muito já se saiba sobre as células somáticas dos hemípteros reduviídeos, há ainda outros aspectos a serem abordados. Assim, seria de interesse investigar, por exemplo, a presença e o padrão de localização de sequências específicas de bases no DNA em cromatina de células interfásicas de *T. infestans* e *P. megistus*. Estudos prévios com bandamento C e Q e respostas ao tratamento com Hoechst 33258 indicam um conteúdo representativo de bases AT no cromocentro de *T. infestans* (Mello & Recco-Pimentel, 1987). Respostas negativas à coloração com Cromomicina A3 em alguns autossomos e um dos cromossomos sexuais em metáfases espermatogoniais de *T. infestans* e *P. megistus* também indicam menor conteúdo de bases GC nestes insetos (Morielle-Souza & Azeredo-Oliveira, 2007). Associado aos estudos de composição em bases do DNA nos cromocentros de *T. infestans* e *P. megistus*, é também de interesse estudar se existe contribuição do DNA metilado na manutenção de corpos heterocromáticos evidenciável por métodos imunocitoquímicos. Quanto aos demais determinantes epigenéticos envolvidos na manutenção do estado de condensação dos corpos heterocromáticos, sabe-se que existe a necessidade e importância de identificação dos mesmos, por meio da detecção de modificações nas caudas das histonas, principalmente com o uso de anticorpos específicos para tal. Com respeito à atuação de outros mecanismos epigenéticos na estruturação da cromatina nestas células, ao se submeter os insetos a tratamentos com drogas

inibidoras de deacetilases de histonas, seria possível investigar a participação da deacetilação de histonas na organização dos cromocentros, além de verificar a ocorrência de uma possível ação estressante das drogas a estes insetos, por meio da observação de fenótipos nucleares indicativos de morte ou sobrevivência celular. Similarmente, monitorando-se a ação destas drogas sobre a sobrevivência e ocorrência de muda nos insetos, podem ser obtidas comprovações dos efeitos nocivos das mesmas. O estudo dos corpos heterocromáticos nos núcleos de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *T. infestans* é de grande valia por se tratar de núcleos com diferente fenótipo e alto grau de ploidia, além da possibilidade de comparação entre as características de tais territórios cromatínicos e outras estruturas semelhantes nos núcleos celulares de mamíferos. Quanto a *P. megistus*, a verificação das características do cromocentro seria igualmente importante, especialmente com propósitos comparativos, em relação ao observado em *T. infestans*.

OBJETIVOS

Considerando-se o exposto no tópico de Introdução, os objetivos do presente trabalho foram:

I) Investigar a composição em bases do DNA dos territórios heterocromáticos e definir a localização espacial das regiões ricas em bases AT e GC nos núcleos de células de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*.

II) Investigar a participação de alguns marcadores epigenéticos na composição e estrutura dos territórios heterocromáticos e eucromatina mencionados.

III) Determinar se as áreas heterocromáticas estabelecidas com o desenvolvimento ou mesmo outras características nucleares poderiam sofrer alterações estruturais sob a ação de drogas que inibam a deacetilação de histonas bem como avaliar possível ação de drogas inibidoras de deacetilases de histonas sobre parâmetros relacionados ao desenvolvimento dos insetos.

Para atingir tais objetivos foram empregadas técnicas morfológicas (topoquímica e imunocitoquímica), além de análise de imagem e microscopias (de luz comum e de fluorescência convencional). Os resultados obtidos encontram-se descritos em três artigos científicos apresentados nos próximos capítulos, sendo um deles já publicado e o segundo em processo de submissão.

Capítulo I

Artigo: Spatial distribution of AT- and GC- rich DNA within interphase cell nuclei of *Triatoma infestans* Klug. Artigo publicado em *Micron* 42: 568–578 (2011).

doi:10.1016/j.micron.2011.02.002.



NCBI Resources How To

PubMed.gov
U.S. National Library of Medicine
National Institutes of Health

Search: PubMed Limits Advanced search Help

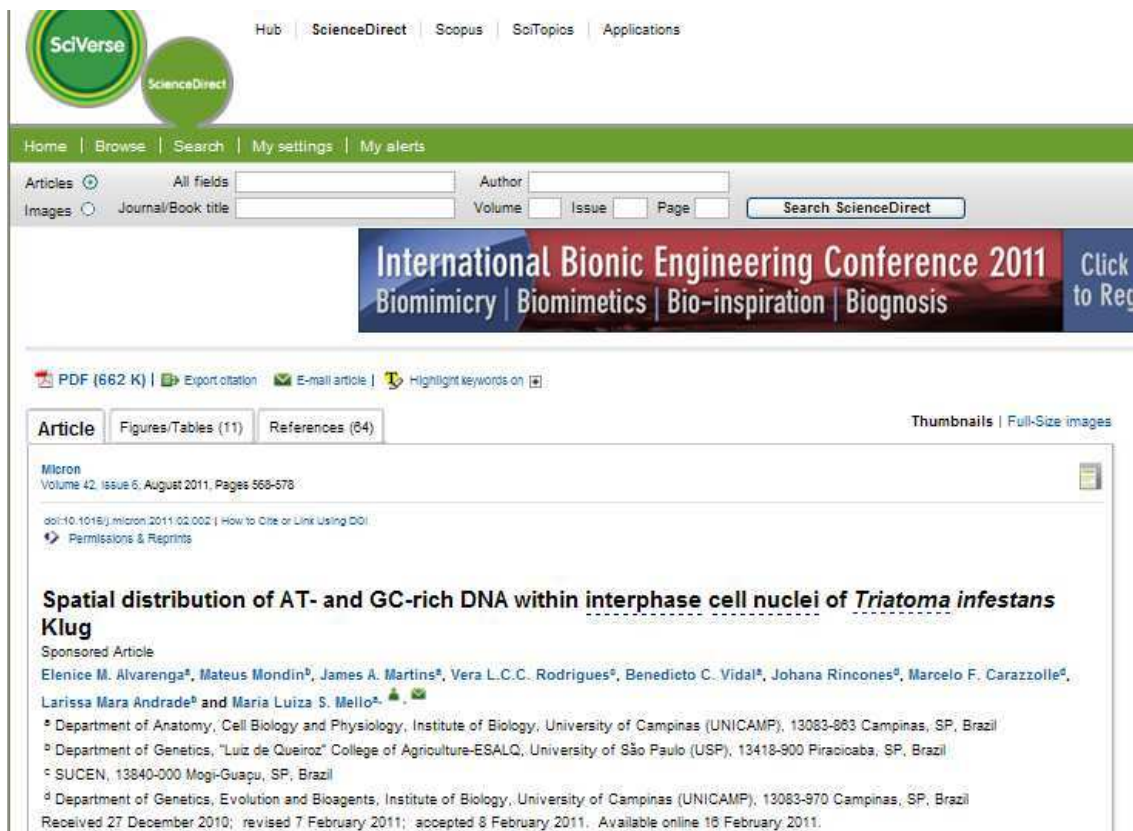
Search

Display Settings: Abstract Send to:

Micron, 2011 Aug;42(6):568-78. Epub 2011 Feb 16.

Spatial distribution of AT- and GC-rich DNA within interphase cell nuclei of *Triatoma infestans* Klug.

Alvarenga EM, Mondin M, Martins JA, Rodrigues VL, Vidal BC, Rincones J, Carazzolle MF, Andrade LM, Mello ML.
Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, SP, Brazil.



SciVerse ScienceDirect

Hub: ScienceDirect Scopus SciTopics Applications

Home Browse Search My settings My alerts

Articles All fields Author
Images Journal/Book title Volume Issue Page Search ScienceDirect

International Bionic Engineering Conference 2011
Biomimicry | Biomimetics | Bio-inspiration | Biognosis

PDF (662 K) | Export citation | E-mail article | Highlight keywords on

Article Figures/Tables (11) References (64) Thumbnails | Full-size images

Micron
Volume 42, Issue 6, August 2011, Pages 568-578

doi:10.1016/j.micron.2011.02.002 | How to Cite or Link Using DOI
Permissions & Reprints

Spatial distribution of AT- and GC-rich DNA within interphase cell nuclei of *Triatoma infestans* Klug

Sponsored Article

Elenice M. Alvarenga^a, Mateus Mondin^b, James A. Martins^a, Vera L.C.C. Rodrigues^a, Benedicto C. Vidal^a, Johana Rincones^c, Marcelo F. Carazzolle^d, Larissa Mara Andrade^a and Maria Luiza S. Mello^a

^a Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, SP, Brazil
^b Department of Genetics, "Luiz de Queiroz" College of Agriculture-ESALQ, University of São Paulo (USP), 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil
^c SUCEN, 13840-000 Mogi-Guaçu, SP, Brazil
^d Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Received 27 December 2010; revised 7 February 2011; accepted 8 February 2011. Available online 16 February 2011.

**Spatial distribution of AT- and GC- rich DNA within interphase cell
nuclei of *Triatoma infestans* Klug**

Elenice M. Alvarenga^a, Mateus Mondin^b, James A. Martins^a, Vera L. C. C. Rodrigues^c, Benedicto C. Vidal^a, Johana Rincones^d, Marcelo F. Carazzolle^d, Larissa Mara Andrade^b, Maria Luiza S. Mello^{a,*}

^a*Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-863, Campinas, SP, Brazil*

^b*Department of Genetics, "Luiz de Queiroz" College of Agriculture-ESALQ, University of São Paulo (USP), 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil*

^c*SUCEN, 13840-000, Mogi-Guaçu, SP, Brazil*

^d*Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brazil*

Corresponding author: Tel.: +55 19 3521 6122; fax: +55 19 3521 6185

E-mail address: mlsmello@unicamp.br (M. L. S. Mello)

ABSTRACT

Heterochromatin bodies in single- and multichromocentered interphase cell nuclei of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas disease, have been suggested to contain AT-rich DNA, based on their positive response to Q-banding and Hoechst 33248 treatment. No information exists on whether GC-rich DNA is also present in these nuclei and whether it plays a role on chromatin condensation. Considering that methodologies more precise than those previously used to determine DNA base composition *in situ* are currently available, and that the spatial distribution of chromatin areas differing in composition in interphase cell nuclei of different species is a matter of interest, the localization of AT- and GC-rich DNA in *T. infestans* nuclei is revisited here. The methodologies used included DAPI/AMD and CMA₃/Distamycin differential staining, Feulgen-DNA image analysis following *Msp* I and *Hpa* II enzymatic digestion, 5-methylcytidine immunodetection, AgNOR response, confocal microscopy, and the 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) demethylation assay. The results identified the presence of AT-rich/GC-poor DNA in chromocenters and evenly distributed AT and GC sequences in euchromatin. A GC-rich DNA zone encircling the chromocenters was also found but it could not be associated with NOR regions. To corroborate the DNA AT-richness in *T. infestans* nuclei, bioinformatic analyses were also performed. Methylated cytosine was evident at some points of the chromocenters' edge in single- and multichromocentered nuclei and at the euchromatin of multichromocentered nuclei and could be transiently affected by the 5-AZA treatment. The present results

suggest that in the particular case of chromocenters of the hemipteran *T. infestans*, cytosine methylation is not a relevant factor involved in chromatin condensation.

Keywords: *Triatoma infestans*, heterochromatin, DNA, epigenetics, bioinformatics, microscopy.

1. Introduction

The interphase cell nuclei of the blood-sucking insect *Triatoma infestans*, a reduviid hemipteran vector of the Chagas disease, contain conspicuous chromocenters that are composed of an aggregation of constitutive heterochromatin bodies (Mello, 1971, 1978, 1979; Mello et al., 2001). Heterochromatinization in *T. infestans* has been shown to affect the A, B and C autosomes and the X and Y sex chromosomes (Schreiber et al., 1972; Solari, 1979), and has been suggested as a cytological mechanism that may contribute to the reproductive isolation of the species (Schreiber et al., 1972). A subsequent report identified the heterochromatinization of one additional autosomal chromosome pair in *T. infestans* colonies under long-term rearing in the laboratory (Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira, 2007). Three cytotypes in terms of constitutive heterochromatin polymorphism (Hirai et al., 1991) and differences in heterochromatin and genome size in *T. infestans* populations presenting different ecological characteristics (Panzera et al., 2004, 2007, 2010) have also been described. The latter have been referred to reflect adaptive genomic changes that contribute to survival, reproduction and dispersion of this species in different biogeographic environments (Panzera et al., 2004, 2010).

In 1st and 2nd nymphal instar *T. infestans*, all of the epithelial cells in the Malpighian tubules contain one heterochromatin body. In these organs, from the 3rd nymphal instar on, two nuclear phenotypes are present: one phenotype is characterized by the presence of a single large chromocenter, while the other contains several small chromocenters (Mello, 1971, 1978, 1979).

Although radioautography has not yet demonstrated transcriptional activities within the heterochromatin bodies of *T. infestans*, the radioactive label can occasionally be observed at the edges of these bodies (Mello, 1971). In addition, the *T. infestans* chromocenters are able to unpack under stressful conditions such as prolonged starvation, heat or cold shock, and the presence of heavy metals (Mello, 1989; Mello et al., 1990, 1995, 2001; Campos et al., 2002). This finding may indicate activation of genes usually silent and contained in the chromocenter body (Mello et al., 1990).

The chromocenters of *T. infestans* have been proposed to contain representative AT-rich DNA based on their deeply positive Q- and C-banding and their light decondensation in response to Hoechst 33258 treatment (Mello and Recco-Pimentel, 1987). Although the complete nuclear genome of *T. infestans* has not yet been sequenced, the mean AT content in the mitochondrial DNA of 18 haplotypes in this species is 68.81% (Segura et al., 2009), and the second internal transcribed spacer (ITS-2) of its nuclear rDNA contains a base composition that is A+T biased (Marcilla et al., 2001). Unpublished preliminary tests using restriction enzymes in the cytological preparations indicate that CpG DNA sequences

susceptible to be cleaved by *Msp* I are also suspected to be found in the chromatin of *T. infestans*.

Fluorochromes such as 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and chromomycin A3 (CMA₃) are currently used to differentially stain chromosomal DNA for AT- and GC-richness, respectively (Schweizer, 1976; Friebe et al., 1996). In addition, GC-richness and the occurrence of methylated -CCGG- sequences, which affect extensive global genome sites, can be investigated in chromosomes and interphase chromatin by using the isoschizomeric restriction enzymes *Msp* I and *Hpa* II (Lima-de-Faria et al., 1980; Mezzanotte et al., 1983; Bianchi et al., 1986; Gonsalvez et al., 1995; Mello et al., 1996; 2009). While both enzymes cleave the sequence -CCGG-, *Hpa* II will not cleave this site if the central cytosine of the internal CG dinucleotide is methylated (Nelson and McClelland, 1991). In general, after the restriction enzyme recognizes, cleaves and removes determined DNA sequences from fixed chromosomes or interphase chromatin, specific images are generated (Mezzanotte et al., 1983; Bianchi et al., 1986; Sentis et al., 1989; Gonsalvez et al., 1995; Mello et al., 1996). The richness in -CCGG- sequences excised by *Msp* I/*Hpa* II, and the presence of methylated CpG sequences not cut by *Hpa* II, can be evaluated by quantifying the response to the Feulgen reaction, specific for DNA, under the action of these enzymes, using video or microspectrophotometric image analysis (Mello et al., 1996, 2009; Mampumbu and Mello, 2006).

It is therefore expected that the analysis of the DAPI/CMA₃ stainings and the Feulgen staining after *Msp* I/*Hpa* II treatments could provide information regarding

AT- and GC-richness in the heterochromatin and euchromatin territories of somatic *T. infestans* cells. The association of GC-rich or AT-rich chromatin regions with NOR regions could be estimated with the AgNOR technique (Pardo et al., 1993; Kuznetsova et al., 2003; Bardella et al., 2010; Cabral-de-Mello et al., 2010). In addition, the immunodetection of 5-methylcytidine and a positive response to treatment for cytidine demethylation could both reveal whether DNA methylation was involved in the heterochromatin constitution of the chromocenters of *T. infestans*.

The spatial distribution of chromatin areas differing in composition is a matter of interest because the arrangement of chromosome territories and the distribution of specific epigenetic markers in interphase nuclei of several mammalian cell types have been demonstrated to be non-random (Cremer and Cremer, 2001; Cremer et al., 2004; Gilbert et al., 2005; Bartova et al., 2008). The structural organization of chromatin in cell nuclei in association with specific epigenetic markers are considered to allow nuclear and cellular processes to be regulated (Rippe, 2007; Bartova et al., 2008 - review; Joffe et al., 2010).

In the present study, heterochromatic bodies and euchromatin were investigated *in situ* for the presence and distribution of extensive AT- and GC-rich DNA in *T. infestans* cells with different nuclear phenotypes, as a first approach to the establishment of knowledge on the spatial arrangement of differently composed chromatin areas in this model.

2. Materials and Methods

2.1. Insect preparations

Malpighian tubules removed from fifth instar nymphs of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) fed once a week on hen's blood and reared at 30°C and 80% relative humidity in the laboratory of SUCEN (Mogi-Guaçu, SP) were used as whole mounts or gentle squashes on glass slides. The *T. infestans* specimens reared in SUCEN originated in the north of the Minas Gerais state (Vale do Jequitinhonha) in Brazil (approximately between latitudes 16°S and 18°S). At least three specimens were utilized for each experimental assay. The whole mounted organs that were used for DNA cytochemistry, digestion assays with restriction enzymes, the AgNOR test and confocal microscopy were fixed in absolute ethanol–glacial acetic acid (3:1, v/v) for 1 min, rinsed in 70% ethanol for 5 min and air dried. The organ squashes were carried out in 40% acetic acid and were previously fixed as mentioned above; the coverslips were removed in liquid nitrogen.

2.2. Topochemistry

2.2.1. DAPI/CMA₃ fluorochrome differential stainings

Fixed squashes of the Malpighian tubules were kept in the freezer for two weeks before staining. Part of these preparations (n = 5) was treated with 2 µg/ml DAPI (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 30 min, and a subset of these was subsequently treated with 0.2 mg/mL actinomycin D (AMD) (Sigma) for 15 min in the dark. Another set of preparations (n = 5) was treated with 0.5 mg/mL CMA₃ (Sigma) for 3 h in the dark; and in a subset of these (n = 3) the CMA₃ staining was

followed by staining with 0.2 mg/mL distamycin (DA) (Sigma) for 10 min in the dark (Schweizer 1976; Friebe et al. 1996). After staining, all of the preparations were rinsed in distilled water, air dried in the dark, mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and examined 15 days later under a Zeiss Axiophot 2 microscope (Oberkochen, Germany) equipped for epifluorescence. Approximately 20 cells from each specimen were examined.

2.2.2. Feulgen reaction

The Feulgen reaction involved hydrolysis in 4 M HCl at 25°C for 65 min followed by incubation with Schiff reagent for 40 min. The acid hydrolysis time used allowed for the maximal DNA depurination for this material as reported previously (Mello et al., 2001). The Feulgen-stained material was rinsed in three baths (5 min each) of sulfurous water and one bath of distilled water, air dried, cleared in xylene, and mounted in natural Canada balsam ($n_D = 1.54$).

For confocal microscopy observations, the fluorescent Feulgen reaction was used (Mello and Vidal, 1978). In this case, the Schiff reagent was diluted in sulfurous water (1:2, v/v) and the stained material was mounted in nujol (Schering Plough, Kenilworth, NJ, USA).

2.2.3. AgNOR test

The tubules were treated with a solution containing 2 volumes of 50% aqueous silver nitrate (Merck, Darmstadt, Germany) and 1 volume of 2% gelatin in 1% aqueous formic acid (v/v) for 20 min at 37°C, rinsed in deionized water, air-

dried, cleared in xylene and mounted in Canada balsam (Ploton et al., 1986; Derenzini and Ploton, 1991). To permeabilize the cells and nuclei, silver impregnation was preceded by treatment with a 1% Triton X-100 solution in the presence of 4 M glycerol for 15 min at 37°C (Vidal et al., 1994).

The analysis was performed using an Olympus BX51-P BX2 microscope (Japan) and the images were captured using Image-Pro Plus 5.1, Media Cybernetics, Inc. (Silver Spring, MD, USA).

2.3. Digestion with restriction enzymes

Cell preparations were treated with 1% Triton X-100 (Sigma) in the presence of 4 M glycerol for 2 min to make the nuclear envelope more permeable to enzyme digestion (Vidal et al., 1994). Then they were incubated with 1.0 U/μL of the restriction enzyme *Msp* I or *Hpa* II (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) in an appropriate buffer, diluted with milliQ™ water up to 50 μL, and covered with a coverslip (Sentis et al., 1989; Chaves et al., 2000) in a moist chamber at 37°C for 10 h. The slides were then rinsed in distilled water and air dried (Chavez et al., 2000). Preparations treated only with 1% Triton X-100 and the assay buffers recommended for each of the enzymes were used as controls. All of the slides were processed for the Feulgen reaction and were subjected to scanning microspectrophotometry.

2.4. Immunoassay for 5-methylcytidine

The squashed Malpighian tubules were heated at 60°C for 30 min, postfixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.0) for 5 min, dehydrated in a series of 70%, 96% and 100% ethanol and air dried. The preparations were then treated with 70% formamide in a 2x SSC solution for 3 min at 75°C and subsequently with cold absolute ethanol. Next, the material was treated with 1% bovine serum albumin (BSA) in 1x PBS for 1 h at 37°C to prevent a nonspecific protein reaction. It was incubated overnight with sheep anti-5-methyl-cytidine (Abcam, Cambridge, MA, USA) diluted in 1% BSA in 1x PBS (1:200), followed by a 90 min treatment with rabbit anti-sheep-FITC diluted in 1% BSA in 1x PBS (1:100) (Zhang et al., 2008). Early prophase nuclei from the root meristem of *Zea mays*, where 5-methylcytosine is known to be homogeneously distributed (Andrade et al., 2009), were used as a positive material control. The preparations were mounted in Vectashield containing 200 µg/mL DAPI and were examined under a Zeiss Axiophot 2 microscope equipped for fluorescence.

2.5. Cytidine demethylation assay

5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) (LabSynth, Diadema, Brazil) at a final concentration of 5 µM and a volume equal to 50 µL was injected into fifth instar nymphs of *T. infestans*. The Malpighian tubules were removed 1 h, 24 h, 48 h and 7 days after the injection (Jiang et al., 2006; Liu et al., 2006). The untreated specimens and nymphs injected with 50 µL DMSO were used as controls. At least three specimens were used for each experimental condition.

The tubule preparations were then subjected to the Feulgen reaction as described above and examined under a Zeiss Axiophot 2 microscope. Some cell nuclei were subjected to scanning microspectrophotometry.

2.6. Scanning microspectrophotometry image analysis

Images of the Feulgen-stained preparations subjected to restriction enzyme treatments and of the preparations obtained from the specimens subjected to the cytidine demethylation assay were obtained with a Zeiss automatic scanning microspectrophotometer interfaced with a personal computer. The operating conditions were as follows: Planapo objective 63/0.90; optovar 1.6; measuring diaphragm diameter, 0.25 mm; field diaphragm diameter, 0.20 mm; LD-Epiplan 16/0.30 condenser; scanning spot of 2 μm X 2 μm ; halogen 100-W/12-V lamp; stabilized electronic power supply; Zeiss light modulator; $\lambda = 560$ nm obtained with a Schott monochromator filter ruler; R-928 photomultiplier; and a Pentium II microcomputer. Any grid point (individual measuring points) showing an absorbance ≤ 0.020 was considered to be background and was automatically removed from the nuclear image. For the preparations treated with restriction enzymes, the cutoff point of 0.800 was selected to evaluate the areas covered by condensed chromatin, based on a preliminary test on enzymatic untreated controls. Nearly two hundred nuclei of each phenotype were randomly chosen and were measured individually for each experimental condition. For the preparations subjected to the 5-AZA treatment, the cutoff point of 0.600 was also selected

based on preliminary tests, and forty five nuclei of each phenotype were measured for each chosen experimental condition.

The image parameters obtained were:

1. A_T , total integrated absorbance (= nuclear Feulgen–DNA values in arbitrary units).
2. A_C , integrated absorbance over the preselected cutoff. The same cutoff was maintained for nuclei under the various experimental conditions. A_C corresponds to the “condensed” chromatin Feulgen–DNA values.
3. $A_C\%$, “condensed” chromatin Feulgen–DNA values relative to the nuclear (whole chromatin) Feulgen–DNA values.
4. S_T , nuclear absorbing area in μm^2 .
5. S_C , area in μm^2 covered with stained chromatin showing absorbances above the selected cutoff point.
6. S_{NC} , area in μm^2 covered with stained chromatin showing absorbances below the selected cutoff point.
7. $S_C\%$, area covered with “condensed” chromatin relative to the nuclear area.
8. $S_{NC}\%$, area covered with “noncondensed” chromatin relative to the nuclear area.
9. $AAR = (A_C/S_C)/(A_T/S_T)$ = average absorption ratio, a dimensionless parameter that expresses the contrast between “condensed” and non-condensed material (Vidal et al., 1973).

A scatter diagram relating AAR to $S_C\%$ was plotted as previously proposed (Vidal, 1984). This diagram allows for the discrimination of the position of the points

corresponding to specific nuclear phenotypic images (Vidal, 1984; Mello et al., 1994; Mello et al., 2009).

$A_C\%$, $S_C\%$, $S_{NC}\%$, AAR and the scatter diagrams were used for the comparisons because they are not susceptible to nuclear ploidy degrees, which vary in the Malpighian tubules of the fifth instar nymphs of *T. infestans* (Mello, 1971, 1975).

2.7. Statistics

All calculations for the data obtained with scanning microspectrophotometry were performed using the Minitab 12TM software for Windows (State College, PA, USA).

2.8. Confocal microscopy

The tubules stained with the fluorescent Feulgen reaction were examined under an Olympus Fluoview FV1000 confocal scanning laser microscope equipped with a multi-argon laser 543 nm and 60 x water immersion objective. The images were captured using the FV1000 Viewer software.

3. Results

3.1. DAPI/CMA₃ differential staining

The euchromatin and heterochromatin of single- and multichromocentered nuclei of the Malpighian tubule cells of *T. infestans* demonstrated a positive affinity for DAPI that was not affected by AMD. The positive response to DAPI staining,

which indicates the presence of AT-rich DNA, was much more intense in the chromocenters than in the euchromatin (Fig. 1 a-c).

The CMA₃ affinity, which indicates GC-rich DNA and was confirmed after DA treatment, was homogeneously positive in the euchromatin and negative in the chromocenters. An intense CMA₃-positive fluorescent ring encircled the chromocenters of the single- and multichromocentered nuclei (Fig. 1 d-g). In the nuclei containing several heterochromatic bodies, the observation of a strong positive response at the edge of the chromocenters and extending in between these bodies may be jeopardized by the fact that large entire nuclei are not homogeneously focused; this staining may even falsely suggest a positive response in the inner part of the chromocenters (Fig. 1f).

3.2. Restriction enzyme digestions

There was no visual difference between the images of the Feulgen-stained Malpighian tubule cell nuclei with a single or several chromocenters after *Msp* I and *Hpa* II treatments (Fig. 2a-h). However, some differences between these nuclei were observed in the distribution of values contained in the scatter plots of AAR on Sc% (Fig. 3).

In the nuclei containing a single chromocenter, *Msp* I treatment did not promote a change in the area covered by condensed chromatin relative to the nuclear area (Sc%) or in contrast between condensed and noncondensed chromatin (AAR) (Fig. 3, Table 1). Therefore, no significant amount of -CCGG-sequences excisable by *Msp* I was present in the heterochromatin and

euchromatin regions of these nuclei. However, the *Hpa* II treatment statistically altered the distribution of the points in the scatter diagrams: Sc% values increased simultaneously with the decrease of AAR, and the AAR values clustered in ~30% of the cell nuclei in the 2.-3. AAR interval (Fig. 3). These data suggest that, unlike the nuclear response to *Msp* I, a subset of the cellular population containing one single chromocenter underwent chromatin remodeling in response to the *Hpa* II treatment. Chromatin remodeling in this case consisted of a slight condensation of noncondensed chromatin, and probably occurred after the excision of their few -CCGG- sequences in close proximity to the chromocenter area, leading to a decrease in the contrast between condensed and noncondensed chromatin.

When nuclei with several chromocenters were treated with *Msp* I, a decrease in Sc% values that correlated with a slight shift of AAR to higher values was identified (Fig. 3, Table 1), suggesting that these nuclei contain *Msp* I-excisable -CCGG- sequences. The removal of the -CCGG- sequences induced a higher contrast between condensed and noncondensed chromatin probably because the frequency of these sequences, which is higher in noncondensed chromatin areas, makes noncondensed chromatin even more decondensed and decreases the relative participation of condensed chromatin in Sc% values. When nuclei containing several chromocenters were treated with *Hpa* II, part of the Sc% values increased but the AAR values were unaffected (Fig. 3, Table 1). Although this unusual increase in Sc% values is not conclusive alone, it suggests that the -CCGG- sequences were removed from part of the noncondensed chromatin. Unlike the aforementioned *Msp* I treatment, the *Hpa* II

treatment did not affect the contrast between condensed and noncondensed chromatin.

No information on DNA hypermethylation in these nuclei could be obtained from the *Msp* I/*Hpa* II restriction enzyme digestions.

3.3. AgNOR assay

A positive response to the AgNOR test was observed as black dots at the periphery of the chromocenters (Fig. 4 a-e) and sometimes extended between the heterochromatic bodies in multichromocentered nuclei (Fig. 4 b). The intensity of the AgNOR response varied even when the proximity of nuclei was accounted for (Fig. 4 a, c, e - arrows).

3.4. 5-methylcytidine immunofluorescence assay

5-methylcytidine signals were observed as bright green fluorescence and were present at some sites of the periphery of the heterochromatic bodies of single- (Fig. 5 a-c) and multichromocentered nuclei (Fig. 5 d-f) of *T. infestans*. In multichromocentered nuclei 5-methylcytidine signals were also observed in some nuclear points encircling non-heterochromatic nuclear areas (Fig. 5 d-f). As a positive material control, 5-methylcytidine signals were found to be homogeneously distributed in a maize somatic cell (Fig. 5 g-i).

3.5. Confocal microscopy

The sequence of nuclear images in Fig. 6 depicts multifocal planes of the fluorescent Feulgen-stained *T. infestans* epithelial cell single-chromocentered nuclei. The objective of this assay was to demonstrate that in single-chromocentered nuclei the heterochromatic body is not perfectly spherical, thus explaining the results contributed by euchromatin at the chromocenter edge as reported above (Fig. 5 a, c), and that could be otherwise misinterpreted as occurring in the heterochromatin. As expected, the contour of the same chromocenter can appear as round or half-moon shaped depending on the optical plan utilized (Fig. 6 e, c).

3.6. Cytidine demethylation assay

The unpackaging of heterochromatin, a phenomenon that was previously reported as a cellular survival response to stress factors in the Malpighian tubules of Triatomini (Mello et al., 1995, 2001), was observed under all tested conditions. However, the frequency of nuclei with heterochromatin unpackaging one and 48 h following the 5-AZA treatment exceeded the frequency observed in the untreated controls or in DMSO-treated nymphs. The unpackaging only partially affected the chromocenter area (Fig. 7 a-e) and subsequently reverted to a level similar to that of the controls (Table 2).

The frequency of necrosis (Fig. 7 e, f) in 5-AZA-treated nymphs increased only 48 h following treatment and was similar to the necrosis observed after an identical period of treatment with DMSO alone (Table 2). Because DMSO was the dilution medium used for 5-AZA, the increase in the frequency of necrosis was

likely a response to DMSO rather than to 5-AZA. This response may explain the decreased number of cell nuclei that were counted seven days after the DMSO or 5-AZA treatments (Table 2).

Nuclei with no apparent visual change in the chromocenter packing state after 5-AZA treatment were chosen at random to be analyzed by scanning microspectrophotometry. After a one-hour treatment with 5-AZA, the relative area covered by noncondensed chromatin decreased slightly (in comparison to treatment with DMSO), but it was not sufficient to change the contrast between condensed and noncondensed chromatin in the single- or multichromocentered nuclei (Table 3). However, after a 48-h treatment with 5-AZA both the relative area covered by noncondensed chromatin (euchromatin) and the contrast between condensed and noncondensed chromatin increased (in comparison to treatment with DMSO) (Table 3). This finding supports the previous immunoassay detection of methylated cytosine in the euchromatin encircling the chromocenters and other nuclear areas.

4. Discussion

The present results reveal AT-rich and GC-poor DNA in the chromocenters of single- and multichromocentered nuclei of Malpighian tubule epithelial cells of *T. infestans* based on both differential staining with DAPI/AMD and CMA₃/DA and on the Feulgen-DNA response after *Msp* I/*Hpa* II enzymatic treatments. These results support previous reports that demonstrated chromosome and interphase chromocenter decondensation in response to Hoechst 33258, a positive response

to Q- and C-banding in chromocenters (Mello and Recco-Pimentel, 1987), and DAPI-positive AT-rich DNA in the terminal blocks of the largest three autosomal pairs, the whole Y chromosome, and part of the X chromosome at spermatogonial metaphases of *T. infestans* (Bardella et al., 2010). The positive responses to DAPI/AMD and CMA₃/DA here reported also indicate the presence of both DNA AT and GC sequences in euchromatin.

Although the complete genome sequence of *T. infestans* is not yet available, sequences from the Internal Transcribed Spacer of the rDNA (ITS-2) of the nuclear rDNA in Triatomini species contain a base composition that is strongly A+T biased (76.7%) (Marcilla et al., 2001). In addition, it is possible to infer whether the genome of *T. infestans* is AT-rich by analyzing the sequences from a closely related species. The NCBI data banks contain 16284 sequences from cDNA libraries of *Rhodnius prolixus*, another important triatomine vector of the Chagas disease. Using the CAP3 program, these sequences were clustered into 2916 contigs (unique transcripts). The global mean GC content obtained for the whole set of 2916 contigs was 44.3% (SD = 6.1%), suggesting an overall balanced genome. However, because mutations at position 3 of the codon are often synonymous, AT-biased genomes show codons favoring an A or T at position 3. To obtain the % GC at each different position (% GC1, % GC2, % GC3), it was necessary to identify the coding regions in the transcript sequences. To accomplish this, the transcript sequences were compared with curated protein databases (swissprot) using the BLASTx program set with a threshold e-value of 1e-50. The high score pairing indicates that the coding frame, including the 5' start codon and

the 3' stop codon, can be defined without error. Using this methodology, we found 256 contigs in which the coding regions could be defined correctly. Table 4 summarizes the GC content for the 256 complete coding regions of *R. prolixus* in comparison with *A. pisum* (Sabater-Muñoz et al., 2006) and *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000). Note that the % GC at position 3 of the codons is low in the hemipterans *A. pisum* and *R. prolixus* (34.5% and 31.4%, respectively) when compared to the dipteran *D. melanogaster* (68.8%): this result indicates the presence of AT-biased coding sequences in the hemipterans *A. pisum* and *R. prolixus*. Given the natural history shared by *R. prolixus* and *T. infestans* and the available sequences of *T. infestans*, we may infer that *T. infestans* also shows AT-biased coding sequences. The prediction correlates with the results from the DAPI/AMD and CMA₃/DA differential staining and from the Feulgen-DNA response after *Msp* I/*Hpa* II enzymatic treatments discussed above. Nevertheless, AT-biased coding sequences are not inconsistent with the presence of GC-rich regions.

At the chromocenter edge of single- and multichromocentered nuclei, and in the interconnections of the chromocenters in the latter, the accumulation of argyrophylic proteins detected with the AgNOR test is in agreement with electron microscopy images that revealed nucleolar structures encircling the chromocenter areas in the Malpighian tubule cell nuclei of well-nourished *T. infestans* specimens (Mello et al., 1990). However, although the finding of NOR sites associated with CMA₃-positive GC-rich DNA has been reported for many different organisms (Mandrioli et al., 1999; Kuznetsova et al., 2003; Golub et al., 2004; Das and Khuda-Bukhsh, 2007), in the present case the CMA₃-positive GC-rich DNA

encircling the chromocenters could not be associated with NOR sites. According to Bardella and co-workers (2010), FISH assays using a 45S rDNA probe of *Drosophila melanogaster* show that the hybridization signal in a population of *T. infestans* males occurs only on X chromosome, “adjacent to an AT-rich DNA region”.

Because a variable AgNOR positive response was detected even in the nuclei of cells in close proximity to one another (probably nuclei of one single binucleate cell), the level of expression of the rDNA genes in the NOR sites is assumed to differ between different Malpighian tubule epithelial cells.

The results of the restriction enzyme digests indicate that the GC-rich DNA points, which were disseminated in the euchromatin or especially close to the chromocenter in single-chromocentered nuclei are more sensitive to digestion with *Hpa* II than *Msp* I. However, the GC-rich areas in the multichromocentered nuclei are equally sensitive to both *Msp* I and *Hpa* II enzymes, possibly because these areas are more accessible to the enzymes than are those in the single-chromocentered nuclei. The differential susceptibility to the restriction enzyme actions in whole nuclei may be affected by the diverse chromatin organization. Indeed, at the early phases of the insect post-embryonic development, only single-chromocentered nuclei are present in the *T. infestans* Malpighian tubules, but a nuclear phenotype diversification of condensed chromatin distribution occurs thereafter (Mello, 1971, 1978).

Although it is not mostly represented in the cell nuclei of the *T. infestans* Malpighian tubules, methylated cytidine was identified with immunodetection at

some points on the chromocenters' edges in single- and multichromocentered nuclei and in the euchromatin areas of multichromocentered nuclei. Confocal images of Feulgen-stained single-chromocentered nuclei that showed the irregularity of the heterochromatic body contour agree with the localization of 5-methylcytidine signals at the heterochromatin-euchromatin borderline.

The presence of DNA methylation that affected some of the chromatin points close to the chromocenters in the 5-methylcytidine immunodetection assay could not be confirmed with the *Msp I/Hpa II* assay. This finding was likely due to the lower sensitivity of the enzymatic assay compared to the immunological test for the detection of minute levels of –C^mCGG– sequences in whole *T. infestans* nuclei. The *Msp I/Hpa II* assay was useful for the detection of GC-rich DNA and/or –C^mCGG– sequences in chromosomes or whole nuclei where these sequences are very representative (Lima-de-Faria et al., 1980; Mello et al., 1996, 2009; Mampumbu and Mello, 2006).

The demethylation effect on 5-methylcytidine via 5-AZA led to a transient chromatin remodeling that affected only a small percentage of the nuclear population, and it resulted in a partially unpacked chromocenter. Because heterochromatin decondensation in Triatomini is usually a response to stress (starvation, heavy metals and heat-shock)(Mello, 1989; Mello et al., 1995, 2001; Campos et al., 2002), the effect of the 5-AZA demethylation was determined by quantifying the number of nuclei that displayed this phenotype above the baseline levels measured in the controls. Even for the nuclei that contained no visual change in the chromocenter packing state after a 48-h 5-AZA treatment, a slight

chromocenter unpackaging was detected with scanning microspectrophotometry and agrees with the presence of methylcytidine in the euchromatin bordering the chromocenters or other non-heterochromatin nuclear areas.

Considering that the partial unraveling of chromocenters by 5-AZA is due to cytidine demethylation but that the NOR region in *T. infestans* cells may be contained in AT-rich DNA regions of the X chromosome (Bardella et al., 2010), no change in 45S rDNA transcription is expected to occur with the 5-AZA treatment. The chromocenter decondensation in *T. infestans* specimens subjected to stress conditions is accompanied by accumulation of a cluster of perichromatin granules ~40-50 nm in diameter at the chromocenters' edge (Mello et al., 1990). A high amount of these granules along the chromocenter borders may reflect increased storage of mRNA or altered pre-mRNA processing (Malatesta et al., 2003).

5. Conclusions

AT-rich/GC-poor DNA occurs in single- and multichromocentered nuclei of the Malpighian tubules of *T. infestans* but it is predominantly located in their chromocenters.

The GC-rich DNA which appears in euchromatin, even that bordering some areas of the chromocenters, could not be associated with NOR regions. As argyrophylic proteins accumulate at chromocenter edges where the nucleolus has been previously demonstrated to be located, and 45S rDNA has been suggested by others to be present only in the X chromosome (Bardella et al., 2010), the NOR sites in this model may be associated with AT-rich DNA.

Although DNA methylation is an epigenetic modification implicated in transcription silencing in several cell types (Grewal and Moazed, 2003; Clouaire and Stancheva, 2008), it is not to be considered the main factor responsible for chromatin condensation in the chromocenters of *T. infestans*. This hypothesis is supported by recent reports for some other cell systems, although in these cases methylated DNA is present but not involved in chromatin compaction (Mampumbu and Mello, 2006; Gilbert et al., 2007).

Considering that epigenetic markers like histone modifications and histone-associated proteins (Allis et al., 2007; Skalnikova et al., 2007; Bartova et al., 2008) may be involved in chromatin condensation of chromocenters in *T. infestans*, immunoassays addressed to test this hypothesis are currently in progress.

Acknowledgments

This investigation was sponsored by the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq, grant no. 47303/2009-7) and the São Paulo State Research Foundation (FAPESP). EMA, JAM and MLSM received fellowships from CNPq (grants no. 132341/2010-7, 503702/2007-2 and 301943/2009-5, respectively).

The authors are indebted to Mr. João Neves and Mr. Eduardo de Souza Neto (Olympus Optical do Brasil Ltd., São Paulo) for helping with the capture of confocal microscopy images.

References

- Adams, M.D., + 94 authors, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D., Caparros, M.L., 2007. Epigenetics. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Andrade, L.M., Fernandes, R., Mondin, M., 2009. Immunodetection of methylcytosine in maize chromatin by a denaturing protocol. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 83, 39-40.
- Bardella, V.B., Gaeta, M.L., Vanzela, A.L.L., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2010. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Comp. Cytogenet.* 4, 141-149.
- Bartova, E., Krejci, J., Harnicarova, A., Galiova, G., Kozubek, S., 2008. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 711-721.
- Bianchi, N.O., Vidal-Rioja, L., Cleaver, J.E., 1986. Direct visualization of the sites of DNA methylation in human and mosquito chromosomes. *Chromosoma* 94, 362-366.
- Cabral-de-Mello, D.C., Moura, R.C., Carvalho, R., Souza, M.J., 2010. Cytogenetic analysis of two related *Deltochilum* (Coleoptera, Scarabaeidae) species: diploid number reduction, extensive heterochromatin addition and differentiation. *Micron* 41, 112-117.

- Campos, S.G.P., Rodrigues, V.L.C.C., Mello, M.L.S., 2002. Changes in nuclear phenotype frequencies following sequential cold shocks in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 857-864.
- Chaves, R., Heslop-Harrison, J.S., Guedes-Pinto, H., 2000. Centromeric heterochromatin in the cattle rob (1; 29) translocation: α -satellite I sequences, *in situ* Msp I digestion patterns, chromomycin staining and C-bands. Chromosome Res. 8, 621-626.
- Clouaire, T., Stancheva, I., 2008. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? Cell. Mol. Life Sci. 65, 1509-1522.
- Cremer, T., Cremer, C., 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. Nature Rev. Genet. 2, 292-301.
- Cremer, T., Kupper, K., Dietzel, S., Kakan, S., 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. Biol. Cell 96, 555-567.
- Das, J.K., Khuda-Bukhsh, A.R., 2007. GC-rich heterochromatin in silver stained nucleolar organizer regions (NORs) fluoresces with Chromomycin A(3) (CMA(3)) staining in three species of teleostean fishes (Pisces). Ind. J. Exp. Biol. 45, 413-418.
- Derenzini, M., Ploton, D., 1991. Interphase nuclear regions in cancer cells. Int. Rev. Exp. Path. 32, 149-192.

- Friebe, B., Endo, T.R., Gill, B.S., 1996. Chromosome-banding methods. In: K. Fukui and N. Shigeki (Eds), "Plant Chromosomes: Laboratory Methods". CRC Press, Boca Raton. p. 123-154.
- Gilbert, N., Gilchrist, S., Bickmore, W.A., 2005. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int. Rev. Cytol.* 242, 283-336.
- Gilbert, N., Thomson, I., Boyle, S., Allan, J., Ramsahoye, B., Bickmore, W.A., 2007. DNA methylation affects nuclear organization, histone modifications, and linker histone binding but not chromatin compaction. *J. Cell Biol.* 177, 401-411.
- Golub, N.V., Nokkala, S., Kuznetsova, V.G., 2004. Holocentric chromosomes of psocids (Insecta, Psocoptera) analysed by C-banding, silver impregnation and sequence specific fluorochromes CMA(3) and DAPI. *Folia Biol. – Krakow* 52, 143-149.
- Gonsálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Goyanes, V.L., Buño, I., 1995. Digital image analysis of chromatin fibre phenotype after "in situ" digestion with restriction endonucleases. *Cell Biol. Int.* 19, 827-832.
- Grewal, S.I., Moazed, D., 2003. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798-802.
- Hirai, H. Shono, Y., Arias, A.R., Tada, I., 1991. Constitutive heterochromatin polymorphism of a *Triatoma infestans* strain, a main vector insect of Chagas' disease. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 42, 301-303.

- Jiang, Z., Li, X., Hu, J., Zhou, W., Jiang, Y., Li, G., Lu, D., 2006. Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of LATS1 and LATS2 in human astrocytoma. *Neurosci. Res.* 56, 450–458.
- Joffe, B., Leonhardt, H., Solovei, I., 2010. Differential and large scale spatial organization of the genome. *Curr. Op. Genet. Dev.* 20, 562-569.
- Kuznetsova, V.G., Maryanska-Nadachowska, A., Nokkala, S., 2003. A new approach to the Auchenorrhyncha (Hemiptera, Insecta) cytogenetics: chromosomes of the meadow spittle bug *Philaenus spumarius* (L.) examined using various chromosome banding techniques. *Folia Biologica* 51, 33-40.
- Lima-de-Faria, A., Isaksson, M., Olsson, E., 1980. Action of restriction endonucleases on the DNA and chromosomes of *Muntiacus muntjak*. *Hereditas* 92, 267-273.
- Liu, J., Benbrahim-Tallaa, L., Qian, X., Yu, L., Xie, Y., Boos, J., Qu, W., Waalkes, M.P., 2006. Further studies on aberrant gene expression associated with arsenic-induced malignant transformation in rat liver TRL1215 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 407-415.
- Malatesta, M., Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Caporaloni, C., Fakan, S., Gazzanelli, G., 2003. Altered RNA structural constituents in aging and vitamin E deficiency. *Mech. Ageing Dev.* 124, 175-181.
- Mampumbu, A.R., Mello, M.L.S., 2006. DNA methylation in stingless bees with low and high heterochromatin contents as assessed by restriction enzyme digestion and image analysis. *Cytometry Part A* 69, 986-991.

- Mandrioli, M., Bizzaro, D., Manicardi, G.C., Gionghi, D., Bassoli, L., Bianchi, U., 1999. Cytogenetic and molecular characterization of a highly repeated DNA sequence in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Chromosoma* 108, 436-442.
- Marcilla, A., Bargues, M.D., Ramsey, J.M., Magallon-Gastelum, E., Salazar-Schettino, P.M., Abad-Franch, F., Dujardin, J.P., Schofield, C.J., Mas-Coma, S., 2001. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol. Phylogen. Evol.* 18, 136-142.
- Mello, M.L.S., 1971. Nuclear behavior in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans*. *Cytologia* 36, 42-49.
- Mello, M.L.S., 1975. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Rev. Brasil. Pesq. Méd. Biol.* 8, 101-107.
- Mello, M.L.S., 1978. Computer analysis of stained chromatin on Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). *Mikroskopie* 34, 285-299.
- Mello, M.L.S., 1979. Patterns of lability towards acid hydrolysis in heterochromatins and euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. *Cell. Mol. Biol.* 24, 1-16.
- Mello, M.L.S., 1989. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. Brasil. Genét.* 12, 485-498.

- Mello, M.L.S., Recco-Pimentel, S.M., 1987. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocenters of the Malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. *Cytobios* 52, 175-184.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 1978. A reação de Feulgen. *Ciênc. Cult.* 30, 665-676.
- Mello, M.L.S., Aldrovani, M., Moraes, A.S., Guaraldo, A.M.A., Vidal, B.C., 2009. DNA content, chromatin supraorganization, nuclear glycoproteins and RNA amounts in hepatocytes of mice expressing insulin-dependent diabetes. *Micron* 40, 577-585.
- Mello, M.L.S., Chambers, A.F., Vidal, B.C., Planding, W., Schenck, U., 2000. Restriction enzyme analysis of DNA methylation in “condensed” chromatin of Ha-*ras*-transformed NIH 3T3 cells. *Anal. Cell. Pathol.* 20, 163-171.
- Mello, M.L.S., Dolder, H., Dias, C.A., 1990. Nuclear ultrastructure of Malpighian tubule cells in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) under conditions of full nourishment and starvation. *Rev. Brasil. Genét.* 13, 5-17.
- Mello, M.L.S., Kubrusly, F.S., Randi, M.A.F., Rodrigues, V.L.C.C., Ferraz-Filho, A.N., 1995. Effect of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. *Entom. Exp. Appl.* 74, 209-218.
- Mello, M.L.S., Russo, P., Russo, J., Vidal, B.C., 2009. Entropy of Feulgen-stained 17- β -estradiol-transformed human breast epithelial cells as assessed by restriction enzymes and image analysis. *Oncol. Rep.* 21, 1483-1487.
- Mello, M.L.S., Tavares, M.C.H., Dantas, M.M., Rodrigues, V.L.C.C., Maria-Engler, S.S., Campos, S.P., Garcia, N.L., 2001. Cell death and survival alterations in

- Malpighian tubules of *Triatoma infestans* following heat shock. *Biochem. Cell Biol.* 79, 709-717.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., Planding, W., Schenck, U., 1994. Image analysis: video system adequacy for the assortment of nuclear phenotypes based on chromatin texture evaluation. *Acta Histochem. Cytochem.* 27, 23-31.
- Morielle-Souza, A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2007. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization. *Genet. Mol. Res.* 6, 713-720.
- Panzer, F., Dujardin, J.P., Nicolini, P., Caraccio, M.N., Rose, V., Tellez, T., Bermudez, H., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., O'Connor, J.E., Perez, R., 2004. Genomic changes of Chagas' disease vector, South America. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 438-446.
- Panzer, F., Ferrandis, I., Ramsey, J., Salazar-Schettino, P.M., Cabrera, M., Monroy, C., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., O'Connor, J.E., Angulo, V.M., Jaramillo, N., Perez, R., 2007. Genome size determination in Chagas disease transmitting bugs (Hemiptera - Triatominae) by flow cytometry. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 516-521.
- Panzer, F., Perez, R., Panzer, Y., Ferrandis, I., Ferreiro, M.J., Calleros, L., 2010. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogen. Genome Res.* 128, 77-87.
- Pardo, M.C., Viseras, E., Cabrero, J., Camacho, J.P.M., 1993. A supernumerary chromosome segment in *Locusta migratoria*. *Genome* 36, 919-923.

- Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F., Adnet, J.J.,
1986. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic
proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.*
18, 5-14.
- Rippe, K., 2007. Dynamic organization of the cell nucleus. *Curr. Op. Genet. Dev.*
17, 373-380.
- Sabater-Muñoz, B., Legeai, F., Risper, C., Bonhomme, J., Dearden, P., Dossat, C.,
Duclert, A., Gauthier, J.P., Ducray, D.G., Hunter, W., Dang, P.,
Kambhampati, S., Martinez-Torres, D., Cortes, T., Moya, A., Nakabachi, A.,
Philippe, C., Prunier-Leterme, N., Rahbe, Y., Simon, J.C., Stern, D.L.,
Wincker, P., Tagu, D., 2006. Large-scale gene discovery in the pea aphid
Acyrtosiphon pisum (Hemiptera). *Genome Biol.* 7, R21.
- Saccone S., Federico C., Bernardi G., 2002. Localization of the gene-richest and
the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds.
Gene 300, 169–178.
- Schreiber, G., Bogliolo, A.R., Pinto, A.C., 1972. Cytogenetics of Triatominae:
caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes.
Braz. J. Biol. 32, 255-263.
- Schweizer, D., 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin
and DAPI. *Chromosoma* 58, 307-324.
- Segura, E.L., Torres, A.G., Fusco, O., Garcia, B.A., 2009. Mitochondrial 16S DNA
variation in populations of *Triatoma infestans* from Argentina. *Med. Vet.*
Entom. 23, 34-40.

- Sentis, C., Santos, J., Fernández-Piqueras, J., 1989. Breaking up the chromosomes of *Baetica ustulata* by *in situ* treatments with restriction endonucleases. *Genome* 32, 208-215.
- Skalnikova, M., Bartova, E., Ulman, V., Matula, P., Svoboda, D., Hranicarova, A., Kozubek, M., Kozubek, S., 2007. Distinct patterns of histone methylations and acetylation in human interphase nuclei. *Physiol. Res.* 56, 797-806.
- Solari, J., 1979. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 72, 225-240.
- Tajbakhsh, J., Luz, H., Bornfleth, H., Lampel, S., Cremer, C., Lichter, P., 2000. Spatial distribution of GC- and AT-rich DNA sequences within human chromosome territories. *Experim. Cell Res.* 255, 229–237.
- Vidal, B.C., 1984. Polyploidy and nuclear phenotypes in salivary glands of the rat. *Biol. Cell* 50, 137-146.
- Vidal, B.C., Planding, W., Mello, M.L.S., Schenck, U., 1994. Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells by high-resolution image cytometry. *Anal. Cell. Pathol.* 7, 27-41.
- Vidal, B.C., Schlüter, G., Moore, G.W., 1973. Cell nucleus pattern recognition: influence of staining. *Acta Cytol.* 17, 510-521.
- Zhang, W.L., Wang, X., Yu, Q., Ming, R., Jiang, J., 2008. DNA methylation and heterochromatinization in the male-specific region of the primitive Y chromosome of papaya. *Genome Res.* 18, 1938–1943.

Table 1. Comparison of the effects of the restriction enzymes *Msp* I and *Hpa* II on Sc% and AAR values for Feulgen-stained Malpighian tubule cell nuclei of *T. infestans*.

Treatments	Nuclear phenotypes											
	One chromocenter						Several chromocenters					
	Sc%			AAR			Sc%			AAR		
X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	
<i>Msp</i> I buffer (control)	5.97	3.76	5.24 ^a	3.86	0.79	3.71 ^a	6.79	5.24	5.21 ^a	3.05	0.54	2.99 ^a
<i>Msp</i> I	7.31	5.25	5.21 ^a	3.72	0.96	3.64 ^a	5.46	5.35	4.06 ^b	3.55	0.82	3.51 ^b
<i>Hpa</i> II buffer (control)	4.40	2.59	3.70 ^A	3.99	0.60	4.00 ^A	3.63	3.15	2.82 ^A	3.75	0.62	3.76 ^A
<i>Hpa</i> II	5.64	3.05	4.99 ^B	3.60	1.03	3.55 ^B	4.50	3.94	3.45 ^B	3.76	0.67	3.68 ^A

AAR, average absorption ratio; Md, median; S, standard deviation; Sc%, area covered with condensed chromatin relative to the nuclear area; X, arithmetic mean. Different letters in the same column indicate differences that were significant at $P_{0.05}$ (Mann-Whitney test); minor letters (a,b) refer to *Msp* I data and major letters (A, B) refer to *Hpa* II data.

Table 2: Nuclei with heterochromatin decondensation and cell necrosis in Malpighian tubules of *T. infestans* subjected to treatment for cytidine demethylation.

Injected drugs	Time after injection (h)	n	Range of total no. of cell nuclei	Range of frequencies (%)	
				HD	NE
Untreated control	-	3	9553 - 11971	3.19 - 6.74	6.36 - 8.06
DMSO	1	3	8308 - 11862	3.94 - 6.92	3.37 - 8.41
	24	3	9000 - 11030	1.78 - 3.29	4.42 - 10.14
	48	3	9781 - 13432	3.98 - 4.99	11.01 - 14.12
	168	3	8760 - 9769	3.22 - 4.40	5.48 - 11.76
	5-AZA/DMSO	1	5	8165 - 10245	3.76 - 10.48
5-AZA/DMSO	24	3	9870 - 12187	3.50 - 7.38	5.45 - 8.25
	48	3	10838 - 11520	6.10 - 9.64	10.42 - 12.92
	168	2	8845 - 10944	4.64 - 5.56	6.74 - 7.50

5-AZA, 5-aza-2'-deoxycytidine; HD, heterochromatin decondensation; NE, necrosis.

Table 3. Effect of cytidine demethylation on the euchromatin area relative to the nuclear area and on AAR values as assessed by microspectrofotometry for Feulgen-stained Malpighian tubule cell nuclei of *T. infestans*.

Experimental conditions	Single-chromocentered nuclei						Multichromocentered nuclei					
	S _{NC} %			AAR			S _{NC} %			AAR		
	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md
No treatment	97.67	1.56	97.91 ^a	4.49	0.79	4.55 ^a	98.31	1.30	98.58 ^a	3.66	1.35	3.87 ^a
DMSO – 1 h	98.22	2.05	99.20 ^b	3.99	1.01	4.18 ^b	98.61	1.42	99.22 ^a	3.79	1.65	4.29 ^a
5-AZA/DMSO – 1 h	97.02	2.34	97.42 ^{a, c}	4.44	0.80	4.32 ^{a, b}	97.39	2.33	97.99 ^b	4.40	0.57	4.49 ^a
DMSO – 48 h	93.02	2.70	93.55 ^d	3.62	0.61	3.53 ^c	94.11	2.84	93.97 ^c	3.30	0.62	3.17 ^b
5-AZA/DMSO – 48 h	95.05	2.32	95.95 ^e	4.04	0.58	4.03 ^{b, d}	95.58	2.10	95.77 ^d	3.62	0.40	3.72 ^c

5-AZA, 5-aza-2'-deoxycytidine; AAR, average absorption ratio; DMSO, dimethylsulfoxide; Md, median; n (number of cell nuclei), 45; S, standard deviation; S_{NC}%, euchromatin area relative to the nuclear area; X, arithmetic mean. Different letters in the same column indicate differences that were significant at P_{0.05} (Mann-Whitney test).

Table 4. Base composition (% GC) at different codon positions (1, 2 and 3) for reconstructed coding sequences of *Rhodnius prolixus* in comparison to the only species of hemipterans with a completely sequenced genome, *Acyrtosiphon pisum* (Sabater-Muñoz et al., 2006), and to the model dipteran *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000).

Species	Coding % GC	% GC 1		% GC 2		% GC 3	
	Mean	X	S	X	S	X	S
<i>R. prolixus</i>	39.3	48.6	6.7	37.9	5.0	31.4	7.8
<i>A. pisum</i>	37.3	47.4	6.6	37.0	7.2	34.5	14.2
<i>D. melanogaster</i>	53.9	56.4	4.6	39.8	5.7	68.8	9.0

X, arithmetic mean, S, standard deviation

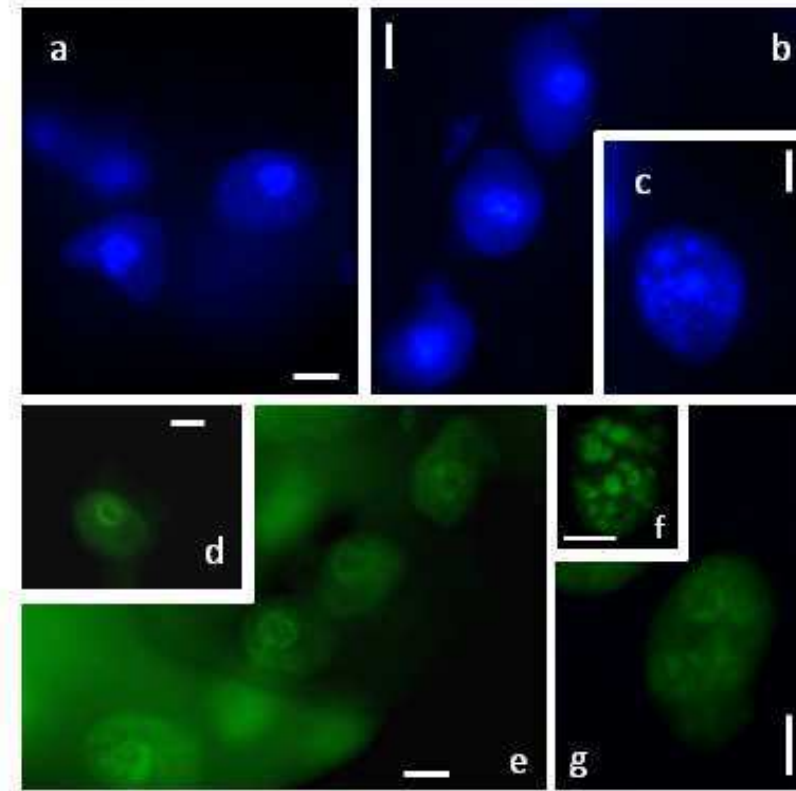


Fig. 1. Malpighian tubule cell nuclei of *T. infestans* with one (a, b, d, e) and several chromocenters (c, f, g) after staining with DAPI/AMD (a-c) and CMA₃/DA (d-g).

Bars, 10 μm.

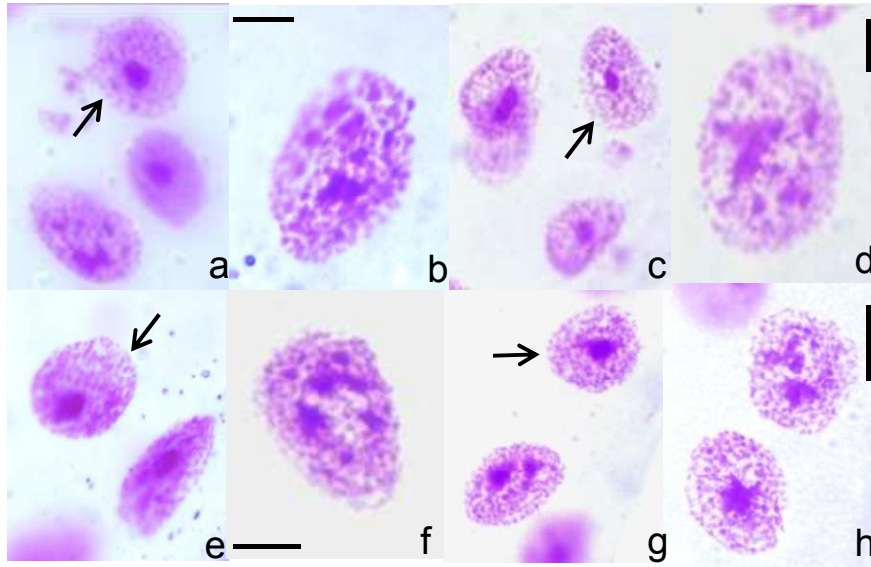


Fig. 2. Feulgen-stained Malpighian tubule cell nuclei of *T. infestans* with one (a, c, e, g – arrows) or several chromocenters (a, b, d, f-h) after treatment with *Msp* I (e, f) or *Hpa* II (g, h). Untreated controls: a-d. Bars, 10 μ m.

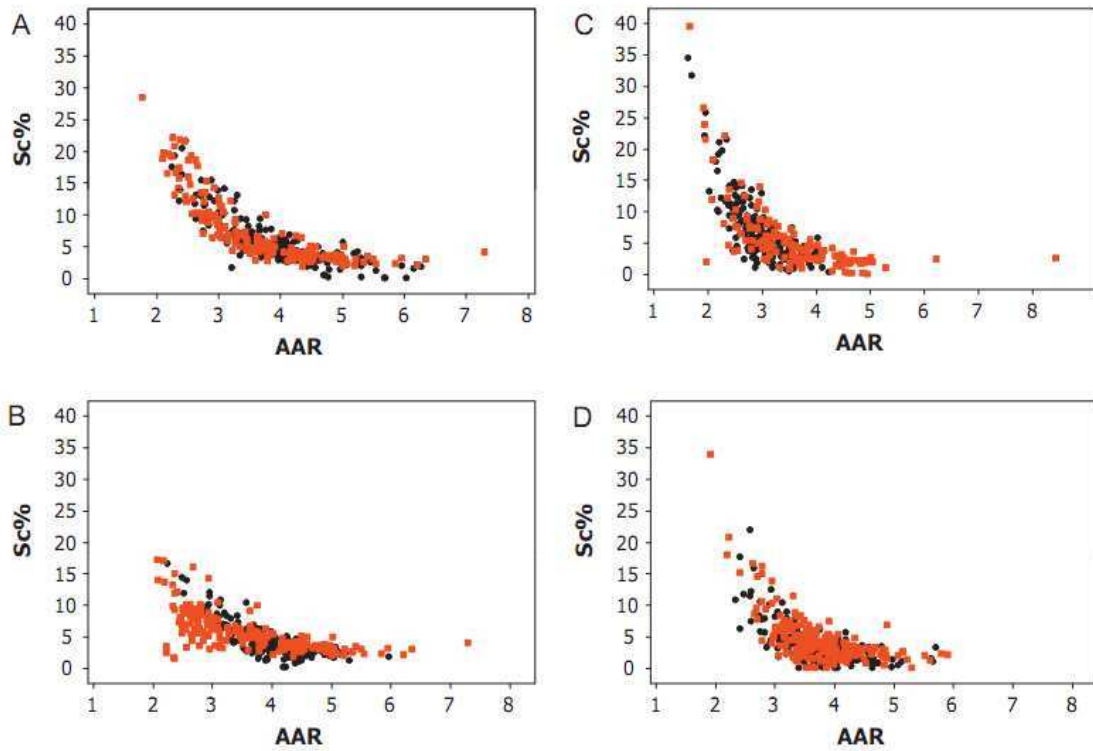


Fig. 3. Scatter diagrams of Sc% vs AAR for Feulgen-stained Malpighian tubule cell nuclei of *T. infestans* with one (A, B) and several chromocenters (C, D) after treatment with *Msp* I (A, C) and *Hpa* II (B, D) (red dots). Untreated controls are represented as black dots. n, 200.

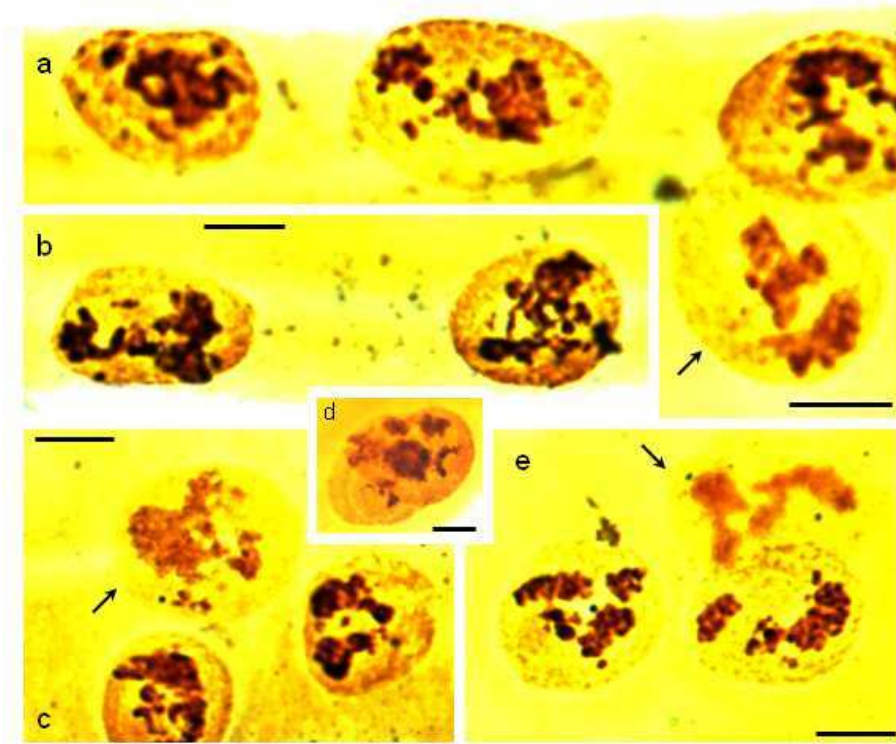


Fig. 4. AgNOR positive response (black dots) in the periphery of or extending between heterochromatic bodies in cell nuclei of *T. infestans* (a-e). The arrows (a, c, e) indicate weaker or absent positivity to the test. Bars, 10 μm.

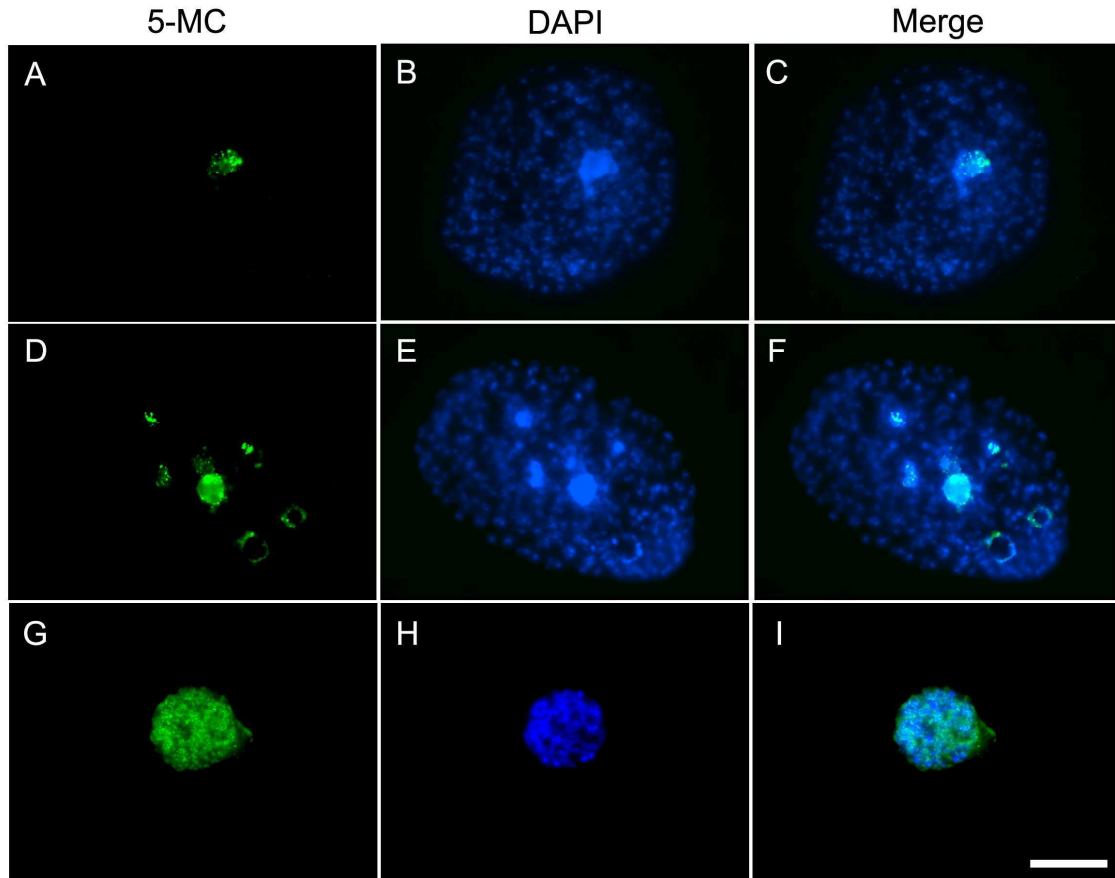


Fig. 5. Cytological detection of green fluorescent 5-methylcytidine signals (a, c, d, f) in cell nuclei of *T. infestans* counterstained with DAPI (b, e). Images of a similarly treated early prophase nucleus of a maize root meristem cell are presented as a positive material control (g-i). Bars, 10 μm .

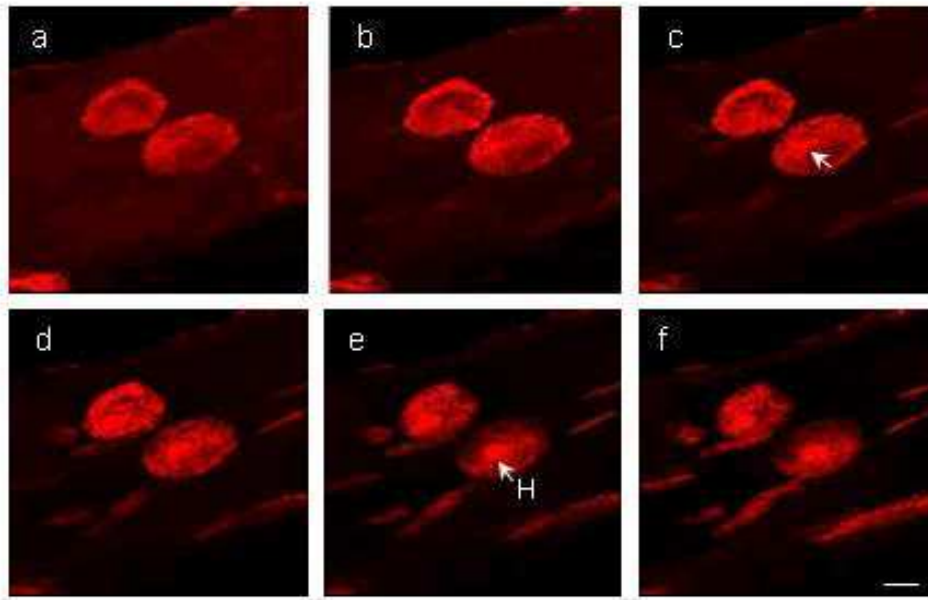


Fig. 6. Sequence of nuclear images (a-f) in fluorescent Feulgen-stained Malpighian tubule epithelial cells of *T. infestans* in multifocal planes obtained with confocal microscopy. The heterochromatic body (H) of one single-chromocentered nucleus while revealing a round contour in the optical section e shows a moon-shaped contour in section c. Bar, 10 μ m.

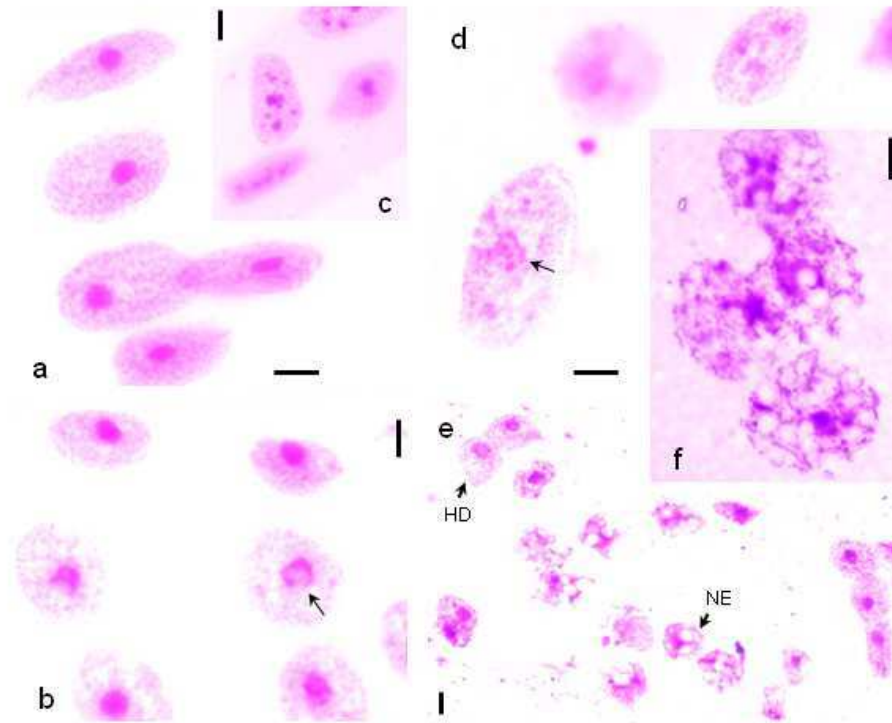


Fig. 7. Feulgen-stained Malpighian tubule cell nuclei of *T. infestans* after treatment with 5-AZA. Nuclear phenotypic changes showing partial heterochromatin unpackaging in single- (b, arrow; e, HD) and multichromocentered (d, arrow) nuclei and necrosis (e, f – NE) are indicated. a, c: normal control nuclei. Bars, 10 μ m.

Capítulo II

Artigo: Contribution of AT-, GC-, and methylated cytidine-rich DNA to chromatin composition in Malpighian tubule cell nuclei of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae). Artigo submetido à Acta Histochemica.

Contribution of AT-, GC-, and methylated cytidine-rich DNA to chromatin composition in Malpighian tubule cell nuclei of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae)

Elenice M. Alvarenga^a, Mateus Mondin^b, Vera L. C. C. Rodrigues^c, Larissa M. Andrade^b, Benedicto de Campos Vidal^a, Maria Luiza S. Mello^{a*}

^a*Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brazil*

^b*Department of Genetics, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture-ESALQ, University of São Paulo (USP), 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil*

^c*SUCEN, 13840-000, Mogi-Guaçu, SP, Brazil*

*Corresponding author. Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-862 Campinas, Brazil.

E-mail address: mlsmello@unicamp.br; Tel.: +55 19 3521 6122; fax: +55 19 3521 6185

Running title: Chromatin composition in *Panstrongylus megistus*

Summary

The Malpighian tubule cell nuclei of male *Panstrongylus megistus*, a vector of Chagas disease, contain one chromocenter, which is composed solely of the Y chromosome. Considering that different chromosomes contribute to the composition of chromocenters in different triatomini species, the aim of this study was to determine the contribution of AT-, GC-, and methylated cytidine-rich DNA in chromocenter as well as in euchromatin of Malpighian tubule cell nuclei of *P. megistus* in comparison with published data for *Triatoma infestans*. Staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole/actinomycin D and chromomycin A₃/distamycin, immunodetection of 5-methylcytidine and AgNOR test were used. The results revealed AT-rich/GC-poor DNA in the male chromocenter but equally distributed AT and GC DNA sequences in male and female euchromatin, like in *T. infestans*. Accumulation of argyrophilic proteins encircling the chromocenter not always correlated with that of GC-rich DNA. Methylated DNA identified by immunodetection was found sparsely distributed in the euchromatin of both sexes and at some points around the chromocenter edge, but it could not be considered responsible for chromatin condensation in the chromocenter, like in *T. infestans*. However, unlike in *T. infestans*, no correlation between the chromocenter AT-rich DNA and nucleolus organizing region (NOR) DNA was found in *P. megistus*.

Key words: *P. megistus*, heterochromatin, DNA, epigenetics, fluorescence microscopy, AgNOR

Introduction

Panstrongylus megistus is a blood-sucking hemipteran reduviid that is considered to be the principal vector of Chagas disease in the eastern, southern and some northeastern states of Brazil (Barbosa et al., 2001). It has 18 autosomes and multiple sex chromosomes (X_1X_2Y in males and $X_1X_1X_2X_2$ in females) (Schreiber and Pellegrino, 1950; Crossa et al., 2002). As in many other insect species, most organs of *P. megistus*, including the Malpighian tubules, grow by endopolyploidy, during post-embryonic development (Mello, 1975). In fully-nourished, unstressed specimens of *P. megistus*, the Malpighian tubules contain approximately 18,000 nuclei (Mello et al., 1986). In male specimens all these nuclei display a small heterochromatic body which constitutes a chromocenter (Fig. 1a,b) (Mello et al., 1986). Under stress conditions, some of the cells may undergo necrosis, apoptosis, nuclear fusion and/or heterochromatin unraveling, which affect the chromocenter organization (Garcia et al., 2000a,b). In single-chromocentered cells of *T. infestans*, another well-known vector of Chagas disease, the heterochromatic body contains contributions from several autosomes and the sex chromosomes (Schreiber et al., 1972). By contrast, the chromocenter of *P. megistus* is much smaller and is assumed to comprise only the Y chromosome, as this nuclear body has not been recognized or described in the somatic cells of female specimens (Fig. 1c) (Mello et al., 1986).

Knowledge of the composition of chromatin elements and epigenetic markers as well as their spatial distribution is particularly of interest in cellular models where differences in heterochromatin structures contribute to the definition of specific nuclear phenotypes. The spatial distribution of chromatin components is considered to play a part in the regulation of nuclear and cellular processes (Gilbert et al., 2005; Schneider and Grosschedl, 2007; Joffe et al., 2010; Rouquette et al., 2010; Stein et al., 2010; Cremer and Zakhartchenko, 2011). Chromatin organization has been demonstrated to involve a non-random distribution of chromatin elements in different mammalian species (Cremer and Cremer, 2011), but there is no information on this subject for reduviid hemipterans, except for the distribution of AT- and GC-rich DNA as well as methylated DNA in chromatin compartments of *T. infestans* (Alvarenga et al., 2011).

Although the sequencing of whole genomes of hemipteran reduviids is not yet available, there are data that indicate an AT-biased DNA in *T. infestans* (Marcilla et al., 2001; Mas-Coma and BARGUES, 2009; Segura et al., 2009; Alvarenga et al., 2011). This observation is especially valid for the heterochromatin in single- or multichromocentered nuclei, although topochemical and immunochemical tests have identified some GC-rich DNA at the edges of the chromocenters that contact the nucleolus and in the euchromatin of the Malpighian tubule cell nuclei of this species (Alvarenga et al., 2011).

Despite the fact of a relatively close phylogenetic relationship between *P. megistus* and *T. infestans* (Stothard et al., 1998; Garcia et al., 2001; Marcilla et al., 2001; Crossa et al., 2002; Maranhão, 2008), they differ drastically in their

chromosome contributions to chromocenter composition. These models are therefore important for the investigation of the nature of the chromocenter and the roles of enrichment for specific DNA nucleotides and DNA methylation in chromatin territories, a step that necessarily precedes any studies on protein epigenetic markers in these models.

In this study, we have investigated the distribution of AT- and GC-rich DNA in various chromatin regions of the Malpighian tubule polyploid cell nuclei of *P. megistus* specimens with or without a chromocenter (males and females, respectively) and have compared these results with previously described data for *T. infestans*.

Materials and methods

Insects and cell preparations

Fifth instar male and female nymphs of a domestic population of *Panstrongylus megistus* (Burmeister) (Hemiptera, Reduviidae) reared at 28°C and 80% relative humidity, under a short light regime, and fed hen's blood once a week in the laboratory at SUCEN (Mogi-Guaçu, SP) were used. The domiciliary specimens of *P. megistus* reared at SUCEN originated from natural populations in the lower slopes of the Serra da Mantiqueira in eastern São Paulo state (Caconde, Divinolândia, São Sebastião da Gramma, São João da Boa Vista) in Brazil (approximately between the latitudes 21°31'S and 21°58'S and close to the

longitude 46°40'W). The number of specimens used varied depending on the experimental assay.

Gently squashed whole mounts of Malpighian tubules were fixed in absolute ethanol-glacial acetic acid (3:1, v/v) for one min, rinsed in 70% ethanol for up to five min and air-dried.

DAPI/CMA₃ differential stainings

The fixed preparations were kept in the freezer for two weeks before staining. Some of the squashes (n = 10 for each sex) were treated with 2 µg/ml DAPI (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 30 min. Of these samples, some were treated with 0.2 mg/mL actinomycin D (AMD) (Sigma) for 15 min in the dark, while others were left untreated. Another set of preparations (n = 5 for each sex) was treated with 0.5 mg/mL CMA₃ (Sigma) for 3 h in the dark. In still other preparations (n = 5 for each sex) CMA₃ staining was followed by treatment with 0.2 mg/mL distamycin (Sigma) for 10 min in the dark (Schweizer, 1976; Friebe et al., 1996). After staining, all preparations were rinsed in distilled water, air dried in the dark, mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and examined 15 days later under a Zeiss Axiophot 2 microscope (Oberkochen, Germany) equipped for epifluorescence and using a Zeiss AxioCam HRc color video camera. At least 200 cells from each specimen were examined.

Similarly treated Malpighian tubules of *Triatoma infestans* were used for comparison.

Immunoassay for 5-methylcytidine

Malpighian tubule preparations from five specimens of each sex were heated at 60°C for 30 min, postfixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.0) for 5 min, dehydrated in 70%, 96% and 100% ethanol, and air dried. The squashes were then treated with 70% formamide in 2x SSC solution for 3 min at 75°C followed by cold absolute ethanol. Next, the preparations were treated with 1% bovine serum albumin (BSA) in 1x phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at 37°C to prevent nonspecific protein reactions. The preparations were then incubated overnight with sheep anti-5-methyl-cytidine (Abcam, Cambridge, MA, USA) diluted 1:200 in 1x PBS with 1% BSA, followed by a 90-min treatment with rabbit anti-sheep-FITC diluted 1:100 in 1x PBS with 1% BSA (Zhang et al., 2008). Early prophase nuclei of the maize root meristem, in which 5-methylcytosine is distributed homogeneously (Andrade et al., 2009), were used as a positive control. The preparations were mounted in DAPI (200 µg/mL)-containing Vectashield and examined under a Zeiss Axiophot 2 microscope equipped for fluorescence.

AgNOR test

Ethanol-acetic acid-fixed Malpighian tubules from eight male specimens and 10 female specimens were subjected to AgNOR staining as described by Ploton et al. (1986), Derenzini and Ploton (1991) and Mello et al. (2008). Briefly, the tubules were treated with a solution containing 2 volumes of 50% aqueous silver nitrate (Merck, Darmstadt, Germany) and 1 volume of 2% gelatin in 1% aqueous formic acid (v/v) for 20 min at 37°C, rinsed in deionized water, air dried, cleared in xylene

and mounted in Canada balsam. In order to provide a better cell and nucleus permeabilization, silver impregnation was preceded by treatment with a 1% Triton X-100 solution in the presence of 4 M glycerol for 15 min at 37°C (Vidal et al., 1994). Imprints of mouse hepatocytes also fixed in ethanol-acetic acid were used as a positive control of the reaction (Vidal et al., 1994).

The analysis was performed in a Zeiss Axiophot 2 microscope and images were captured using a Zeiss AxioCam HRc color video camera.

Results

DAPI/CMA₃ fluorochrome differential stainings

A positive affinity for DAPI or DAPI/AMD was found in the euchromatin and the chromocenter of the Malpighian tubule epithelial cells of *P. megistus* (Fig. 2b). However, in all cell nuclei examined, the affinity for DAPI, indicating the presence of AT-rich DNA, was much more intense in the chromocenter (Fig. 2b), resembling findings in *T. infestans* control cells (Fig. 2a). The image of the chromocenter visualized by DAPI staining in *P. megistus* was consistent with images obtained using the Feulgen reaction (Fig. 1a,b).

A CMA₃-positive response even after DA treatment, indicative of GC-rich DNA, was evident in all cell nuclei examined, manifesting as either fine or coarse granules (Fig. 2d-h). In male cell nuclei, this response was observed only in the euchromatin (Fig. 2d-f). Images of the CMA₃-positive response showing a more intense ring of signal encircling the chromocenter (Fig. 2e,f), similar to that found in most Malpighian tubule cells in *T. infestans* (Fig. 2c) were observed in $\leq 5\%$ of the

male *P. megistus* cell nuclei examined (n, ~200 per specimen). However, there is no certainty that this proportion is maintained along the whole organ. Examination of a larger number of nuclei than the number used in this study is difficult due to the rapid fading of the CMA₃ fluorescence.

5-methylcytidine immunofluorescence assay

Bright green fluorescent 5-methylcytidine signals were found as small dots distributed throughout the euchromatin of the Malpighian tubule cells of male and female *P. megistus* nymphs (Fig.3A-F). In males, the signals appeared to be positioned on part of the chromocenter's edge (Fig3A-C). No direct correlation could be made between 5-methylcytidine signals and the chromocenter. In the maize somatic cell nuclei used as a positive control, intensely bright 5-methylcytidine signals were shown to be homogeneously distributed and the negative image of the nucleolus was evident (Fig. 3G-I).

Certain small irregularly shaped and sparsely distributed nuclear areas, especially in female specimens, were observed to respond negatively to both the 5-methylcytidine immunoassay and the DAPI staining (Fig. 3E, F). Similar findings have been observed in CMA₃/DA-stained female cell nuclei (Fig. 2g)

AgNOR assay

As a positive control of the reaction, differently sized mouse hepatocyte nuclei showed well known characteristic positive responses in their NORs (Fig. 4a). In male *P. megistus* specimens, a positive response to the AgNOR test was

detected at the periphery of the chromocenter and as coarse aggregates of granules extending from the chromocenter region to the periphery of the nuclei (Fig. 4b-d). In female specimens, the AgNOR positive response also generally occurred agglomerated on coarse structures (Fig. 4e). In males and females some nuclei were found which did not respond to the AgNOR assay (Fig. 4d) or appeared less intensely impregnated by the silver (Fig. 4f,g). The responses detected were observed in variable numbers of the analyzed samples, which does not justify accepting their mean value as representative of the whole organ's response to the AgNOR assay. In addition, examination of the total number of nuclei present in the Malpighian tubules of *P. megistus* (approximately ~18,000) by the AgNOR assay could not be performed as the discrimination of individualized nuclei in such a material is severely jeopardized by the elevated amount of black precipitates on the abundant urate spherulites (Mello and Vidal, 1985) that this tissue contains (Fig. 4b,c,g).

Discussion

Our results indicate that as a rule AT-rich and GC-poor DNA occurs in the chromocenter of male *P. megistus* nymphs, as it does in *T. infestans* chromocenters (Alvarenga et al., 2011), although the chromocenter size and the identities of the chromosomes which participate in the chromocenter differ between these species (Schreiber et al., 1972; Mello, 1971; Mello et al., 1986). In comparison to *T. infestans*, where three or four autosomal chromosome pairs and the X and Y chromosomes compose the chromocenters, which are thus detectable

in specimens of both sexes (Schreiber et al., 1972; Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira, 2007), the small chromocenter of *P. megistus* is detectable only in males, a fact that suggests that it is composed of the Y chromosome (Mello et al., 1986). Occurrence of heterochromatin in the Y chromosome of all species of Triatominae has been recently emphasized (Panzera et al., 2010).

The similarly intense DAPI/AMD affinity for DNA in the chromocenters of *P. megistus* and *T. infestans* is probably a consequence of their A+T-biased DNA composition, phylogenetic proximity (Stothard et al., 1998; Garcia et al., 2001; Marcilla et al., 2001; Maranhão, 2008), and chromatin condensation.

Although GC-rich DNA responsive to CMA₃/DA may contribute to the coarsely filamentous structures evident in the euchromatin of *P. megistus* and even encircle the chromocenter, recognizably methylated DNA is scarce and sparsely distributed in the euchromatin of interphase cells of this species. Sometimes, fluorescent signals associated with methylated DNA appear close to the chromocenter, giving the impression that they occurred partly inside this heterochromatic body. However, the fluorescent signals that identify 5-methylcytidine are not expected to occur inside the chromocenter of *P. megistus* because positive affinity for CMA₃/DA indicating the presence of GC-rich DNA has never been found inside this body but only around it. In conclusion, as has previously been found for *T. infestans* (Alvarenga et al., 2011), cytosine methylation does not appear to be involved in the maintenance of chromatin condensation in the chromocenter of *P. megistus*. To establish the role of epigenetic markers in chromatin condensation in *P. megistus*, it was necessary to

begin by analyzing DNA modification, a goal that was preliminarily reached in the present investigation. Further studies involving chromocenter removal by laser surgery from the highly polyploid cell nuclei of the Malpighian tubules of male *P. megistus*, followed by DNA analysis by PCR and restriction enzyme assays, will certainly reveal whether immunocytochemically undetectable cytosine methylation occurs in the DNA sequences of the chromocenter in these nuclei. However, current studies in our laboratory already suggest that histone modifications are linked to chromatin condensation in the chromocenter of *P. megistus* (manuscript in preparation).

Most of the nuclear areas that responded negatively to both DAPI and CMA₃ staining in *P. megistus* seem to be nucleolar zones because in male specimens of *P. megistus*, nucleolar structures have been identified by electron microscopy close to the chromocenter and extending from it to peripheral nuclear areas (Mello, 1987). In addition, part of the small round areas presenting DAPI- and/or CMA₃-negative results in *P. megistus*, and also in *T. infestans* (Alvarenga et al., 2011 – Fig. 5D-F), may represent sites of intranuclear vesicular inclusions which occur close to nucleolar elements in association with a very common RNA virus infection that has been reported for triatominae fed hen's blood in several laboratory facilities (Dolder and Mello, 1978a, b). Chromatin regions containing histone H3 gene clusters have also been reported to lack DAPI staining in mussel cells, a finding that was assumed to be due to a high degree of chromatin local decondensation (Pérez-García et al., 2010).

With regard to the results obtained with the AgNOR test in *P. megistus* interphase cell nuclei, it is worth mentioning that an intense AgNOR-positive response has often been related to GC-rich DNA in the NORs of several other organisms (Mandrioli et al., 1999; Kuznetsova et al., 2003; Golub et al., 2004; Das and Khuda-Bukhsh, 2007). However, in *T. infestans*, 45S rDNA has been associated only with an AT-rich DNA region of the X chromosome (Bardella et al., 2010), which makes up part of the chromocenters in interphase cells (Schreiber et al., 1972).

Although similar to the chromocenters of *T. infestans* in terms of their composition of AT-rich DNA and the surrounding GC-rich DNA, in the case of *P. megistus*, the chromocenter cannot simply be considered as containing the NOR for several reasons. First, in the highly polyploid epithelial cells of *P. megistus*, the chromocenter is assumed to contain several copies of the Y chromosome only (Mello et al., 1986). Second, FISH signals for a 28S-12kb rDNA probe of *Drosophila melanogaster* have been reported to be displayed by several chromosome regions in *P. megistus*, and NOR sites have been identified by silver staining in autosomes and in one sex chromosome which was not identified as Y, X₁ or X₂ (Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira, 2007). Indeed, female interphase cells of *P. megistus* do not display a chromocenter but contain a large nucleolus (data not shown) similar to that in male cells, and generally an intense AgNOR response spread along the cell nuclei. Images of the accumulation of argyrophilic proteins sometimes resemble images of the distribution of GC-rich DNA responsive to CMA₃/DA staining. In conclusion, although the establishment of FISH signals for

rDNA in clearly identified chromosomes and in chromatin of interphase somatic cells of *P. megistus* may still be required to correlate NORs with the spatial distribution of DNA of a specific composition in individual interphase cell nuclei, present findings are indicative that chromocenters may vary in their relationship with NORs in the Triatominae subfamily. These differences may result from distinctive evolutionary trends in which heterochromatin is the main source of karyological differentiation, as proposed by Panzera and co-workers (2010).

The negative or weak positive response to the AgNOR assay that was observed in some of the *P. megistus* nuclei examined in this study may be caused by a decrease in transcriptional activity preceding occasional necrosis, a phenomenon that has been observed under the influence of occasional stressing effects unintentionally induced in insects reared in the laboratory (Garcia et al., 2000b).

Acknowledgments

This investigation was sponsored by the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq, grant no. 47303/2009-7) and the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, grant no. 2010/50015-6). EMA and MLSM received fellowships from CNPq (grants no. 132341/2010-7 and 301943/2009-5, respectively). One of the authors (MLSM) is indebted to Dr. Luciana Bolsoni Morandini (Unicamp, Brazil) for valuable discussions on AT- and GC-rich DNA in chromosome banding.

References

- Alvarenga EM, Mondin M, Martins JA, Rodrigues VLCC, Vidal BC, Rincones J, Carazzolle MF, Andrade LM, Mello MLS. Spatial distribution of AT- and GC-rich DNA within interphase cell nuclei of *Triatoma infestans* Klug. *Micron* 2011; 42:568-578.
- Andrade LM, Fernandes R, Mondin M. Immunodetection of methylcytosine in maize chromatin by a denaturing protocol. *Maize Genet. Coop Newslett* 2009;83: 39-40.
- Barbosa SE, Soares RPP, Pires HHR, Diotaiuli L. Experimental evidence for a demographic cline in *Panstrongylus megistus* populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:773-775.
- Bardella VB, Gaeta ML, Vanzela AL., Azeredo-Oliveira MTV. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Comp Cytogenet* 2010;4:141-149.
- Cremer T, Cremer M. Chromosome territories. In: T. Misteli and D.L. Spector (Eds) "The Nucleus". Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2011; p. 93-114.
- Cremer T, Zakhartchenko V. Nuclear architecture in developmental biology and cell specialisation. *Repr Fert Dev* 2011;23:94-106.
- Crossa RP, Hernández M, Caraccio MN, Rose V, Valente SAS, Valente VC, Mejia JM, Angulo VM, Ramirez CMS, Roldán J, Vargas F, Wolff M, Panzera F.

- Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Infection Genet Evol* 2002;2:47-56.
- Das JK, Khuda-Bukhsh AR. GC-rich heterochromatin in silver stained nucleolar organizer regions (NORs) fluoresces with Chromomycin A (3) (CMA(3)) staining in three species of teleostean fishes (Pisces). *Indian J Exptl Biol* 2007;45:413-418.
- Derenzini M, Ploton D. Interphase nuclear regions in cancer cells. *Int Rev Exp Path* 1991;32:149–192.
- Dolder H, Mello MLS. Vesicular inclusions in the nuclei of epithelial cells of Malpighian tubes of the hemipteran, *Panstrongylus megistus*. *Experientia (Basel)* 1978a;34:794-795.
- Dolder H, Mello MLS. Virus-like particles in the Malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. *Cell Mol Biol* 1978b;23:299-310.
- Friebe B, Endo TR, Gill BS. Chromosome-banding methods. In: K. Fukui and N. Shigeki (Eds), "Plant Chromosomes: Laboratory Methods". Boca Raton: CRC Press, 1996; p. 123-154.
- Garcia BA, Moriyama EN, Powell JR. Mitochondrial DNA sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. *J Med Entom* 2001;38:675-683.
- Garcia SL, Mello MLS, Garcia NL, Rodrigues VLCC. Changes in nuclear phenotypes following cold shock in *Panstrongylus megistus* (Burmeister). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000a;95:893-898.

- Garcia SL, Mello MLS, Rodrigues VLCC, Garcia NL. Nuclear phenotype changes after heat shock in *Panstrongylus megistus* (Burmeister). Mem Inst Oswaldo Cruz 2000b;95:271-277.
- Gilbert N, Gilchrist S, Bickmore WA. Chromatin organization in the mammalian nucleus. Int Rev Cytol 2005;242:283-336.
- Golub NV, Nokkala S, Kuznetsova VG. Holocentric chromosomes of psocids (Insecta, Psocoptera) analysed by C-banding, silver impregnation and sequence specific fluorochromes CMA(3) and DAPI. Folia Biol (Krakow) 2004;52:143-149.
- Joffe B, Leonhardt H, Solovei I. Differentiation and large scale spatial organization of the genome. Curr Opin Genet Dev 2010;20:562-569.
- Kuznetsova VG, Maryanska-Nadachowska A, Nokkala S. A new approach to the Auchenorrhyncha (Hemiptera, Insecta) cytogenetics: chromosomes of the meadow spittle bug *Philaenus spumarius* (L.) examined using various chromosome banding techniques. Folia Biol (Krakow) 2003;51:33-40.
- Mandrioli M, Bizarro D, Manicardi GC, Gionghi D, Bassoli L, Bianchi U. Cytogenetic and molecular characterization of a highly repeated DNA sequence in the peach potato aphid *Myzus persicae*. Chromosoma 1999;21:436-442.
- Maranhão ACB. Proteoma e transcriptoma comparativo das glândulas salivares de barbeiros das espécies de *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius robustus* e *Panstrongylus megistus*. PhD's thesis, Brasilia: University of Brasília, 2008.

- Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogen Evol* 2001;18:136-142.
- Mas-Coma S, Bargues MD. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Tropica* 2009;110: 112-136.
- Mello MLS. Nuclear behavior in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans*. *Cytologia (Tokyo)* 1971;36:42-49.
- Mello MLS. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Rev Brasil Pesq Méd Biol* 1975;8:101-107.
- Mello MLS. Nucléolo: Estrutura, ultraestrutura e composição. In: B.C. Vidal and M.L.S. Mello (Eds) "Biologia Celular". Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1987; p. 183-195.
- Mello MLS, Vidal BC. Microspectrofluorimetry of the naturally fluorescent substances of the Malpighian tubules of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus*. *Acta Histochem Cytochem* 1985;18:365-373.
- Mello MLS, Randi MA, Giorgio S, Ferraz-Filho AN, Rodrigues VLCC, Rocha-e-Silva EO, Cordeiro JA. Number of chromosomes, Feulgen-DNA content and nuclear phenotypes in domestic and wild specimens of *Panstrongylus megistus*. *Ann Trop Med Parasitol* 1986;80:641-648.

- Mello MLS, Vidal BC, Russo J, Planding W, Schenck U. Image analysis of the AgNOR response in *ras*-transformed human breast epithelial cells. *Acta Histochem* 2008;110:210-216.
- Morielle-Souza A, Azeredo-Oliveira MTV. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization. *Genet Mol Res* 2007;6:713-720.
- Panzer F, Pérez R, Panzer Y, Ferrandis I, Ferreiro MJ, Calleros L. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogen Genome Res* 2010;128:77-87.
- Pérez-García C, Cambeiro JM, Morán P, Pasantes JJ. Chromosomal mapping of rDNAs, core histone genes and telomeric sequences in *Perumytilus purpuratus* (Bivalvia: Mytilidae). *J Exptl Mar Biol Ecol* 2010;395:199-205.
- Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem.J* 1986;18:5-14.
- Rouquette J, Cremer C, Cremer T, Fakan S. Functional nuclear architecture studied by microscopy: present and future. *Int Rev Cell Mol Biol* 2010;282:1-90.
- Schneider R, Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes & Dev* 2007;21:3027-3043.

- Schreiber G, Pellegrino J. Eteropicnosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici). *Sci Genet* 1950;3:215-226.
- Schreiber G, Bogliolo AR, Pinto AC. Cytogenetics of Triatominae: caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes. *Braz J Biol* 1972;32:255-263.
- Schweizer D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 1976;58:307-324.
- Segura EL, Torres AG, Fusco O, Garcia BA. Mitochondrial 16S DNA variation in populations of *Triatoma infestans* from Argentina. *Med Vet Entomol* 2009;23:34-40.
- Stein GS, van Wijnen AJ, Imbalzano AN, Montecino M, Zaidi SK, Lian JB, Nickerson JA, Stein JL. Architectural genetic and epigenetic control of regulatory networks: compartmentalizing machinery for transcription and chromatin remodeling in nuclear microenvironments. *Crit Rev Eukaryot Gene Express* 2010;20:149-155.
- Stothard JR, Yamamoto Y, Cherchi A, Garcia AL, Valente SAS, Schofield CJ, Miles M.A. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bull Entom Res* 1998;88:553-560.

Vidal BC, Planding W, Mello MLS, Schenck U. Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells by high-resolution image cytometry. *Anal Cell Pathol* 1994;7:27-41.

Zhang WL, Wang X, Yu Q, Ming R, Jiang J. DNA methylation and heterochromatinization in the male-specific region of the primitive Y chromosome of papaya. *Genome Res* 2008;18:1938–1943.

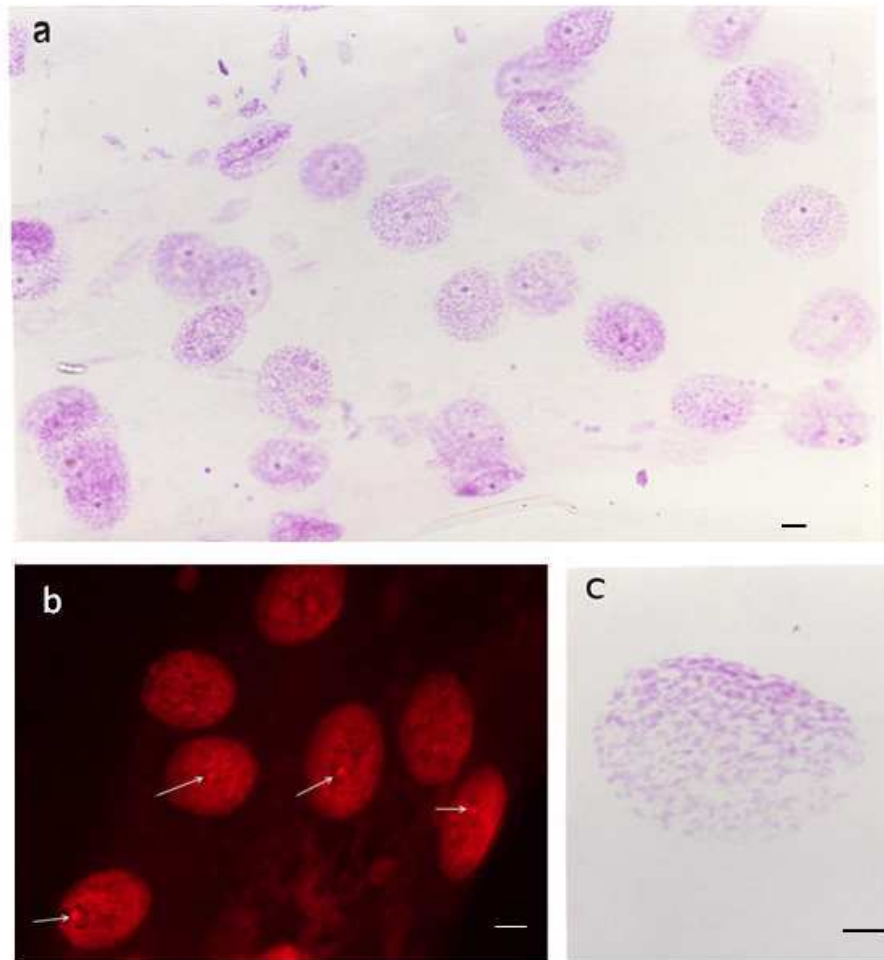


Figure 1. *P. megistus* whole-mounted Malpighian tubule preparations subjected to ordinary (a,c) and fluorescent (b) Feulgen reactions. A single chromocenter is present in male (a, b- arrows) but not in female cell nuclei (c). Bars,10 μm .

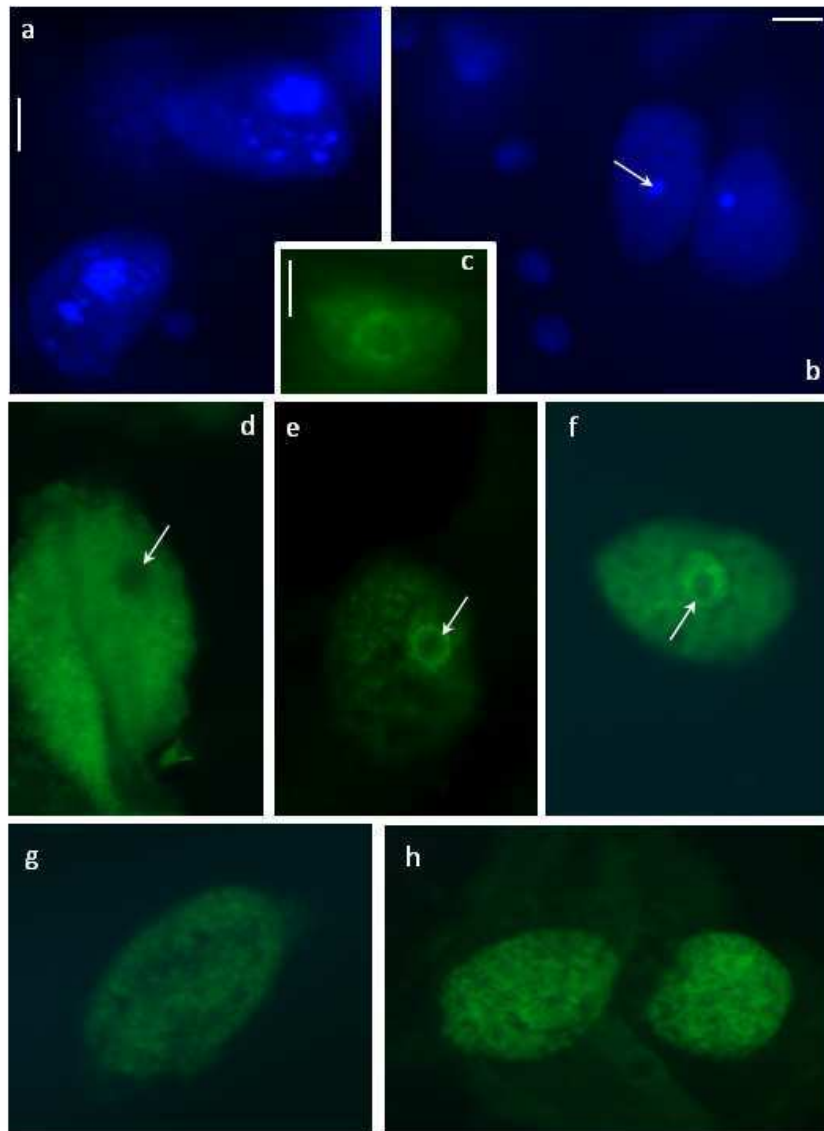


Figure 2. Malpighian tubule cell nuclei of *P. megistus* nymphs after staining with DAPI/AMD (b – male) and CMA₃/DA (d, e, f – males; g, h – females). Images of Malpighian tubule cells from *T. infestans* (a – DAPI/AMD; c – CMA₃/DA) are shown for comparison. The arrows in b and d indicate the chromocenter region. The arrows in e and f indicate a ring of more intense response to CMA₃/DA surrounding the chromocenter. Bars, 10 μm.

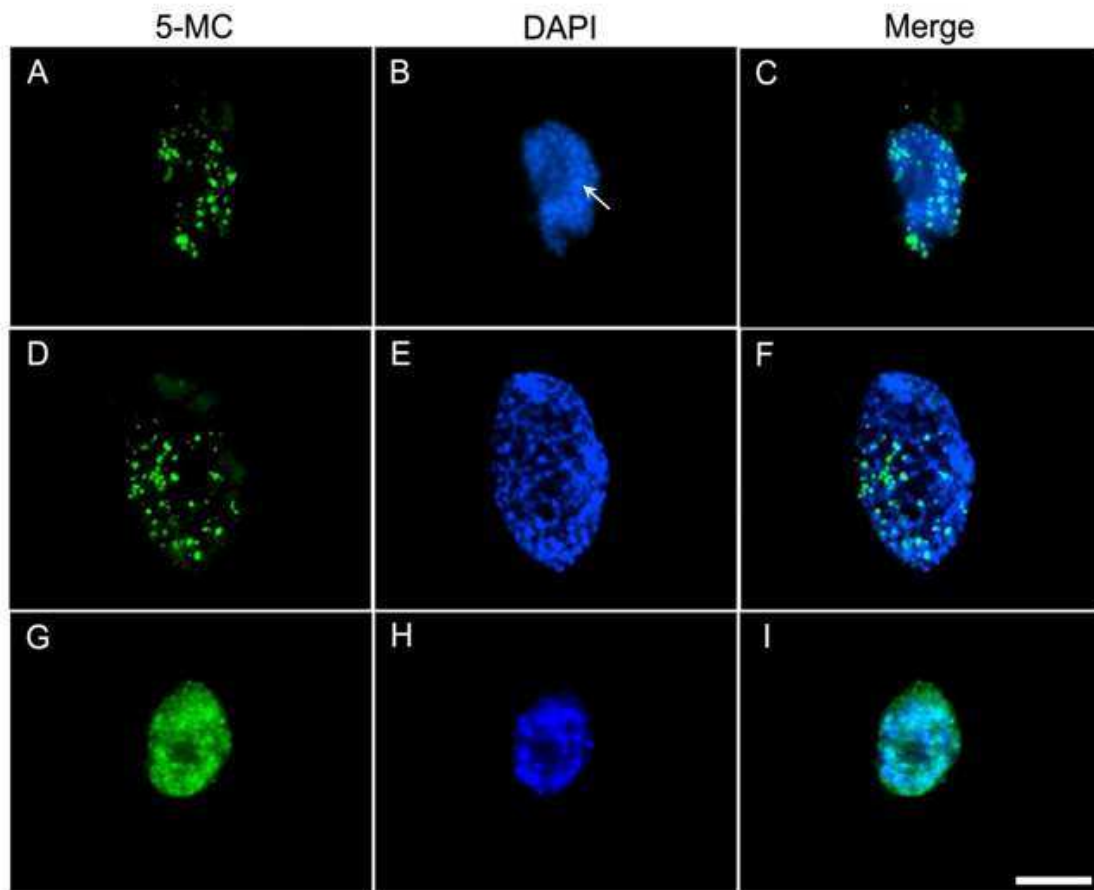


Figure 3. 5-methylcytidine signals (A, C, D, F) in cell nuclei of *P. megistus* counterstained with DAPI (B, C, E, F). A to C are from a male nymph, whereas D to F are from a female nymph. The arrow in B indicates the chromocenter area. Images of a similarly treated early prophase nucleus of a maize root meristem cell are included as a positive material control (G-I). Bars, 10 μ m.

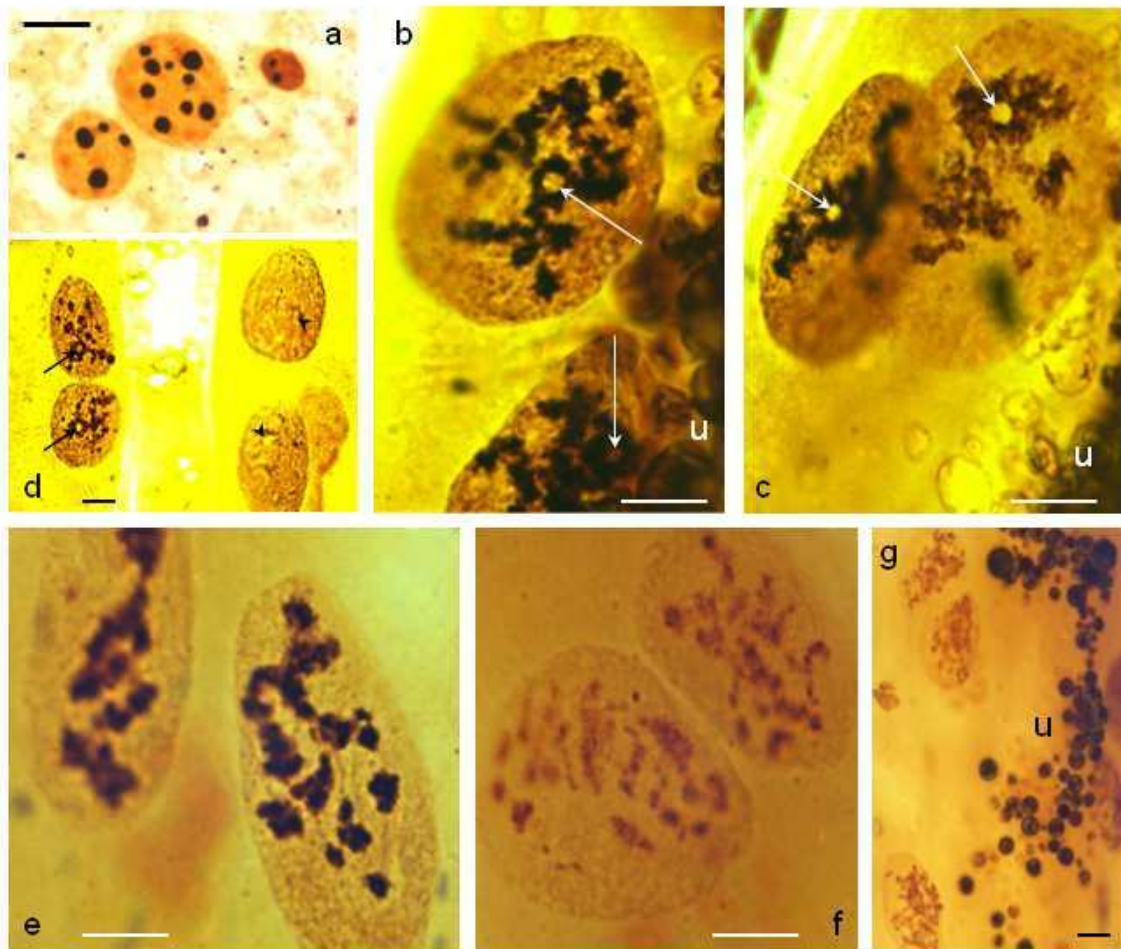


Figure 4. AgNOR-positive response in the form of black granules spread in the cell nuclei, including the periphery of the chromocenter (b-d, arrows) in male *P. megistus* Malpighian tubule cell nuclei. Some nuclei do not show a positive response to the test (d, arrowheads). The AgNOR-positive response in female cell nuclei appears as coarse (e) or thin (f,g) granules forming filamentous agglomerates. Images of similarly treated imprints of mouse liver cells are shown as a positive control of the reaction (a). u, urate spherulites. Bars, 10 μm.

Capítulo III

Artigo: Hipermetilação e hipoacetilação de histonas contribuem para a manutenção da heterocromatina em *Triatoma infestans* Klug e *Panstrongylus megistus* (Burmeister).

Hipermetilação e hipoacetilação de histonas contribuem para a manutenção da heterocromatina em *Triatoma infestans* Klug e *Panstrongylus megistus* (Burmeister)

Elenice M. Alvarenga^a, Vera L. C. C. Rodrigues^b, Mateus Mondin^c, Alberto S. Moraes^d, Maria Luiza S. Mello^{a*}

^a*Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863, Campinas, SP, Brasil*

^b*SUCEN, 13840-000, Mogi-Guaçu, SP, Brasil*

^c*Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Universidade de São Paulo (USP), 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil*

^d*Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil*

RESUMO

Núcleos de células somáticas de *Triatoma infestans* podem ter um ou vários corpos heterocromáticos (cromocentros) constituídos pelos cromossomos A, B, C, X e Y. Em *Panstrongylus megistus*, seu único cromocentro é representado pelo cromossomo Y. Estes cromocentros, que apresentam DNA rico em AT, podem se descompactar sob a ação de fatores estressantes, mas pouco é sabido sobre os mecanismos de manutenção da heterocromatina. Por meio de análises imunocitoquímicas dos marcadores epigenéticos presentes na cromatina de ambas as espécies, observou-se que nos cromocentros há hipocetilação e hipermetilação de resíduos de lisina nas histonas H3 e H4. Já os tratamentos das ninfas de *T. infestans* e *P. megistus* com inibidores de deacetilases de histonas (tricostatina A – TSA, ácido valproico – VPA e butirato de sódio – NaBt) e subsequente análise dos fenótipos nucleares, demonstraram aumento na frequência de necroses e, no caso dos tratamentos com TSA e NaBt, houve observação de descompactação da heterocromatina. Nestes casos, sugere-se que os tratamentos afetem o processo de deacetilação de histonas, que atua como importante fator na estruturação de cromocentros. Alterações na ocorrência de muda e na sobrevivência dos insetos foram observadas após injeção do VPA e de solução salina. Os resultados do presente trabalho são indicativos de que a deacetilação e a metilação de histonas possam contribuir para a manutenção da heterocromatina nestas células.

Palavras-chave: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, heterocromatina,

epigenética, fenótipos nucleares, inibidores de deacetilases de histonas.

1. Introdução

Triatoma infestans é um hemíptero triatomíneo hematófago, vetor da doença de Chagas, enfermidade muito comum na América Latina (Schofield et al., 2006; Souza, 2007). Nesse inseto, durante seu desenvolvimento, muitos de seus órgãos crescem por endopoliploidia e não por divisão celular (Mello, 1971, 1975; Andrade & Mello, 1987). A partir do 3º instar ninfal, as células epiteliais dos túbulos de Malpighi deste inseto, que até então apresentavam um único corpo heterocromático, se diferenciam, passando a apresentar um ou vários corpos de heterocromatina (cromocentros) (Mello, 1971; Mello, 1978; Mello et al., 2001). Quando os triatomíneos são expostos a fatores estressantes, tais como metais pesados, choques de temperatura, radiação gama, jejum e infecção por *Trypanosoma cruzi*, fenótipos nucleares diferentes dos usuais são observados (Álvares & Mello, 1987; Mello, 1989; Mello et al., 1995, 2001; Campos et al., 2002; Garcia et al., 2011). Metais pesados e choques de temperatura podem também afetar a ocorrência de mudas (Mello et al., 1995; Campos et al., 2002). Em *Panstrongylus megistus*, outro triatomíneo vetor da doença de Chagas, os túbulos de Malpighi, que também crescem por endopoliploidia (Mello, 1975) mostram células contendo apenas um cromocentro, que, em comparação aos corpos heterocromáticos de *T. infestans*, é muito menor e presente somente em machos (Mello et al., 1986).

Apesar de já se conhecer a constituição dos cromocentros em *T. infestans* (três autossomos – A, B e C – e os cromossomos sexuais) e *P. megistus* (múltiplas cópias do cromossomo Y) e sua contribuição para a evolução destas espécies (Schreiber et al., 1972), não há conclusões sobre a manutenção da heterocromatinização destas áreas. Além disso, o sistema genético dos triatomíneos possui muitas características particulares, como a ocorrência de cromossomos holocêntricos, por exemplo. No entanto, pouco se sabe sobre a organização da cromatina e os determinantes epigenéticos na estrutura heterocromática destes insetos (Bressa et al., 2005).

Estudos epigenéticos mais recentes têm demonstrado que a heterocromatina é produto de muitas modificações nas caudas das histonas e no próprio DNA (Grewal & Moazed, 2003). A histona H1 e fatores associados à arquitetura cromatínica, tais como a *heterochromatin protein 1* (HP1- α), também podem tornar mais compactas e repressas as estruturas de ordem superior da cromatina (Kimmins & Sassone-Corsi, 2005; Allis et al., 2007). Estas modificações pós-traducionais específicas nas caudas N-terminais das histonas podem ser: acetilações, fosforilações, metilações, ubiquitinações, glicosilações, deiminações, sumoilações e ADP ribosilações. Estas proveem, junto à metilação do DNA, marcas epigenéticas. As alterações epigenéticas representam mudanças herdáveis nos padrões de expressão gênica e silenciamento do genoma, que não consistem em alterações na sequência do DNA, mas que dependem do somatório das alterações moleculares na cromatina (Allis et al., 2007).

Uma dessas mudanças é a acetilação de histonas, frequente em áreas eucromáticas e geralmente associada à atividade transcricional, recombinação e reparo de DNA (McMurry & Krangel, 2000; Ikura et al., 2000; Jasencakova et al., 2001). Assim, admite-se que o estado heterocromático possa estar associado à hipoacetilação de histonas (Moazed, 2001).

O grau de metilação de histonas varia ao longo dos cromossomos mitóticos e domínios de cromatina dos insetos, mamíferos e plantas. A metilação costuma ser mais intensa em domínios heterocromáticos que, normalmente, demonstram um *status* altamente metilado na lisina 9 da histona H3 em muitos organismos (Schotta et al., 2002; Peters et al., 2001; Soppe et al., 2002). Além disso, a monometilação de resíduos de lisina na posição 9 da histona H3 têm sido associada ao recrutamento da proteína HP1- α , altamente conservada, associada ao silenciamento de regiões eucromáticas e, conseqüentemente à organização da heterocromatina, por meio do recrutamento de enzimas como deacetilases e metiltransferases (Bannister et al., 2001; Jackson et al., 2002; Elgin & Grewal, 2003; Kouzarides, 2007).

Deacetilases de histonas (HDACs), enzimas responsáveis por manter o estado hipoacetilado da cromatina, são o principal alvo de muitos estudos epigenéticos, porque podem ter sua atividade inibida por certas drogas. Alguns inibidores efetivos de deacetilases de histonas são: tricostatina A (TSA), um antibiótico fungistático cuja ação pode ser revertida (Tóth et al., 2004); ácido valproico (VPA), um agente anticonvulsivo e estabilizador de humor (Phiel et al.,

2001); e butirato de sódio (NaBt), naturalmente produzido por micro-organismos a partir da oxidação catabólica de ácidos graxos saturados de cadeia longa (Flores-Ancona et al., 2009; Sawa et al., 2001). A TSA age contra todas as classes de HDACs, enquanto o VPA e o NaBt inibem apenas as classes I e IIa (Bolden et al., 2006).

No presente trabalho busca-se identificar em diferentes domínios da cromatina (cromocentros e eucromatina) em células interfásicas dos triatomíneos *T. infestans* e *P. megistus*, a distribuição de resíduos pós-traducionalmente acetilados e metilados na posição 9 da histona H3 e resíduos acetilados nas posições 8 e 16 da histona H4. Estes achados permitirão uma interessante comparação entre resultados obtidos para as duas espécies e para núcleos com diferentes fenótipos e graus de ploidia.

Por outro lado, espera-se que a análise dos fenótipos nucleares em espécimes submetidos aos tratamentos com as drogas inibidoras de deacetilases de histonas acima mencionadas possa trazer informações sobre suas possíveis ações. Se o fenótipo de descondensação da heterocromatina for encontrado, é possível estabelecer uma correlação indireta entre os fatores epigenéticos e a manutenção dos cromocentros nas células dos túbulos de Malpighi. Neste caso, as análises da supraorganização da cromatina poderiam confirmar a ocorrência do fenótipo de descompactação da heterocromatina. Além disso, se alterações na sobrevivência e na ocorrência de mudas forem encontradas com esse tratamento, a ação das drogas sobre a acetilação de resíduos específicos de histonas poderia

ser associada à funcionalidade celular e do inseto, de modo geral.

2. Materiais e Métodos

2.1. Insetos

Foram utilizadas ninfas de 5º estágio de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) e machos de 5º estágio de *Panstrongylus megistus* (Burmeister) (Hemiptera, Reduviidae), alimentadas uma vez por semana com sangue de aves e mantidas a 30°C e 80% de umidade relativa no laboratório da SUCEN (Mogi-Guaçu, SP). Os espécimes de *T. infestans* são oriundos do norte do estado de Minas Gerais (Vale do Jequitinhonha) no Brasil (aproximadamente entre as latitudes 16°S e 18°S) e os espécimes de *P. megistus* se originaram de populações das encostas da Serra da Mantiqueira, na região leste do estado de São Paulo (Caconde, Divinolândia, São Sebastião da Gramma, São João da Boa Vista) no Brasil (aproximadamente entre as latitudes 21°31'S e 21°58'S e longitude 46°40'W). Os esmagamentos leves dos túbulos de Malpighi que foram utilizados para as análises imunocitoquímicas foram previamente fixados em paraformaldeído a 4% (LabSynth, Diadema, Brasil) diluído em tampão fosfato de sódio (0,01 M, pH 7,4) por 10 min a temperatura ambiente. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e os esmagamentos secados ao ar. Pelo menos 3 espécimes foram empregados em cada ensaio experimental. As montagens totais de túbulos de Malpighi que foram utilizadas nas análises dos fenótipos nucleares foram fixadas em etanol absoluto-ácido acético glacial (3:1, v/v) por 1 min,

seguidas de lavagem em etanol 70% por 5 min, secadas ao ar e coradas pela reação de Feulgen.

2.2. Anticorpos

Os seguintes anticorpos, reconhecendo especificamente resíduos modificados de lisina nas histonas H3 e H4, foram utilizados: mouse monoclonal anti-H3K9Ac (1:500) (Abcam, Cambridge, MA, USA); rabbit policlonal anti-H4K8Ac (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA); mouse monoclonal anti-H4K16 Ac (1:200) (Abcam); rabbit policlonal anti-H3K9 Me (1:500) (Abcam); mouse monoclonal anti-H3K9Me₂, 1:500) (Millipore); rabbit policlonal anti-H3K9Me₃, 1:250) (Millipore). Para a detecção dos anticorpos primários foram empregados: goat anti-mouse IgG (H+L) conjugado a Texas Red (1:100) (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) e sheep anti-rabbit IgG conjugado a Fluoresceína (1:200) (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA).

2.3. Imunocitoquímica

O procedimento de imunocoloração para histonas modificadas foi adaptado de Jasencakova et al. (2000) e Jasencakova et al. (2001). O método consistiu de 3 lavagens dos esmagamentos de túbulos de Malpighi em 1 X PBS e tratamento com Triton X-100 a 0,2% (Merck, Darmstadt, Germany) em 1 X PBS por 10 min para permeabilizar as células e núcleos. Após três lavagens com 1 X PBS, as lâminas foram tratadas com soroalbumina bovina (BSA) a 5% diluída em 1 X PBS

por 30 min à temperatura ambiente para evitar uma ligação inespecífica do anticorpo a outra proteína. O material foi incubado *overnight* a 4°C com os anticorpos primários previamente descritos, seguindo-se três lavagens com 1X PBS, após o que foi exposto aos anticorpos secundários por 2 h no escuro a temperatura ambiente. Após lavagens com 1 X PBS, as lâminas foram montadas em Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) contendo 200 µg/mL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e foram, então, examinadas.

2.4. Microscopia de fluorescência e análise de imagem

As análises dos preparados submetidos às reações imunocitoquímicas foram realizadas em um microscópio Zeiss Axiophot 2 (Oberkochen, Germany) equipado para epifluorescência e as imagens foram capturadas por meio do software Zeiss Kontron KS400-3. O software livre Image J foi utilizado para fusão das imagens obtidas após a realização dos testes imunocitoquímicos.

2.5. Ensaio com inibidores de deacetilases de histonas

Os insetos foram injetados na região abdominal com as seguintes soluções: tricostatina A (TSA) a 5 nM e 100 nM (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em DMSO (Maalouf et al., 2009; Shao et al., 2009); ácido valproico (VPA) a 0,05 mM, 0,5 mM e 1 mM (Sigma) diluído em solução salina (Eyal et al., 2004); butirato de sódio (NaBt) a 10 mM e 150 mM (Sigma) diluído em solução salina (Aggarwal & Calvi, 2004). Como controles foram usados insetos não injetados ou

injetados com um mesmo volume de DMSO (para comparações com os tratamentos com TSA) ou solução salina (para comparações com todos os tratamentos). Os túbulos de Malpighi foram removidos 1 h, 24 h e 48 h após injeção.

2.6. Reação de Feulgen

O material obtido como descrito acima foi submetido à reação de Feulgen com hidrólise em HCl a 4 M a 25°C por 65 min (Mello & Vidal, 1978). As lâminas foram, então, tratadas com o reativo de Schiff por 40 min no escuro, lavadas por três vezes (5 min cada) em água sulfurosa e uma vez em água destilada, secadas ao ar, clareadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá natural ($n_D = 1.54$).

2.7. Contagem de núcleos

O número total de núcleos, bem como de cada fenótipo, das células epiteliais dos túbulos de Malpighi corados com a reação de Feulgen foram contados para cada espécime, em um microscópio de luz binocular Zeiss. Os fenótipos nucleares investigados foram: H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: núcleo apoptótico; A_S: núcleo suspeito de apoptose; NE: núcleo necrótico; N: núcleo normal (Dantas & Mello, 1992; Mello et al., 2001); N_{ID}: núcleo com identificação prejudicada. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se um microscópio Zeiss Axiophot II (Oberkochen, Germany).

2.8. Análise de imagem por microespectrofotometria de varredura

A análise de imagem dos núcleos de túbulos de Malpighi de *T. infestans* submetidos à reação de Feulgen foi realizada em um microespectrofotômetro de varredura automática Zeiss, sob as seguintes condições: Objetiva Planapo 63X/0,90; optovar 2,0; diafragma de medida 0,25 mm; condensador LD – Epiplan 16X/0,30; “scanning spot” 0,5 μm x 0,5 μm ; lâmpada de halogênio 100-W/12-V, $\lambda = 560\text{nm}$, obtido com régua monocromadora Schott. O ponto de discriminação de áreas de cromatina condensada (*cutoff point*) foi considerado o de absorvância igual a 0,800. Os parâmetros obtidos foram:

1. A_T , absorvância nuclear total;
2. A_C , absorvância acima do *cutoff* pré-selecionado (correspondendo aos valores Feulgen-DNA de cromatina condensada);
3. S_T , área nuclear total (μm^2);
4. S_C , área nuclear coberta por cromatina condensada (μm^2);
5. $S_C\%$, área de cromatina condensada em relação à área nuclear;
6. AAR [$(A_C / S_C) / (A_T / S_T)$], razão de absorção média, proposta por Vidal et al. (1973).

Diagramas de dispersão relacionando AAR a $S_C\%$, como previamente proposto (Vidal, 1984, Vidal et al., 1998), foram então plotados. Esses diagramas permitem a discriminação da posição de fenótipos nucleares específicos, definidos em termos de suas porcentagens de cromatina condensada ($S_C\%$) e do contraste

entre cromatina condensada e não condensada (AAR) (Vidal et al., 1998, Mello et al., 2009). Foram também obtidos histogramas de área nuclear total, a partir dos valores de S_T , e histogramas de valores Feulgen – DNA, a partir dos valores de A_T .

Procurou-se demonstrar por absorciometria a descompactação de cromocentros no fenótipo H_D , bem como o efeito desse fenômeno na expansão da área nuclear à semelhança de relato em Mello (1989). Para tanto foi usada uma amostragem pequena, que apenas comprovasse a definição visual.

2.9. Ocorrência de mudas e sobrevivência dos insetos

A ocorrência de mudas e a sobrevivência dos insetos foram monitoradas em ninfas de 5º estágio de *T. infestans* injetadas com VPA a 1 mM, em controles não injetados e injetados com solução salina por um período de 280 dias. Para cada ensaio de monitoramento foram utilizados 20 insetos mantidos em condições de insetário (alimentados uma vez por semana e mantidos a 30°C e 80% de umidade relativa) no laboratório da SUCEN (Mogi-Guaçu, SP). O objetivo deste teste foi demonstrar se a droga em questão poderia afetar o desenvolvimento e a sobrevivência dos insetos.

2.10. Estatística

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os dados obtidos com análise de imagem por microespectrofotometria de varredura.

Análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliar a relação entre os tratamentos com inibidores de deacetilases de histonas. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para se estabelecer o grau de relação linear entre as frequências absolutas de fenótipos nucleares, os diferentes tratamentos e os diferentes tempos de tratamento. Todos os cálculos para os dados obtidos com microespectrofotometria de varredura e a relação linear entre as condições de tratamento e os fenótipos nucleares foram obtidos com o software Minitab 12™ (State College, PA, USA).

3. Resultados

3.1. Reações Imunocitoquímicas

Uma sùmula contendo todos os achados obtidos nas análises imunocitoquímicas encontra-se na Tabela 1.

Os sinais representando a acetilação de resíduos de lisina H3K9, H4K8 e H4K16 somente foram observados na eucromatina dos núcleos de *T. infestans* (Fig. 1, 2, 3 a – f) e de *P. megistus* (Fig. 1, 2, 3 g – i). No caso específico de H4K8Ac, em alguns núcleos de *T. infestans* que apresentavam um único cromocentro, foi possível observar um brilho fluorescente mais intenso ao redor da área heterocromática (Fig. 2 b, c).

Sinais de monometilação em resíduos de lisina H3K9 foram observados como pontos de fluorescência verde em áreas eucromáticas de núcleos de *T. infestans* com um (Fig. 4 a – c) ou vários cromocentros (Fig. 4 d – f) e em áreas

euromáticas de núcleos de *P. megistus* (Fig. 4 g – i). Sinais mais intensos ocorreram na periferia dos corpos heterocromáticos em núcleos de *T. infestans* com um único cromocentro (Fig. 4 b, c) e em *P. megistus* (Fig. 4 g – i).

Núcleos de *T. infestans* com um (Fig. 5 a – c) ou vários cromocentros (Fig. 5 d – f) e núcleos de *P. megistus* (Fig. 5 g – i) apresentaram H3K9Me₂ somente na euromatina.

Sinais fluorescentes revelando trimetilação em H3K9 ocorreram nas áreas euromáticas e heterocromáticas de núcleos de *T. infestans* com um (Fig. 6 a – c) ou vários cromocentros (Fig. 6 d – f) e também nos núcleos de *P. megistus* (Fig. 6 g – i).

3.2. Contagem total de núcleos e de fenótipos nucleares após tratamento com TSA

As tabelas 2 e 3 mostram, para *T. infestans* e *P. megistus*, respectivamente, a média aritmética (X) e desvio padrão (SD) da frequência de todos os fenótipos nucleares mencionados em Material e Métodos e ilustrados na Fig. 7 (fenótipos nucleares de *T. infestans* somente), bem como o número total de núcleos em células dos túbulos de Malpighi de insetos submetidos aos tratamentos com TSA e também dos grupos controle.

Em todos os casos foram observados os vários fenótipos, sendo, em ambas as espécies, a maior frequência dos núcleos contribuída pelo fenótipo “normal” (Tabelas 2 e 3). No caso de *T. infestans*, este se constitui em um núcleo contendo

um ou vários corpos de heterocromatina em meio à eucromatina. Já em *P. megistus*, só há ocorrência de um cromocentro em meio à eucromatina. Quanto aos fenótipos alterados, em ambas as espécies estes se apresentam similares. H_D representa núcleos com cromocentros fracamente corados e com área aumentada, pressupondo descompactação da heterocromatina, que pode ser parcial ou atingir o cromocentro como um todo, tornando-o até indistinguível da eucromatina. Os núcleos gigantes (G), que se originaram por processos de fusão nuclear e/ou celular, são pouco frequentes e se caracterizam por seu grande tamanho e pela presença de muitos cromocentros. Os núcleos com aspecto morfológico suspeito de apoptose (A_S) são aqueles em que a eucromatina se cora de forma muito intensa, evidenciando um padrão de compactação similar ao que ocorre em outros modelos, nos quais uma diminuição nos valores Feulgen-DNA precede a perda de DNA típica de estágios avançados de apoptose (Maria et al., 2000). Núcleos apoptóticos (A), pouco frequentes, apresentam compactação intensa demonstrada pela forte coloração e diminuição da área nuclear, às vezes podendo o núcleo estar fragmentado em corpos ou vesículas apoptóticas típicas. Núcleos de células em necrose (NE), bastante frequentes, se caracterizam pelo aspecto “vacuolizado”.

Sob certas condições, tanto para *T. infestans* quanto para *P. megistus*, ao fenótipo nuclear mais comum (N) seguiu-se o NE (Tabelas 2 e 3). Em outras situações, em ambas as espécies, o fenótipo H_D foi o segundo mais frequente. Quanto a estes núcleos H_D, percebe-se que a descompactação afetou o

cromocentro como um todo.

Tanto em *T. infestans* quanto em *P. megistus*, poucos núcleos G e A foram observados. Em *T. infestans*, houve pouca variação no número total de núcleos, enquanto em *P. megistus* essa variação foi evidente, tanto sob condições controle como sob tratamento com a droga (Tabela 3).

Em *T. infestans*, a ocorrência de núcleos NE nos insetos controles injetados com DMSO por 24 h e naqueles tratados com TSA a 5 nM foi significativamente diminuída em relação aos controles não injetados ou injetados com solução fisiológica por 24 h (Tabela 2).

Utilizou-se o Coeficiente de Correlação de Pearson para estabelecerem-se correlações entre todas as seguintes variáveis entre si: H_D , G, A, A_S , NE, N_{ID} , N, tempo de tratamento e concentração de TSA. Por esta análise, quando uma variável tende a aumentar enquanto a outra diminui, o coeficiente de correlação é negativo. Alternativamente, se ambas as variáveis tenderem a aumentar ou a diminuir, o coeficiente é positivo. Valores deste coeficiente variando de 20% a 50% denotam uma correlação moderada, enquanto valores maiores que 50% indicam uma forte correlação (Garcia et al., 2000). O valor de p obtido determina se tal correlação é ou não estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Para revelar as relações existentes entre os efeitos dos diversos tratamentos e seus respectivos controles sobre os fenótipos nucleares utilizou-se a análise de variância (ANOVA), que determina se uma população difere ($p < 0,05$) ou não de outra.

Assim, em *T. infestans*, após 1 h de tratamento com TSA a 5 nM, observou-

se que as frequências de H_D e A se correlacionaram positivamente ($p = 0,011$, Tabela 4). Ao contrário, uma forte correlação negativa ocorreu entre tais fenótipos nos tratamentos TSA 5 nM por 48 h ($p = 0,032$, Tabela 4) e TSA 100 nM por 48 h ($p = 0,035$, Tabela 4). Já no controle submetido ao DMSO por 24 h, os fenótipos H_D e A_S são positivamente correlacionados ($p = 0,026$, Tabela 4). O aumento do tempo de exposição à droga em sua maior concentração também produziu aumento da descompactação da cromatina, como demonstrado pela forte correlação positiva entre a frequência de H_D e o tempo de exposição à TSA a 100 nM ($p = 0,031$, Tabela 4).

Um aumento na ocorrência de núcleos A_S frequentemente se associou a um aumento na frequência de núcleos A, sendo notada forte correlação positiva entre tais fenótipos nos controles sem inoculação ($p = 0,000$, Tabela 4), com DMSO 1 h ($p = 0,017$, Tabela 4) e no tratamento de 1 h com TSA 100 nM ($p = 0,024$, Tabela 4). Além disso, quanto maior o número total de núcleos, maior foi a ocorrência de núcleos apoptóticos no controle sem inoculação ($p = 0,048$, Tabela 4).

O aumento do tempo de exposição ao DMSO levou a um aumento na ocorrência de núcleos NE ($p = 0,000$, Tabela 4). NE também se correlacionou positivamente com A_S no grupo controle submetido à solução fisiológica por 24 h ($p = 0,023$, Tabela 4). Ainda com relação ao controle de DMSO, após 24 h notou-se que o aumento na frequência do fenótipo A foi acompanhado por diminuição na frequência dos núcleos N ($p = 0,039$, Tabela 4).

Em *P. megistus*, um aumento na ocorrência de núcleos G mostrou-se associado a uma diminuição no número total de núcleos no controle injetado com DMSO por 1 h, o que é indicado por uma forte correlação negativa ($p = 0,032$, Tabela 5). Neste mesmo controle, após 48 h de tratamento, o aumento na frequência de núcleos G também foi acompanhado pela diminuição na frequência dos núcleos N ($p = 0,039$, Tabela 5). Da mesma forma, nos insetos controle injetados com DMSO por 24 h, observou-se que o aumento na frequência dos núcleos NE levou a uma diminuição na frequência dos núcleos N ($p = 0,046$, Tabela 5) e também do número total de núcleos ($p = 0,047$, Tabela 5). Considerando-se o tratamento com TSA a 5 nM por 24 h, H_D e NE se correlacionaram positivamente ($p = 0,038$, Tabela 5). Ao contrário, após 24 h de tratamento com TSA a 100 nM, A e NE se correlacionaram negativamente ($p = 0,049$, Tabela 5). Após 48 h de tratamento com TSA a 100 nM, H_D e A_S se correlacionam negativamente ($p = 0,002$, Tabela 5). O aumento do tempo de exposição à droga em sua menor concentração também levou a um aumento na ocorrência de núcleos A ($p = 0,034$, Tabela 5). No tempo de 24 h de tratamento, foi observado que o aumento na concentração da droga levou a uma diminuição na frequência dos núcleos N, o que é indicado pela forte correlação negativa obtida ($p = 0,030$, Tabela 5).

3.2.1. Análise em microespectrofotometria de varredura automática

Pela análise do diagrama de dispersão Sc% vs. AAR pode-se notar que

núcleos de *T. infestans* com descompactação de heterocromatina (H_D) após tratamento com TSA sofrem redução na área de cromatina condensada discriminada pelo *cutoff* 0,800, ao mesmo tempo em que o contraste cromatina condensada – cromatina não condensada (AAR) decresce (Fig. 8). Estas alterações são estatisticamente significantes (Tabela 6), comprovando-se quantitativamente uma observação visual de descompactação da heterocromatina, também evidenciada pelo aumento da frequência de núcleos H_D com o aumento do tempo de tratamento com TSA (Tabela 6). Os núcleos H_D tiveram aumento de tamanho nuclear (área em μm^2) (Fig. 9), embora seus valores Feulgen-DNA não diferissem dentro da mesma classe de ploidia (Fig. 10).

3.3. Frequência de núcleos e de fenótipos nucleares após tratamento com VPA

As Tabelas 7 e 8 mostram, para *T. infestans* e *P. megistus*, respectivamente, a média aritmética (\bar{X}) e desvio padrão (SD) da frequência de todos os fenótipos nucleares mencionados em Material e Métodos e ilustrados na Fig. 7 (fenótipos nucleares de *T. infestans* somente), bem como o número total de núcleos em células dos túbulos de Malpighi de insetos submetidos aos tratamentos com VPA e grupos controle. Assim como nas análises das frequências obtidas após os tratamentos com TSA, foram estabelecidas correlações entre os pares de variáveis mencionados anteriormente (H_D , G, A, A_S , NE, N_{ID} , N, tempo de tratamento e concentração de VPA) e realizadas comparações entre os tratamentos pelo método da análise de variância (ANOVA).

A maior frequência de núcleos foi contribuída em ambas as espécies pelo fenótipo N (Tabelas 7 e 8). Novamente, tanto para *T. infestans* quanto para *P. megistus*, ao fenótipo nuclear mais comum (N) seguiram-se os NE ou os H_D (Tabelas 7 e 8), variando a frequência conforme o tratamento considerado.

Tanto em *T. infestans* quanto em *P. megistus*, foram observados poucos núcleos com fenótipo G e A. Em *T. infestans*, sob certas situações, houve alguma variação expressiva no número total de núcleos, o qual diminuiu em relação aos controles nos indivíduos tratados com VPA por 1 h e 48 h (Tabela 7). Já em *P. megistus* essa variação é evidente ao se comparar os insetos controle com aqueles tratados com a maior concentração da droga por 1 h (Tabela 8).

Em *T. infestans*, em relação aos controles não injetados ou injetados com solução fisiológica, houve aumento de NE após 1 h de tratamento com VPA a 0,5 mM e 1 mM e também após 48 h de tratamento com VPA a 0,05 mM (Tabela 7). Assim, a frequência de núcleos N acabou por diminuir significativamente em relação aos controles não injetados ou injetados com solução fisiológica, após os tratamentos com VPA a 0,05 mM, 0,5 mM e 1,0 mM (1 h) e com VPA a 0,05 mM, 0,5 mM e 1,0 mM (48 h) (Tabela 7).

Após tratamento com VPA a 1 mM por 1 h, a frequência dos fenótipos NE e H_D mostrou forte correlação positiva ($p = 0,026$, Tabela 9). A frequência de NE também se correlacionou positivamente com a de A_S após 24 h de tratamento com VPA a 0,05 mM ($p = 0,003$, Tabela 9). Considerando-se os tratamentos com a droga nesta concentração, percebe-se que o aumento do tempo de exposição à

mesma induz um aumento na frequência de núcleos A ($p = 0,006$) e NE ($p = 0,002$) (Tabela 9).

As frequências de núcleos A e N correlacionaram-se negativamente após 24 h de tratamento com VPA a 0,05 mM ($p = 0,029$, Tabela 9). Nos insetos submetidos ao tratamento com VPA a 0,5 mM por 48 h, as frequências dos fenótipos A e NE também se mostraram correlacionadas negativamente ($p = 0,045$, Tabela 9).

O aumento na concentração da droga também produziu efeitos sobre a ocorrência de alguns fenótipos, como o aumento na frequência de núcleos A após 1 h de tratamento ($p = 0,001$) e a diminuição na frequência de núcleos NE após 48 h de tratamento ($p = 0,039$) (Tabela 9).

Em *P. megistus*, houve aumento significativo na ocorrência de núcleos NE, em comparação ao controle não tratado, após 1 h de tratamento com VPA a 0,5 mM (Tabela 10). A frequência de núcleos N também se mostrou significativamente alterada, em comparação à do controle injetado com solução fisiológica, após 1 h de tratamento com VPA a 0,5 mM e 1,0 mM (Tabela 10). Também após 1 h de tratamento com VPA a 1,0 mM pôde-se notar uma significativa diminuição no número total de núcleos nos túbulos de Malpighi destes insetos.

As frequências de núcleos H_D e A_S em *P. megistus* se correlacionaram positivamente após 1 h de tratamento com VPA a 0,5 mM ($p = 0,023$, Tabela 10). Já após 24 h de tratamento com a droga nesta mesma concentração, houve forte correlação negativa entre as frequências de núcleos A e N ($p = 0,017$) e entre a

frequência de núcleos A e o número total de núcleos ($p = 0,037$) (Tabela 10). Novamente, H_D e A_S se correlacionaram positivamente após 48 h de tratamento com VPA a 0,5 mM ($p = 0,039$, Tabela 10). Nesta condição experimental, uma diminuição na frequência de núcleos G foi acompanhada de aumento na frequência de núcleos NE ($p = 0,047$) e do total de núcleos ($p = 0,041$) (Tabela 10). Já após 48 h de tratamento com VPA a 1,0 mM, as frequências de H_D e A_S se correlacionaram negativamente ($p = 0,038$, Tabela 10).

Ainda em relação a *P. megistus*, considerando-se os tratamentos com VPA a 1,0 mM, é possível notar que o aumento do tempo de exposição à droga leva a uma diminuição na frequência dos núcleos N ($p = 0,047$) e do número total de núcleos ($p = 0,048$) (Tabela 10). Ao ser considerado o tempo de tratamento de 24 h, o aumento na concentração da droga induziu uma diminuição na frequência de núcleos N ($p = 0,001$) e do número total de núcleos ($p = 0,000$) (Tabela 10). Quanto ao tempo de 48 h de tratamento, o aumento na concentração da droga induziu um aumento na ocorrência de núcleos A_S ($p = 0,028$) e uma diminuição na frequência de núcleos N ($p = 0,001$) e do número total de núcleos ($p = 0,002$) (Tabela 10).

3.4. Contagem total de núcleos e de fenótipos nucleares após tratamento com NaBt

Em todos os casos, tanto para *T. infestans* como *P. megistus*, foram observados os fenótipos mencionados em Material e Métodos e ilustrados na Fig. 7 (fenótipos nucleares de *T. infestans* somente). A média aritmética (\bar{X}) e o desvio

padrão (SD) da ocorrência destes fenótipos nucleares e o número total de núcleos em células dos túbulos de Malpighi para as duas espécies são mostradas nas tabelas 11 e 12, respectivamente.

Assim como nos tratamentos com TSA e VPA, foram estabelecidas correlações entre os pares de variáveis mencionados anteriormente (H_D , G, A, A_S , NE, N_{ID} , N, tempo de tratamento e concentração de NaBt) e realizadas comparações entre os tratamentos pelo método da análise de variância (ANOVA).

Nas duas espécies, a maior frequência dos núcleos foi contribuída pelo fenótipo N (Tabelas 11 e 12). Novamente, tanto para *T. infestans* quanto para *P. megistus*, a frequência do fenótipo nuclear mais comum (N) seguiram-se as de NE ou H_D (Tabelas 11 e 12), dependendo do tratamento considerado.

Tanto em *T. infestans* quanto em *P. megistus*, poucos núcleos G e A foram observados. Em *T. infestans*, houve pouca variação no número total de núcleos. Já em *P. megistus* essa variação foi evidente ao se comparar os insetos controle com aqueles tratados com a droga por 48 h (Tabela 12).

Em *T. infestans*, houve aumento significativo na frequência de H_D após 24 h e 48 h de tratamento com NaBt a 10 mM (Tabela 11). Houve também sensível aumento na frequência de núcleos NE após os tratamentos com NaBt a 150 mM por 1 h, em comparação aos controles não tratados ou tratados com solução fisiológica (Tabela 11). A frequência de núcleos N também diminuiu significativamente, ao se comparar os tratamentos com NaBt a 10 mM e 150 mM por 48 h ao respectivo controle de solução fisiológica (Tabela 11). Considerando-

se os insetos tratados com NaBt a 150 mM por 24 h, as frequências de H_D e A se correlacionaram positivamente ($p = 0,010$, Tabela 13). Já nos insetos submetidos ao tratamento com NaBt a 150 mM por 48 h, os fenótipos H_D e A_S se correlacionaram negativamente ($p = 0,023$, Tabela 13). Quando se considera o tratamento com NaBt a 150 mM por 24 h, as frequências de núcleos G e NE se correlacionaram positivamente ($p = 0,005$, Tabela 13).

Ainda em *T. infestans*, a diminuição no número total de núcleos foi acompanhada por um aumento na frequência de núcleos A nos insetos tratados com NaBt a 10 mM por 48 h ($p = 0,039$, Tabela 13).

Em *P. megistus*, também houve aumento da descompactação da cromatina após 1 h de tratamento com NaBt a 10 mM, em comparação ao controle não tratado (Tabela 12). Também houve significativo aumento da ocorrência de núcleos NE após 24 h e 48 h de tratamento com NaBt a 150 mM, em comparação aos respectivos controles não injetados e injetados com solução fisiológica (Tabela 12). Nesta espécie, após 24 h de tratamento com NaBt a 10 mM, observou-se que o aumento na ocorrência dos núcleos G foi acompanhado pela diminuição no número total de núcleos ($p = 0,005$), enquanto após 48 h de tratamento o aumento na frequência de núcleos A_S foi acompanhado pela diminuição de núcleos N ($p = 0,037$) (Tabela 14).

Considerando-se os tratamentos com NaBt a 150 mM, o aumento no tempo de exposição à droga levou a um aumento na frequência dos núcleos NE ($p = 0,004$) e a uma diminuição dos núcleos N ($p = 0,044$) (Tabela 14).

Ao serem comparados os tratamentos, observa-se que após 1 h de sua administração o aumento na concentração da droga leva a uma diminuição na frequência de núcleos H_D ($p = 0,016$) e aumento na frequência de núcleos N ($p = 0,027$) (Tabela 14). Da mesma forma, após 24 h de tratamento, o aumento na concentração da droga está associado a um aumento do número total de núcleos ($p = 0,037$) (Tabela 14).

3.5. Ocorrência de mudas e sobrevivência dos insetos

Após ensaio para avaliação da ação do VPA sobre o desenvolvimento dos insetos, foi possível constatar que, em comparação aos insetos controles, aqueles injetados com VPA e com solução salina mostraram diminuição da sobrevivência em um período de 280 dias (Tabela 15, Fig. 11). Uma queda de 50% de sobrevivência ocorreu ao redor de 68 dias após tratamento com VPA e 55 dias após tratamento com solução salina (Fig. 11). É possível, então, que, não apenas a droga em si, mas o estresse representado pela injeção e pela alteração no volume da hemolinfa possa ter afetado a sobrevivência dos insetos. Além disso, a taxa de ocorrência de muda, bem como o seu tempo de ocorrência também foram afetados nestas duas condições, havendo aumento do tempo para a ocorrência de mudas em insetos submetidos ao VPA e à solução salina (Tabela 15, Fig. 12) e redução do número de insetos que sofreram muda após terem sido submetidos a estes dois tratamentos (Fig. 12). Enquanto 90% dos insetos não injetados sofreram mudas no período considerado, apenas 60% daqueles submetidos ao

tratamento com VPA e 50% daqueles injetados com solução salina sofreram muda.

4. Discussão

4.1. Análises imunocitoquímicas

As análises imunocitoquímicas nas células epiteliais dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* e *P. megistus* demonstraram que os corpos heterocromáticos presentes nos núcleos destas células, em um estágio particular do desenvolvimento do inseto (ninfas de 5º estágio), apresentam histonas H3 e H4 hipoacetiladas. A análise dos fenótipos nucleares após tratamentos com inibidores de deacetilases de histonas sugerem a participação de deacetilases de histonas na manutenção da heterocromatina em ambas as espécies, o que está de acordo com os achados obtidos após as análises imunocitoquímicas. Esses achados também estão de acordo com outros previamente reportados por Richards & Elgin (2002), em que se propõe que a hipoacetilação de resíduos de lisina seja um dos principais fatores responsáveis pela formação da heterocromatina e silenciamento gênico.

Em relação à metilação da histona H3, que pode ser mono-, di- ou trimetilada, seu nível de metilação está frequentemente associado ao grau de ativação e silenciamento gênico. Estudos recentes demonstraram que na heterocromatina constitutiva há alta ocorrência de trimetilação de K9 da histona H3, enquanto a dimetilação da mesma histona neste resíduo ocorreria, mais

frequentemente, na heterocromatina facultativa (eucromatina silente) (Kimura et al., 2008). Nos núcleos das células epiteliais dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* e *P. megistus* é observado o mesmo padrão, com ocorrência de mono- e dimetilação da histona H3 somente na eucromatina e ocorrência de trimetilação no mesmo resíduo de H3 no cromocentro e em algumas áreas pontuais na eucromatina. Em leveduras de fissão foi demonstrado que a presença de metilação nos resíduos de lisina 4 e 9 da histona H3 em áreas eucromáticas adjacentes é importante para dar suporte às associações com a heterocromatina (Kouzarides, 2007). Logo, uma função primordial das modificações epigenéticas consistiria na definição e preservação de domínios distintos da cromatina.

É comum nos núcleos a presença de fatores associados à arquitetura cromatínica, tais como a *heterochromatin protein 1* (HP1- α), que pode atuar tornando mais compactas e repressivas as estruturas de ordem superior da cromatina (Kimmins & Sassone-Corsi, 2005; Allis et al., 2007). Neste estudo, a identificação da presença de HP1- α não foi possível, provavelmente porque os peptídeos utilizados no desenvolvimento dos anticorpos sofreram muitas alterações ao longo do processo evolutivo deixando de haver, portanto, sítios de ligação aos anticorpos, mesmo que estes fossem policlonais. Além disso, os anticorpos disponíveis para compra normalmente são produzidos contra a HP1- α de camundongos ou humanos, em função de questões de demanda. Assim, não houve resultados ao se utilizar anticorpos contra a proteína de camundongos ou mesmo de *Drosophila* para detectar a presença da mesma em hemípteros,

possivelmente porque não houve homologia entre a HP1- α da espécie hospedeira e a HP1- α de hemípteros, na suposição de que ela exista. Tal hipótese foi corroborada por meio do uso de ferramentas de bioinformática em que se realizou uma busca por sequências de HP1- α disponíveis no BLAST e, posteriormente, o alinhamento destas sequências via CLUSTAL W, demonstrando que a proteína foi bastante alterada durante a evolução e os organismos que a apresentam compartilham pouca similaridade de sequência.

4.2. Frequências de núcleos e fenótipos nucleares após tratamentos com drogas inibidoras de deacetilases de histonas

Quanto às análises de fenótipos nucleares, o fato de alguns espécimes controle de *T. infestans* e *P. megistus* apresentarem fenótipos nucleares que diferem do fenótipo normal pode ser creditado a um evento regular ou a algum fator estressante anterior aos tratamentos com os inibidores de deacetilases de histonas. Nesse sentido, a recusa à alimentação, as variações de temperatura ou a presença de vírus de RNA (Dolder & Mello, 1978), que às vezes ocorrem em espécimes aparentemente saudáveis, poderiam agir como estressores.

Nota-se que tanto mecanismos de sobrevivência celular (H_D) como de morte celular (NE) podem ser ativados em resposta à ação da TSA, do VPA e do NaBt em *T. infestans* e *P. megistus*, possivelmente contribuindo para a proteção das células dos túbulos de Malpighi contra danos mais severos. Do mesmo modo, o aumento concomitante na frequência de fenótipos como NE e A_S , NE e A mostra

que a necrose e a apoptose podem estar acontecendo no mesmo órgão, quando o mecanismo de sobrevivência celular (H_D , por exemplo) não está atuante, embora seja difícil vislumbrar a extensão da participação da apoptose nesse processo de proteção das células dos túbulos de Malpighi, já que são pouco frequentes após os tratamentos com TSA, VPA ou NaBt. Entretanto, correlações negativas observadas entre NE e A em tempos mais longos de exposição aos tratamentos podem indicar a prevalência de um mecanismo de morte celular sobre o outro ao longo do tempo. Isto também poderia explicar a alternância entre mecanismos de sobrevivência e morte celular em alguns casos, representada pela correlação positiva entre H_D e A em tempos mais curtos de exposição aos tratamentos e negativa em tempos mais longos. Em *T. infestans*, a correlação positiva entre a ocorrência de A e A_S após alguns tratamentos, reflete a possibilidade de A_S progredir para o processo de morte celular apoptótico.

No caso dos tratamentos com a maior concentração de TSA, o leve aumento da ocorrência de H_D com o aumento do tempo de exposição à droga indica que a ação da mesma sobre a cromatina apresenta efeitos representativos somente em tempos mais elevados de exposição, como demonstrado para outros organismos (El-Khoury et al., 2004; Tóth et al., 2004).

Nos casos de fenótipos H_D induzidos por TSA, o aumento na área nuclear total sugere também descompactação de áreas eucromáticas, possivelmente permitindo acetilação de histonas localizadas em regiões pontuais numa região cromatínica não tão condensada como a do cromocentro. Em consequência,

poderia ocorrer ativação de fatores de remodelação celular (Maalouf et al., 2009). Atualmente, muito se estuda a respeito da relação entre a reorganização nuclear e a reprogramação genômica.

Em *P. megistus*, o aumento da concentração de TSA provocou diminuição da ocorrência de núcleos normais, em função do aumento na frequência dos fenótipos alterados como consequência do tratamento. Nesse sentido, o aumento na ocorrência de núcleos G se reflete no número total de núcleos e na frequência de núcleos normais, por causa das fusões nucleares/celulares de que resultam.

Sabe-se, que apenas em concentrações mais elevadas do que as aqui utilizadas a droga pode induzir efeito citostático, diferenciação celular e aumentar a ocorrência de apoptose, não sendo produzidos efeitos similares em doses mais baixas em outros tipos celulares (Yamashita et al., 2003; Tóth et al., 2004), o que explicaria as baixas frequências de apoptose aqui obtidas em insetos submetidos aos tratamentos com TSA. O aumento na ocorrência de necroses após os tratamentos com TSA e também após a injeção de DMSO em *T. infestans* indica uma ação tóxica desse meio de diluição da droga.

Já após os tratamentos com VPA, o aumento no tempo de exposição à droga, bem como o aumento na concentração da droga, levou ao aumento na ocorrência de morte celular por necrose. Além disso, como já esperado, o aumento da ocorrência de fenótipos alterados diminuiu a frequência de núcleos normais e do número total de núcleos. A baixa ocorrência de apoptoses sob a ação do VPA também vem sendo descrita em outros estudos, como exemplo,

realizados com múltiplas linhagens de mielomas, mostrando que a citotoxicidade do VPA é variável conforme o tipo celular e que, nestas células, o VPA induz mais frequentemente formas de morte celular não apoptóticas, como a necrose e/ou a autofagia (Schwartz et al., 2007). Em células humanas, sabe-se que os inibidores de HDACs aumentam a ocorrência de necroses, por meio da indução da liberação de HMGB1, uma proteína que atua na conformação da cromatina, e que, uma vez livre, atuaria como indutor de inflamação resultando nas necroses (Scaffidi et al., 2002).

Recentemente tem-se demonstrado que inibidores de HDACs, como o VPA, podem aumentar os níveis de metilação na histona H3 em seu resíduo de lisina 4. Esta modificação epigenética está normalmente relacionada à ativação da transcrição e também contribui para o acúmulo de acetilações em células animais em cultura (Tung & Winn, 2010). Além disso, outros achados apontam que o VPA possa induzir a expressão de genes que são regulados por metilação de DNA (Mitchell et al., 2005; Dong et al., 2007; Perisic et al., 2009) e que essa ação demetilante do VPA seria gene-específica (Milutinovic et al., 2007). Como nestas espécies de reduviídeos a metilação de DNA ocorre predominantemente na eucromatina (Alvarenga et al., 2011), talvez a descompactação da cromatina pouco significativa após tratamentos com VPA seja devida a esse fato, dado que a principal ação desse inibidor de deacetilases estaria ocorrendo sobre a eucromatina e, em menor extensão, no cromocentro.

A diminuição na frequência de núcleos normais após alguns tratamentos

com NaBt em *T. infestans* e *P. megistus* pode ser justificada pelo aumento na ocorrência de morte celular (NE) e de descompactação da cromatina (H_D) e também pela possível ativação de fusão nuclear e/ou celular, originando os núcleos gigantes (G). A ocorrência de erros operacionais (perdas de pequenas secções dos túbulos de Malpighi) também justificaria uma menor frequência de núcleos normais e a diminuição do número total de núcleos encontrados, quando a frequência de núcleos gigantes não sofreu aumento significativo.

Estudos realizados com células tumorais apontam que a inibição do crescimento celular e a indução de apoptose pelo NaBt são dose-dependentes e também podem variar em função do tempo de exposição à droga. Em células epiteliais do cólon de camundongos, experimentos realizados com concentrações e tempos de exposição à droga próximos dos aqui utilizados demonstram que o tipo de morte celular induzida pelo NaBt é a necrose e que praticamente não há indicadores da ocorrência de apoptose (Matsumoto et al., 2006). Da mesma forma, em células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* e *P. megistus* não há aumento significativo nas frequências de apoptose após os tratamentos com NaBt, o que poderia ser explicado pelas distintas características deste tipo celular. Levando-se em conta a elevada ocorrência de necroses após os tratamentos com este inibidor de deacetilases de histonas, pode-se supor que neste tipo celular, assim como nas células epiteliais colônicas de camundongos, a resposta à ação da droga desencadeie a morte celular por necrose e não por apoptose.

Ainda com respeito à apoptose, este fenômeno de morte celular ocorre em

baixos níveis mesmo em tecidos saudáveis de diferentes espécies animais (Hockenbery, 1995). Assim, a pouca observação desse fenótipo nuclear e a maior ocorrência de NE, em resposta a algumas condições experimentais, podem ser creditadas a uma transição nos mecanismos de morte celular, sendo possivelmente os mesmos agentes responsáveis pelas baixas frequências de apoptose os que produzem aumento nas frequências de necrose com o avanço do tempo de tratamento. Em células normais e tumorais murinas sujeitas a choques de temperatura, o aumento inicial do índice apoptótico é seguido por coexistência de núcleos necróticos e apoptóticos, após o quê tem-se o aumento de núcleos necróticos (Harmon et al., 1990; Sakaguchi et al., 1995). O processo de morte celular em hepatócitos e também em células HeLa é representado por uma transição apoptose-necrose, que depende do nível de comunicação intercelular. Sobre isto, sabe-se que hemicanais formados por conexina 32 aceleram a transformação de células em fase inicial de apoptose para um estado necrótico (Kalvelyte et al., 2003; Vinken et al., 2010). Desse modo, a maior ocorrência de NE em células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* e de *P. megistus* talvez possa ser explicada por um mecanismo semelhante, em que a ocorrência de apoptoses seja um fenômeno de pequenas proporções, surgindo a necrose como etapa final do processo de morte celular.

Além disso, em *P. megistus*, o aumento na ocorrência de núcleos NE ocorreu nos maiores tempos de exposição ao tratamento com NaBt, o que estaria de acordo com o fato de que a apoptose costuma ser ativada pouco após o

estresse ou injúria, enquanto a necrose predomina no caso de danos mais duradouros e severos (Harmon et al., 1990).

Assim, sugere-se participação de deacetilases de histonas na compactação da heterocromatina de *T. infestans* e de *P. megistus*, em razão de aumento na frequência de núcleos com descompactação das áreas heterocromáticas após tratamentos com TSA e NaBt. No caso do tratamento com VPA, a ausência de um aumento significativo na descompactação cromatínica, tanto em *T. infestans* quanto em *P. megistus*, pode ser justificada pelo fato da droga requerer um tempo de exposição mais prolongado e altas concentrações para regular a descompactação da cromatina (Marchion et al., 2005).

4.3. Ocorrência de mudas e alteração na sobrevivência dos insetos

Quanto às alterações na ocorrência de muda e na sobrevivência de espécimes de *T. infestans* submetidos ao tratamento com VPA e à solução salina, alguns fatores alheios ao ensaio podem ter contribuído para a ocorrência dos resultados observados.

Em alguns estudos, reporta-se o tratamento de hemípteros com outras drogas. Contudo, a aplicação das substâncias costuma ser tópica, sendo estas aplicadas no dorso do inseto, e não injetadas como aqui foi realizado. Dessa forma, possivelmente, as alterações no desenvolvimento, semelhantes entre si, observadas após a injeção dos insetos com VPA e solução salina sejam devidas ao estresse da inoculação e não somente às soluções injetadas (Soderlund &

Knipple, 2003).

Normalmente, observa-se que, em razão da ação de certas drogas, o tempo para ocorrência de mudas pode ser prolongado e o número de insetos que sofreram a muda também pode ser alterado, como observado neste estudo. Acredita-se que a diminuição da ocorrência de mudas pode ser consequência da insuficiência de oxigênio necessário à síntese proteica. Além disso, admite-se que a falta de oxigênio possa interferir com o sistema endócrino, inibindo a secreção do hormônio de muda (Arends & Rabinovich, 1980). Contudo, em um ensaio experimental como o aqui realizado é possível apenas apontar como hipótese a falta de oxigênio como a causa para a diminuição da ocorrência de mudas nestes insetos, já que aqui não foi realizado nenhum teste de respirometria.

5. Conclusões

1. A heterocromatina em células somáticas de *T. infestans* e *P. megistus* apresenta histonas hipoacetiladas e altamente metiladas, indicando que a metilação de histonas contribui para a manutenção da heterocromatina nestas células.

2. Há ação de enzimas deacetilases de histonas na estruturação da cromatina nos cromocentros de ambas as espécies, o que foi indicado pela descompactação da cromatina após os tratamentos com drogas inibidoras destas enzimas.

3. Ninfas de *T. infestans* sujeitas a tratamento com VPA e submetidas à

injeção com solução salina tiveram seu desenvolvimento afetado, havendo diminuição do número de insetos que sofreram muda, retardo no período para ocorrência de muda e diminuição do tempo de sobrevivência, em relação aos insetos não injetados.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq, processo no. 47303/2009-7) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo no. 2010/50015-6). EMA e MLSM receberam bolsas do CNPq (processos no. 132341/2010-7 e 301943/2009-5, respectivamente).

Referências

- Aggarwal, B.D., Calvi, B.R., 2004. Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature – Letters to Nature* 430, 372-376.
- Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D., 2007. In *Epigenetics, Overview and Concepts*, eds Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), pp 23-62.
- Alvarenga, E.M., Mondin, M., Martins, J.A., Rodrigues, V.L.C.C., Vidal, B.C., Rincones, J., Carazzolle, M.F., Andrade, L.M., Mello, M.L.S., 2011. Spatial distribution of AT- and GC-rich DNA within interphase cell nuclei of *Triatoma infestans* Klug. *Micron* 42, 568-578.
- Álvares, R.S., Mello, M.L.S., 1987. Alterações nos fenótipos nucleares de células somáticas com diferentes graus de ploidia em espécimes de *Triatoma infestans* submetidos à radiação. *Ciênc Cult (Supl)* 39, 778-779.
- Andrade, C.G.T.J.; Mello, M.L.S., 1987. Phenotypes and number of Malpighian tubule nuclei in *Triatoma infestans* along development and starvation. *Braz J*

- Genetics 10, 449-457.
- Arends, A., Rabinovich, J.E., 1980. Effects of sublethal dose exposure to Dieldrin on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Acta Tropica* 37, 5-15.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., Kouzarides, T., 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120–124.
- Bolden, J.E., Peart, M.J., Johnstone, R.W., 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews/Drug Discovery* 5, 769-784.
- Bressa, M.J., Larramendy, M.L., Papeschi, A.G., 2005. Heterochromatin characterization in five species of Heteroptera. *Genetica* 124, 307–317.
- Campos, S.G.P., Rodrigues, V.L.C.C., Mello, M.L.S., 2002. Changes in nuclear phenotype frequencies following sequential cold shocks in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 857-864.
- Dantas, M.M., Mello, M.L.S., 1992. Changes in the nuclear phenotypes of *Triatoma infestans* Klug, induced by thermal shocks. *Rev Bras Genet* 15, 509-519.
- Dolder, H., Mello, M.L.S., 1978. Virus-like particles in the Malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. *Cell Mol Biol* 23, 299–310.
- Dong, E., Guidotti, A., Grayson, D.R., Costa, E., 2007. Histone hyperacetylation induces demethylation of reelin and 67-kDa glutamic acid decarboxylase promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4676–4681.
- Elgin, S.C.R., Grewal, S.I.S., 2003. Heterochromatin: silence is golden. *Current*

Biology 13, R895-R898.

- El-Khoury, V., Gomez, D., Liautaud-Roger, F., Trussardi-Régnier, A., Dufer, J., 2004. Effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on nuclear texture and c-jun gene expression in drug-sensitive and drug-resistant human H69 lung carcinoma cells. *Cytometry Part A* 62A, 109–117.
- Eyal, S., Yagen, B., Sobol E., Altschuler Y., Shmuel M., Bialer M., 2004. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45, 737-744.
- Flores-Ancona, R.M., García-Gómez, F.Y., Jiménez-Betanzos, A.M., Solis-Paredes, M., Castro-Leyva, V., Cruz-Orea, A., Arenas-Huertero, F., Ramón-Gallegos, E., 2009. Effects of sodium butyrate on cell death induced by Photodynamic Therapy in U373-MG and D54-MG astrocytoma cell lines. *Photochem Photobiol* 85, 1182-1188.
- Garcia SL, Mello MLS, Garcia NL, Rodrigues VLCC, 2000. Changes in nuclear phenotypes following cold shock in *Panstrongylus megistus* (Burmeister). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95, 893-898.
- Garcia, S.L., Rodrigues, V.L.C.C., Garcia, N.L., Mello, M.L.S., 2011. Prevalence and intensity of infection, metacyclogenesis and nuclear phenotypes in *Panstrongylus megistus* (Burmeister) after ingestion of *Trypanosoma cruzi* (Chagas) II and subjection to heat shock. *Braz J Biol* 71, 491-500.
- Grewal, S.I., Moazed, D., 2003. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798-802.
- Harmon, B.V., Corder, A.M., Collins, R.J., Gobe, G.C., Allan, D.J., 1990. Cell death

- induced in a murine mastocytoma by 42–47°C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int J Radiat Biol* 58, 854–858.
- Hockenbery, D., 1995. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 146, 16–19.
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., Nakatani, Y., 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463–473.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., Jacobsen, S.E., 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416, 556–560.
- Jasencakova, Z., Meister, A., Walter, J., Turner, B.M., Schubert, I., 2000. Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *The Plant Cell* 12, 2087–2100.
- Jasencakova, Z., Meister, A., Schubert, I., 2001. Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma* 110, 83–92.
- Kalvelyte, A., Imbrasaitė, A., Bukauskiene, A., Verselis, V.K., Bukauskas, F.F., 2003. Connexins and apoptotic transformation. *Biochem Pharmacol* 66, 1661–1672.
- Kimmins, S., Sassone-Corsi, P., 2005. Chromatin remodeling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434, 583–589.

- Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., Goto, Y., Takizawa, N., Nozaki, N., 2008. The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Structure and Function* 33, 61-73.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Maalouf, W. E., Liu, Z., Brochard, V., Renard, J. P., Debey, P., Beaujean, N., Zink, D., 2009. Trichostatin A treatment of cloned mouse embryos improves constitutive heterochromatin remodeling as well as developmental potential to term. *BMC Dev Biol* 9, 11.
- Marchion, D.C., Bicaku, E., Daud, A.I., Sullivan, D.M., Munster, P.N., 2005. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 65, 3815-3822.
- Maria, S.S., Vidal, B.C., Mello, M.L.S., 2000. Image analysis of DNA fragmentation and loss in V79 cells under apoptosis. *Genet Cell Biol* 23, 109-112.
- Matsumoto, T., Hayasaki, T., Nishimura, Y., Nakamura, M., Takeda, T., Tabuchi, Y., Obinata, M., Hanawa, T., Yamada, H., 2006. Butyrate induces necrotic cell death in murine colonic epithelial cell MCE301. *Biol Pharm Bull* 29, 2041-2045.
- McMurry, M.T., Krangel, M.S., 2000. A role for histone acetylation in the developmental regulation of V(D)J recombination. *Science* 287, 495–498.
- Mello, M.L.S., 1971. Nuclear behaviour in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv., Hemiptera). *Cytologia* 36, 42-49.

- Mello, M.L.S., 1975. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. *Rev. Brasil. Pesq. Méd. Biol.* 8, 101-107.
- Mello, M.L.S., 1978. Computer analysis of stained chromatin on Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). *Mikroskopie* 34, 285-299.
- Mello, M.L.S., 1989. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Revta. brasil. Genét.* 12, 485-498.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 1978. A reação de Feulgen. *Ciênc. Cult.* 30, 665-676.
- Mello, M.L.S., Randi, M.A., Giorgio, S., Ferraz-Filho, A.N., Rodrigues, V.L.C.C., Rocha-e-Silva, E.O., Cordeiro, J.A., 1986. Number of chromosomes, Feulgen-DNA content and nuclear phenotypes in domestic and wild specimens of *Panstrongylus megistus*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 80, 641-648.
- Mello, M.L.S., Kubrusly, F.S., Randi, M.A.F., Rodrigues, V.L.C.C., Ferraz-Filho, A.N., 1995. Effect of heavy metals on chromatin supraorganization nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. *Entom exp appl* 74, 209-218.
- Mello, M.L.S., Tavares, M.C.H., Dantas, M.M., Rodrigues, V.L.C.C., Maria-Engler, S.S., Campos, S.P., Garcia, N.L., 2001. Cell death and survival alterations in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* following heat shock. *Biochem. Cell Biol.* 79, 709-717.
- Mello, M.L.S., Aldrovani, M., Moraes, A.S., Guaraldo, A.M.A., Vidal, B.C., 2009. DNA content, chromatin supraorganization, nuclear glycoproteins and RNA

- amounts in hepatocytes of mice expressing insulin-dependent diabetes. *Micron* 40, 577-585.
- Milutinovic, S., D'Alessio, A.C., Detich, N., Szyf, M., 2007. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 28, 560–571.
- Mitchell, C.P., Chen, Y., Kundakovic, M., Costa, E., Grayson, D.R., 2005. Histone deacetylase inhibitors decrease reelin promoter methylation in vitro. *J Neurochem* 93, 483-492.
- Moazed, D., 2001. Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell* 8, 489-498.
- Perisic, T., Zimmermann, N., Kirmeier, T., Asmus, M., Tuorto, F., Uhr, M., Holsboer, F., Rein, T., Zschocke, J., 2009. Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 35, 792–805.
- Peters, A.H.F.M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., Jenuwein, T., 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323–337.
- Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Klein, P.S., 2001. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276, 36734–36741.

- Phillips, S.G., Phillips, D.M., 1971. Nucleoli of diploid cell strains. The normal ultrastructure and the effects of toyocamycin and actinomycin D. *J Cell Biol* 49, 785-802.
- Richards, E.J., Elgin, S.C.R., 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489–500.
- Sakaguchi, Y., Stephens, L.C., Makino, M., Kaneko, T., Strebel, F.R., Danhauser, L.L., Jenkins, G.N., Bull, J.M.C., 1995. Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia. *Cancer Res* 55, 5459–5464.
- Sawa, H., Murakami, H., Ohshima, Y., Sugino, T., Nakajyo, T., Kisanuki, T., Tamura, Y., Satone, A., Ide, W., Hashimoto, I., Kamada, H., 2001. Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein Bad. *Brain Tumor Pathol* 18, 109-114.
- Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E., 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
- Schofield, C.J., Jannin, J., Salvatella, R., 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22, 583–588.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., Reuter, G., 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* 21, 1121-1131.
- Schreiber, G., Bogliolo, A.R., Pinto, A.C., 1972. Cytogenetics of Triatominae:

- caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes. *Braz. J. Biol.* 32, 255-263.
- Schwartz, C., Palissot, V., Aouali, N., Wack, S., Brons, N.H.C., Leners, B., Bosseler, M., Berchem, G., 2007. Valproic acid induces non-apoptotic cell death mechanisms in multiple myeloma cell lines. *Int J Oncol* 30, 573-582.
- Shao, G.B., Ding, H.M., Gao, W.L., Li, S.H., Wu, C.F., Xu, Y.X., Liu, H.L., 2009. Effect of trichostatin A treatment on gene expression in cloned mouse embryos. *Theriogenology* 71, 1245–1252.
- Soderlund, D.M., Knipple, D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 563-577.
- Soppe, W.J.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., Fransz, P.F., 2002. DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 21, 6549–6559.
- Souza, W., 2007. Chagas' disease: facts and reality. *Microbes and Infection* 9, 544–545.
- Tóth, K.F., Knoch, T.A., Wachsmut, M., Frank-Stöhr, M., Stöhr, M., Bacher, C.P., Müller, G., Rippe, K., 2004. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* 117, 4277-4287.
- Tung, E.W.Y., Winn, L.M., 2010. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 248, 201–209.
- Vidal, B.C., 1984. Polyploidy and nuclear phenotypes in salivary glands of the rat.

- Biol Cell 50, 137-146.
- Vidal, B.C., Russo, J., Mello, M.L.S., 1998. DNA content and chromatin texture of benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis. *Exp. Cell Res.* 244, 77-82.
- Vidal, B.C., Schlüter, G., Moore, G.W., 1973. Cell nucleus pattern recognition: influence of staining. *Acta Cytol* 17, 510-521.
- Vinken, M., Decrock, E., De Vuyst, E., De Bock, M., Vandenbroucke, R.E., De Geest, B.G., Demeester, J., Sanders, N.N., Vanhaecke, T., Leybaert, L., Rogiers, V., 2010. Connexin32 hemichannels contribute to the apoptotic-to-necrotic transition during Fas-mediated hepatocyte cell death. *Cell Mol Life Sci* 67, 907–918.
- Yamashita, Y., Shimada, M., Harimoto, N., Rikimaru, T., Shirabe, K., Tanaka, S., Sugimachi, K., 2003. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells. *Int J Cancer* 103, 572–576.

Tabela 1. Sumário dos principais achados obtidos após os procedimentos imunocitoquímicos em células epiteliais dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* e *P. megistus*.

Espécies	Marcadores epigenéticos					
	H3K9Ac	H4K8Ac	H4K16Ac	H3K9Me	H3K9Me ₂	H3K9Me ₃
<i>Triatoma infestans</i>		E: positiva		E: positiva		E: positiva
	E: positiva	H: negativa	E: positiva	H: negativa	E: positiva	H: positiva
	H: negativa	Em alguns núcleos, resposta positiva mais intensa ao redor do cromocentro.	H: negativa	Em alguns núcleos, resposta positiva mais intensa ao redor do cromocentro.	H: negativa	Resposta positiva mais intensa na heterocromatina, em relação à eucromatina.
<i>Panstrongylus megistus</i>				E: positiva		E: positiva
	E: positiva	E: positiva	E: positiva	H: negativa	E: positiva	H: positiva
	H: negativa	H: negativa	H: negativa	Em alguns núcleos, resposta positiva mais intensa ao redor do cromocentro.	H: negativa	Resposta positiva mais intensa ao redor do cromocentro.

E: indicação da resposta obtida na eucromatina (positiva ou negativa) após procedimento imunocitoquímico. H: indicação da resposta obtida na heterocromatina (positiva ou negativa) após procedimento imunocitoquímico.

Tabela 2. Frequências absolutas de fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de *T. infestans* após tratamento com TSA.

Tempo de Tratamento (h)	Tratamentos	Fenótipos Nucleares															
		H _D		G		A		A _S		NE		N _{ID}		N		TOTAL	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
1	Controle 1	665,50	267,99	2,00	1,41	5,50	0,71	19,00	2,83	851,00^a	103,24	46,00	1,41	11324,00	1070,56	12913,00	905,10
	Controle 2	493,25	120,42	0,75	1,50	4,50	5,26	24,50	25,16	420,25	223,01	236,00	188,50	12772,00	1918,83	13951,25	1912,64
	Controle 3	443,00	206,76	0,33	0,58	5,33	4,04	20,00	6,56	643,00	93,00	73,00	37,04	12484,33	2302,24	13669,00	2231,94
	TSA 5 nM	819,67	226,36	0,00	0,00	1,00	1,73	7,00	6,08	657,00	592,29	213,00	194,89	11686,00	1451,99	13383,67	1107,82
	TSA 100 nM	536,67	175,91	2,00	2,00	4,00	3,00	13,67	7,51	675,67	101,79	52,67	8,14	11097,33	788,46	12382,00	596,21
24	Controle 2	768,25	324,02	0,50	1,00	1,25	1,26	7,50	3,79	1839,00^b	994,67	310,00	106,20	10340,00	2700,89	13266,50	2803,10
	Controle 3	1022,00	316,22	0,67	1,15	1,00	1,00	11,33	1,53	776,00^{a,c}	164,79	391,67	406,60	11828,00	940,68	14030,67	612,84
	TSA 5 nM	808,33	234,81	0,33	0,58	2,67	0,58	5,67	1,53	522,00^{a,c}	620,07	582,33	231,21	8630,00	1890,60	10551,33	2495,13
	TSA 100 nM	503,67	130,24	0,67	1,15	3,00	2,65	13,33	8,02	1409,67	439,61	565,00	450,46	10598,33	1301,18	13093,67	987,15
48	Controle 2	746,00	519,36	0,25	0,50	2,25	1,26	7,50	3,42	798,00	1086,45	122,75	24,06	11441,25	674,92	13118,00	830,25
	Controle 3	735,67	222,32	1,33	2,31	2,67	0,58	15,00	13,23	1254,33	385,13	206,00	236,66	12677,00	889,74	14892,00	916,24
	TSA 5 nM	797,33	270,83	1,00	1,00	1,00	1,73	6,00	2,65	546,00	344,82	245,33	180,36	10491,33	3394,04	12088,00	3726,69
	TSA 100 nM	895,33	64,29	0,67	0,58	1,67	0,58	5,33	4,93	788,00	576,48	79,33	56,44	11844,33	542,48	13614,67	414,20

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N_{ID}: núcleo com identificação prejudicada; N: núcleo normal; X: média; SD: desvio padrão. Controle 1: sem inoculação; controle 2: solução NaCl a 0,9%; controle 3: DMSO. Valores em negrito destacam diferenças estatisticamente significantes (letras diferentes na mesma coluna) reveladas pelo teste ANOVA (p < 0,05).

Tabela 3. Frequências absolutas de fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas machos de 5º estadio de *P. megistus* após tratamento com TSA.

Tempo de Tratamento (h)	Tratamentos	Fenótipos Nucleares															
		H _D		G		A		A _S		NE		N _{ID}		N		TOTAL	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
1	Controle 1	678,00	478,01	1,33	1,53	2,67	0,58	5,00	3,46	504,00	362,46	163,67	196,73	13548,33	4983,21	14903,00	5540,59
	Controle 2	1386,67	417,95	0,33	0,58	3,67	3,06	5,00	3,46	1618,67	1012,95	94,67	104,58	14150,33	3396,53	17259,33	3514,90
	Controle 3	569,00	397,52	0,67	1,15	2,67	2,08	3,33	1,53	605,00	472,03	299,67	462,16	13110,00	1462,78	14590,33	1538,62
	TSA 5 nM	1428,33	687,28	0,67	0,58	0,67	0,58	3,33	1,53	990,33	120,50	132,00	173,59	15222,00	1090,54	17777,33	1636,03
	TSA 100 nM	1683,00	666,52	1,00	1,00	0,67	1,15	4,00	2,65	1211,00	478,69	34,33	48,27	13073,67	3243,30	16007,67	3943,76
24	Controle 2	1260,25	1177,83	0,75	0,96	1,75	0,96	4,00	2,94	656,75	425,25	91,25	62,46	12972,25	2017,71	14987,00	3555,35
	Controle 3	1128,00	621,70	2,33	3,21	0,67	1,15	4,00	2,65	1214,00	765,75	297,67	146,23	15499,33	3115,18	18146,00	2625,96
	TSA 5 nM	1106,00	643,95	0,67	1,15	2,00	1,00	4,67	2,08	323,00	238,31	115,33	88,92	17793,33	705,86	19345,00	1156,84
	TSA 100 nM	817,00	141,99	1,00	1,00	1,67	0,58	3,33	1,53	953,33	596,45	145,33	141,76	15191,67	1178,19	17113,33	903,93
48	Controle 2	755,00	271,86	0,75	1,50	2,00	1,41	4,75	1,89	965,25	439,81	90,75	98,92	15876,75	1263,11	17695,25	1153,79
	Controle 3	993,67	587,09	0,33	0,58	1,67	1,15	3,33	1,53	1255,00	333,53	108,67	183,02	14705,67	2757,22	17068,33	2925,82
	TSA 5 nM	856,00	364,00	0,00	0,00	4,00	2,65	5,33	4,51	1071,67	818,36	29,00	50,23	16421,67	3119,48	18387,67	3575,29
	TSA 100 nM	1015,67	105,04	0,33	0,58	1,33	0,58	1,67	2,08	915,33	117,75	63,67	52,84	12953,67	2533,59	14951,67	2363,66

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N_{ID}: núcleo com identificação prejudicada; N: núcleo normal; X: média; SD: desvio padrão. Controle 1: sem inoculação; controle 2: solução NaCl a 0,9%; controle 3: DMSO.

Tabela 4. Coeficiente de correlação de Pearson e níveis de significância para comparações entre frequências absolutas de fenótipos nucleares de células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* obtidas após tratamentos controle e com TSA.

Grupos considerados nas comparações	Itens comparados	Correlação	<i>p</i>
Controle 1	A _S X A	0,987	0,000
	A X Total	0,815	0,048
Controle 3 - 1 h	A _S X A	0,890	0,017
Controle 3 - 1 h, 24 h e 48 h	NE X Tempo	0,739	0,000
TSA 5 nM - 1 h	HD X A	1,000	0,011
TSA 100 nM - 1 h	A _S X A	0,999	0,024
Controle 2 - 24 h	NE X A _S	0,977	0,023
Controle 3 - 24 h	HD X A _S	0,866	0,026
	N X A	-0,833	0,039
TSA 5 nM - 48 h	HD X A	-0,999	0,032
TSA 100 nM - 48 h	HD X A	-0,999	0,035
TSA 100 nM - 1 h, 24 h e 48 h	HD X Tempo	0,712	0,031

H_D: descompactação da heterocromatina; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose. Controle 1: sem inoculação; controle 2: solução NaCl a 0,9%; controle 3: DMSO.

Tabela 5. Coeficiente de correlação de Pearson e níveis de significância para comparações entre frequências absolutas de fenótipos nucleares de células dos túbulos de Malpighi de *P. megistus* obtidas após tratamentos controle e com TSA.

Grupos considerados nas comparações	Itens comparados	Correlação	p
Controle 3 - 1 h	G X Total	-0,999	0,032
Controle 3 - 24 h	NE X N	-0,997	0,046
	NE X Total	-0,997	0,047
TSA 5 nM - 24 h	HD X NE	0,998	0,038
TSA 100 nM - 24 h	A X NE	-0,997	0,049
Controle 3 - 48 h	G X N	-0,998	0,039
TSA 100 nM - 48 h	HD X As	-1,000	0,002
TSA 5 nM - 1 h, 24 h e 48 h	A X Tempo	0,706	0,034
TSA 5 nM e 100 nM - 24 h	[] droga X N	-0,854	0,030

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N: núcleo normal; []: concentração. Controle 3: DMSO.

Tabela 6. Comparação de valores de Sc% e AAR para núcleos de fenótipo H_D de insetos tratados com TSA vs. normal em *T. infestans*.

Fenótipos	Sc%			Sc (μm ²)			AAR		
	X	SD	Md	X	SD	Md	X	SD	Md
Controle (N)	3,736	1,345	3,538 ^a	21,44	8,14	20,375 ^a	5,997	1,330	5,882 ^a
H_D	0,896	0,988	0,567 ^b	5,260	5,890	3,000 ^b	2,869	2,214	3,886 ^b

H_D: descompactação da heterocromatina; Md: mediana; n (número de núcleos celulares), 20; S: desvio padrão; Sc%: área de cromatina condensada em relação a área nuclear; X: média. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p <0,05; Teste Mann-Whitney).

Tabela 7. Frequências absolutas de fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de *T. infestans* após tratamento com VPA.

Tempo de Tratamento (h)	Tratamentos	Fenótipos Nucleares															
		H _D		G		A		A _S		NE		N _{ID}		N		TOTAL	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
1	Controle 1	493,33	353,32	1,33	1,53	3,67	3,21	13,00	10,58	655,33^a	346,68	90,67	77,37	10925,33^a	1024,62	12182,67^a	1417,66
	Controle 2	493,25	120,42	0,75	1,50	4,50	5,26	24,50	25,16	420,25^a	223,01	236,00	188,50	12772,00^a	1918,83	13951,25^a	1912,64
	VPA 0,05 mM	755,67	532,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,58	550,33	118,71	164,67	99,61	7771,67^b	692,74	9242,67^b	631,09
	VPA 0,5 mM	621,00	45,08	0,00	0,00	0,33	0,58	0,00	0,00	1091,00^b	232,86	87,00	106,53	7838,67^b	1453,95	9638,00^b	1470,09
	VPA 1 mM	422,33	132,42	0,33	0,58	2,00	0,00	1,33	1,15	1005,67^b	119,35	8,33	14,43	8748,67^b	1147,10	10188,67^b	1406,50
24	Controle 2	768,25	324,02	0,50	1,00	1,25	1,26	7,50	3,79	1839,00	994,67	310,00	106,20	10340,00	2700,89	13266,50	2803,10
	VPA 0,05 mM	423,00	175,24	0,00	0,00	1,33	0,58	1,00	1,73	1620,33	215,35	45,33	54,64	8684,00	173,39	10775,00	447,44
	VPA 0,5 mM	612,67	97,49	1,67	1,15	1,33	0,58	0,67	0,58	834,00	561,92	59,33	26,01	9074,00	669,01	10583,67	1117,63
	VPA 1 mM	384,33	114,17	0,67	1,15	1,00	1,00	0,67	0,58	1630,00	512,09	83,67	61,26	8120,67	509,50	10221,00	1125,84
48	Controle 2	746,00	519,36	0,25	0,50	2,25	1,26	7,50	3,42	798,00	1086,45	122,75	24,06	11441,25^a	674,92	13118,00^a	830,25
	VPA 0,05 mM	574,00	69,54	1,33	1,15	1,67	0,58	1,67	1,53	2102,33^b	658,24	10,67	6,11	8202,33^b	95,06	10894,00^b	621,93
	VPA 0,5 mM	735,00	356,09	0,00	0,00	2,67	3,06	1,33	1,53	1443,67	524,26	10,00	12,49	8193,33^b	1174,22	10386,00^b	945,84
	VPA 1 mM	353,67	68,92	0,33	0,58	2,67	1,53	1,33	0,58	1125,33	146,43	30,67	41,10	7575,67^b	360,23	9089,67^b	293,17

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N_{ID}: núcleo com identificação prejudicada; N: núcleo normal; X: média; SD: desvio padrão. Controle 1: sem inoculação; controle 2: solução NaCl a 0,9%. Valores em negrito destacam diferenças estatisticamente significantes (letras diferentes na mesma coluna) reveladas pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Tabela 8. Frequências absolutas de fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas machos de 5º estadio de *P. megistus* após tratamento com VPA.

Tempo de Tratamento (h)	Tratamentos	Fenótipos Nucleares															
		H _D		G		A		A _S		NE		N _{ID}		N		TOTAL	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
1	Controle 1	678,00	478,01	1,33	1,53	2,67	0,58	5,00	3,46	504,00^a	362,46	163,67	196,73	13548,33	4983,21	14903,00	5540,59
	Controle 2	1386,67	417,95	0,33	0,58	3,67	3,06	5,00	3,46	1618,67	1012,95	94,67	104,58	14150,33^a	3396,53	17259,33^a	3514,90
	VPA 0,05 mM	935,00	286,93	0,00	0,00	1,33	0,58	0,67	1,15	1094,33	587,56	172,33	197,50	10796,33	599,38	13000,00	946,31
	VPA 0,5 mM	796,00	337,96	1,67	2,89	2,00	2,00	1,67	0,58	1224,33^b	371,66	80,00	116,40	10239,67^b	2130,39	12345,33	1947,86
	VPA 1 mM	818,67	368,52	1,00	0,00	0,67	0,58	0,67	0,58	1126,67	241,05	62,67	105,10	9915,00^b	2134,16	11925,33^b	2225,64
24	Controle 2	1260,25	1177,83	0,75	0,96	1,75	0,96	4,00	2,94	656,75	425,25	91,25	62,46	12972,25	2017,71	14987,00	3555,35
	VPA 0,05 mM	736,00	122,17	1,00	1,00	0,33	0,58	0,33	0,58	1150,00	158,97	76,67	85,14	12205,33	850,90	14169,67	758,68
	VPA 0,5 mM	599,00	22,61	0,00	0,00	2,00	1,00	0,67	0,58	1054,67	40,43	5,33	2,52	11088,33	740,75	12750,00	753,25
	VPA 1 mM	503,67	313,45	1,33	1,15	2,00	1,73	1,33	1,53	1099,33	434,18	33,00	28,62	9381,67	85,92	11022,33	69,50
48	Controle 2	755,00	271,86	0,75	1,50	2,00	1,41	4,75	1,89	965,25	439,81	90,75	98,92	15876,75	1263,11	17695,25	1153,79
	VPA 0,05 mM	738,67	193,58	0,33	0,58	0,67	0,58	0,00	0,00	1082,00	232,23	233,67	164,78	10407,67	1148,77	12463,00	1131,03
	VPA 0,5 mM	827,00	140,68	1,33	0,58	2,67	2,08	1,33	1,53	1648,67	325,36	75,67	82,92	9315,00	210,86	11871,67	162,86
	VPA 1 mM	689,33	541,09	1,33	1,53	0,67	1,15	2,33	1,15	1158,67	364,30	114,67	120,24	7561,67	332,33	9528,67	474,78

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N_{ID}: núcleo com identificação prejudicada; N: núcleo normal; X: média; SD: desvio padrão. Controle 1: sem inoculação; controle 2: solução NaCl a 0,9%. Valores em negrito destacam diferenças estatisticamente significantes (letras diferentes na mesma coluna) reveladas pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Tabela 9. Coeficiente de correlação de Pearson e níveis de significância para comparações entre frequências absolutas de fenótipos nucleares de células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* obtidas após tratamentos com VPA vs. controle.

Grupos considerados nas comparações	Itens comparados	Correlação	p
VPA 1 mM - 1 h	NE X HD	0,999	0,026
VPA 0,05 mM - 24 h	NE X As	1,000	0,003
	A X N	-0,999	0,029
VPA 0,5 mM - 48 h	A X NE	-0,998	0,045
VPA 0,05 mM - 1 h, 24 h e 48 h	A X Tempo	0,830	0,006
	NE X Tempo	0,868	0,002
VPA 0,05 mM, 0,5 mM e 1 mM - 1 h	[] droga X A	0,901	0,001
VPA 0,05 mM, 0,5 mM e 1 mM - 48 h	[] droga X NE	-0,692	0,039

H_D: descompactação da heterocromatina; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N: núcleo normal; []: concentração.

Tabela 10. Coeficiente de correlação de Pearson e níveis de significância para comparações entre frequências absolutas de fenótipos nucleares de células dos túbulos de Malpighi de *P. megistus* obtidas após tratamentos com VPA vs. controle.

Grupos considerados nas comparações	Itens comparados	Correlação	p
VPA 0,5 mM - 1 h	HD X As	0,999	0,023
VPA 0,5 mM - 24 h	A X N	-1,000	0,017
VPA 0,5 mM - 48 h	HD X As	0,998	0,039
	G X NE	-0,997	0,047
	G X Total	-0,998	0,041
VPA 1,0 mM - 48 h	HD X As	-0,998	0,038
VPA 1,0 mM - 1 h, 24 h e 48 h	N X Tempo	-0,673	0,047
	Total X Tempo	-0,672	0,048
VPA 0,05 mM, 0,5 mM e 1 mM - 24 h	[] droga X N	-0,905	0,001
	[] droga X Total	-0,931	0,000
VPA 0,05 mM, 0,5 mM e 1 mM - 48 h	[] droga X As	0,722	0,028
	[] droga X N	-0,894	0,001
	[] droga X Total	-0,867	0,002

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N: núcleo normal; []: concentração.

Tabela 11. Frequências absolutas de fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de *T. infestans* após tratamento com NaBt.

Tempo de Tratamento (h)	Tratamentos	Fenótipos Nucleares															
		H _D		G		A		A _S		NE		N _{ID}		N		TOTAL	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
1	Controle 1	493,33^a	353,32	1,33	1,53	3,67	3,21	13,00	10,58	655,33^a	346,68	90,67	77,37	10925,33	1024,62	12182,67	1417,66
	Controle 2	493,25	120,42	0,75	1,50	4,50	5,26	24,50	25,16	420,25^a	223,01	236,00	188,50	12772,00	1918,83	13951,25	1912,64
	NaBt 10 mM	728,67	266,33	1,33	2,31	0,67	1,15	1,67	0,58	931,33	351,60	120,00	200,94	9726,33	1485,30	11510,00	1542,11
	NaBt 150 mM	907,33	293,40	0,00	0,00	1,67	1,15	3,67	2,08	1565,67^b	488,74	7,33	8,08	9937,67	1405,01	12423,33	1771,91
24	Controle 2	768,25	324,02	0,50	1,00	1,25	1,26	7,50	3,79	1839,00	994,67	310,00	106,20	10340,00	2700,89	13266,50	2803,10
	NaBt 10 mM	1325,00^b	381,74	0,67	1,15	2,00	1,73	4,33	4,93	882,00	341,62	78,67	110,39	11014,67	1639,24	13307,33	1619,14
	NaBt 150 mM	779,00	65,83	0,33	0,58	2,33	2,31	3,00	1,73	1428,33	313,22	13,33	21,39	10445,00	642,58	12671,33	541,87
48	Controle 2	746,00	519,36	0,25	0,50	2,25	1,26	7,50	3,42	798,00	1086,45	122,75	24,06	11441,25^a	674,92	13118,00	830,25
	NaBt 10 mM	1709,67^b	1027,86	1,33	1,53	1,33	0,58	3,33	3,21	910,00	226,16	296,00	186,43	7968,33^b	2031,57	10890,00	2360,94
	NaBt 150 mM	1167,33	378,89	0,33	0,58	2,00	1,00	2,33	3,21	1220,00	361,58	19,00	20,66	7931,33^b	533,51	10342,33	355,91

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N_{ID}: núcleo com identificação prejudicada; N: núcleo normal; X: média; SD: desvio padrão. Controle 1: sem inoculação; controle 2: solução NaCl a 0,9%. Valores em negrito destacam diferenças estatisticamente significantes (letras diferentes na mesma coluna) reveladas pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Tabela 12. Frequências absolutas de fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas machos de 5º estadio de *P. megistus* após tratamento com NaBt.

Tempo de Tratamento (h)	Tratamentos	Fenótipos Nucleares															
		H _D		G		A		A _S		NE		N _{ID}		N		TOTAL	
		X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
1	Controle 1	678,00^a	478,01	1,33	1,53	2,67	0,58	5,00	3,46	504,00^a	362,46	163,67	196,73	13548,33	4983,21	14903,00	5540,59
	Controle 2	1386,67	417,95	0,33	0,58	3,67	3,06	5,00	3,46	1618,67	1012,95	94,67	104,58	14150,33	3396,53	17259,33	3514,90
	NaBt 10 mM	1653,00^b	62,55	0,33	0,58	2,00	1,00	2,67	0,58	1319,67	442,98	58,67	99,03	12447,67	594,23	15484,00	955,43
	NaBt 150 mM	932,00	304,00	0,67	1,15	2,00	1,00	3,67	2,08	893,33	201,20	14,33	22,28	14954,67	1127,27	16800,67	877,13
24	Controle 2	1260,25	1177,83	0,75	0,96	1,75	0,96	4,00	2,94	656,75^a	425,25	91,25	62,46	12972,25	2017,71	14987,00	3555,35
	NaBt 10 mM	892,33	155,70	0,67	1,15	2,00	2,65	4,00	3,61	1519,33	634,61	329,00	252,33	9895,33	1831,40	12642,67	1524,82
	NaBt 150 mM	743,33	354,34	0,00	0,00	1,00	1,00	3,33	4,04	1854,33^b	404,44	16,33	14,84	13202,33	1096,77	15820,67	928,04
48	Controle 2	755,00	271,86	0,75	1,50	2,00	1,41	4,75	1,89	965,25^a	439,81	90,75	98,92	15876,75	1263,11	17695,25	1153,79
	NaBt 10 mM	1409,67	509,66	0,67	1,15	1,00	1,73	3,67	3,79	1190,00	513,91	154,67	245,72	11135,00	1689,12	13894,67	1599,10
	NaBt 150 mM	629,33	388,40	0,33	0,58	3,67	2,31	2,00	2,00	2171,33^b	410,84	1,33	1,53	10885,00	3451,68	13693,00	3493,95

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N_{ID}: núcleo com identificação prejudicada; N: núcleo normal; X: média; SD: desvio padrão. Controle 1: sem inoculação; controle 2: solução NaCl a 0,9%. Valores em negrito destacam diferenças estatisticamente significantes (letras diferentes na mesma coluna) reveladas pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Tabela 13. Coeficiente de correlação de Pearson e níveis de significância para comparações entre frequências absolutas de fenótipos nucleares de células dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* obtidas após tratamentos controle e com NaBt.

Grupos considerados nas comparações	Itens comparados	Correlação	<i>p</i>
NaBt 150 mM - 24 h	HD X A	1,000	0,010
	G X NE	1,000	0,005
NaBt 10 mM - 48 h	A X Total	-0,998	0,039
NaBt 150 mM - 48 h	HD X As	-0,999	0,023

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose.

Tabela 14. Coeficiente de correlação de Pearson e níveis de significância para comparações entre frequências absolutas de fenótipos nucleares de células dos túbulos de Malpighi de *P. megistus* obtidas após tratamentos controle e com NaBt.

Grupos considerados nas comparações	Itens comparados	Correlação	p
NaBt 10 mM - 24 h	G X Total	-1,000	0,005
NaBt 10 mM - 48 h	As X N	-0,998	0,037
NaBt 150 mM - 1 h, 24 h e 48 h	NE X Tempo	0,845	0,004
	N X Tempo	-0,680	0,044
NaBt 10 mM e 150 mM - 1 h	[] droga X HD	-0,895	0,016
	[] droga X N	0,862	0,027
NaBt 10 mM e 150 mM - 24 h	[] droga X Total	0,839	0,037

H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N: núcleo normal; []: concentração.

Tabela 15. Taxas de sobrevivência e tempo para ocorrência de mudas em ninfas de 5º estadio de *T. infestans* injetadas com VPA e solução salina e observadas ao longo de 280 dias.

Condições experimentais	n	Sobrevivência (%)	Tempo para ocorrência de muda (dias)				
			média	SD	mínimo	mediana	máximo
CT 1	20	50	24,18	14,84	1	23,00	44
CT 2	20	10	36,00	14,13	16	38,00	54
VPA	20	10	35,20	13,81	5	37,50	52

CT 1: controle não injetado; CT 2: controle injetado com solução salina; n: número de insetos utilizados em cada condição experimental; SD: desvio padrão; VPA: insetos injetados com ácido valproico a 1 mM.

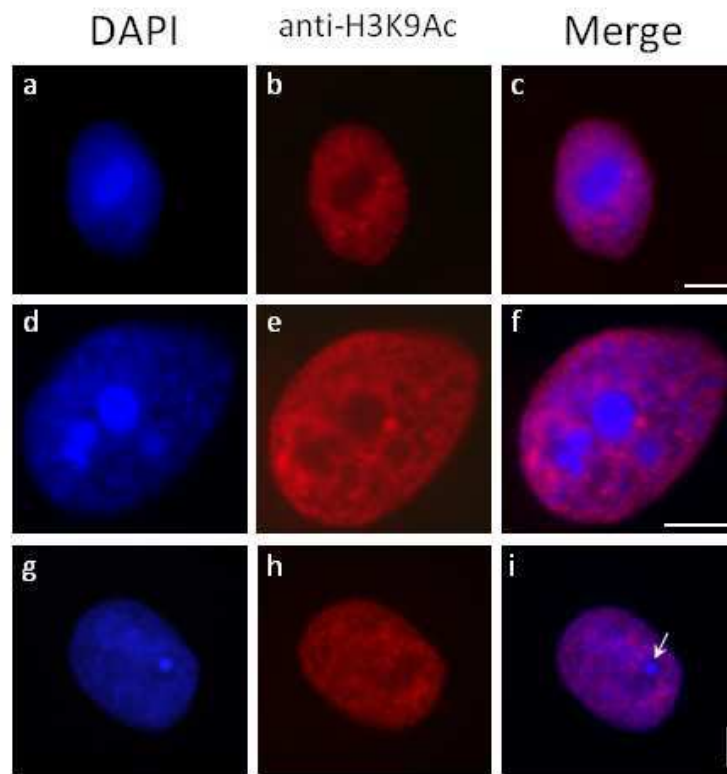


Fig. 1. Sinais de H3K9Ac demonstrados por imunocitoquímica em núcleos de células epiteliais dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* com um (b, c) e vários cromocentros (e, f) e em núcleos de *P. megistus* (h, i - seta) contracolorados com DAPI (a, c, d, f, g, i). A seta em i indica a área do cromocentro. Barras, 10 μ m.

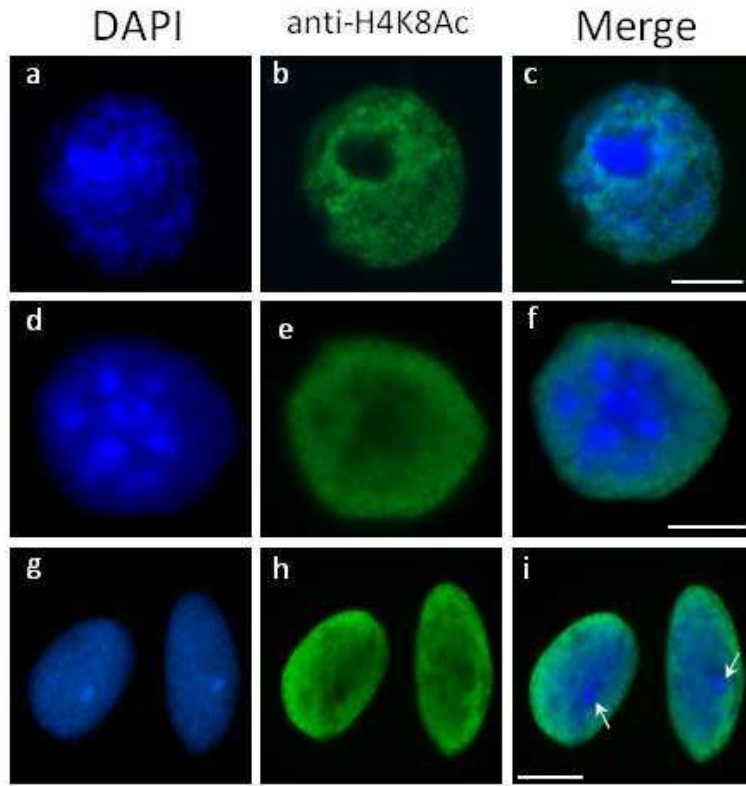


Fig. 2. Imunomarcção de H4K8Ac núcleos de células epiteliais dos tubules de Malpighi de *T. infestans* com um (b, c) ou vários cromocentros (e, f) e em núcleos de *P. megistus* (h, i - seta) contracorados com DAPI (a, c, d, f, g, i). As setas em i indicam a área do cromocentro. Barras, 10 μ m.

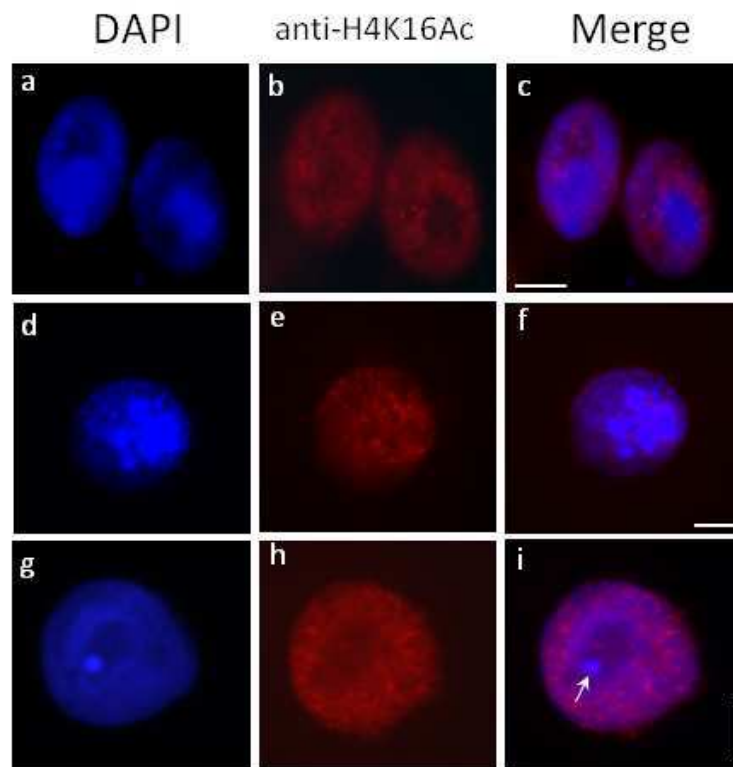


Fig. 3. Detecção imunquímica de H4K16Ac em núcleos de células epiteliais de túbulos de Malpighi de *T. infestans* com um (b, c) e vários cromocentros (e, f) e em núcleos de *P. megistus* (h, i - seta) contracolorados com DAPI (a, c, d, f, g, i). A seta em i indica a área do cromocentro. Barras, 10 μ m.

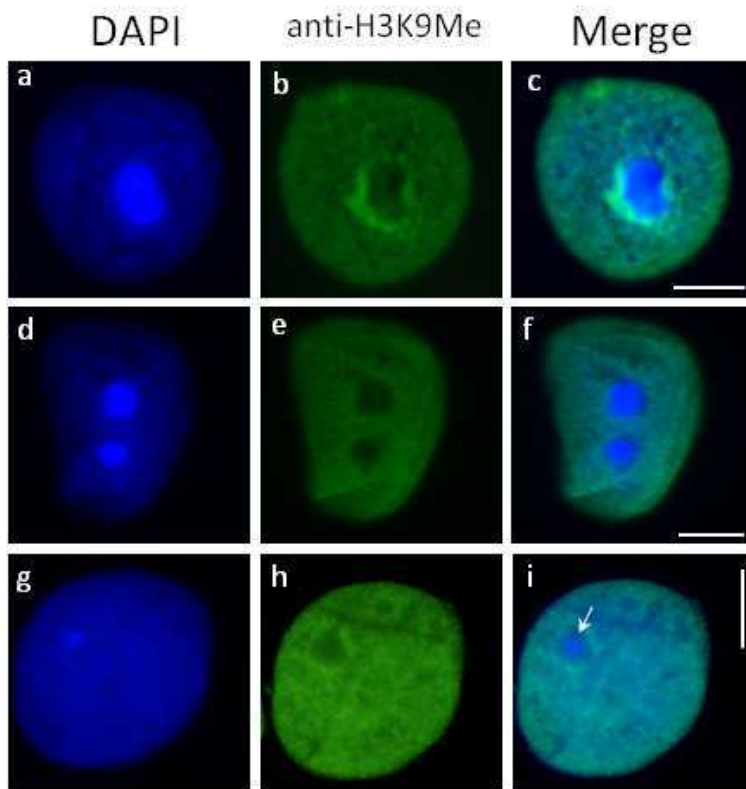


Fig. 4. Sinais verdes fluorescentes indicando H3K9Me em núcleos de *T. infestans* com um (b, c) e vários cromocentros (e, f) e em núcleos de *P. megistus* (h, i - seta) contracolorados com DAPI (a, c, d, f, g, i). A seta em i indica a área do cromocentro. Barras, 10 μ m.

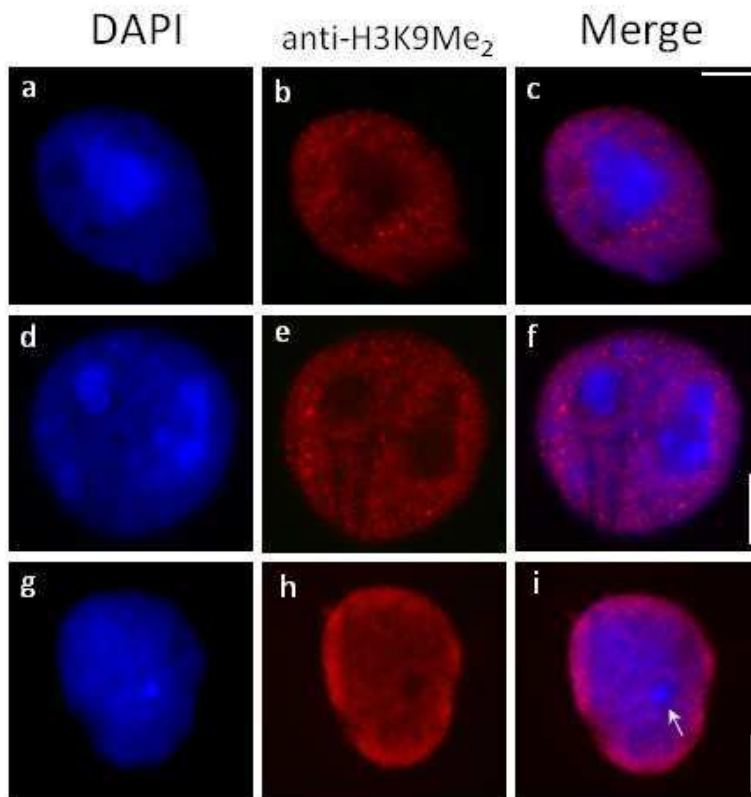


Fig. 5. Distribuição dos sinais fluorescentes indicando H3K9Me₂ em núcleos de células epiteliais dos túbulos de Malpighi de *T. infestans* com um (b, c) ou vários cromocentros (e, f) e em núcleos de *P. megistus* (h, i - seta) contracolorados com DAPI (a, c, d, f, g, i). A seta em i indica a área do cromocentro. Barras, 10 μm.

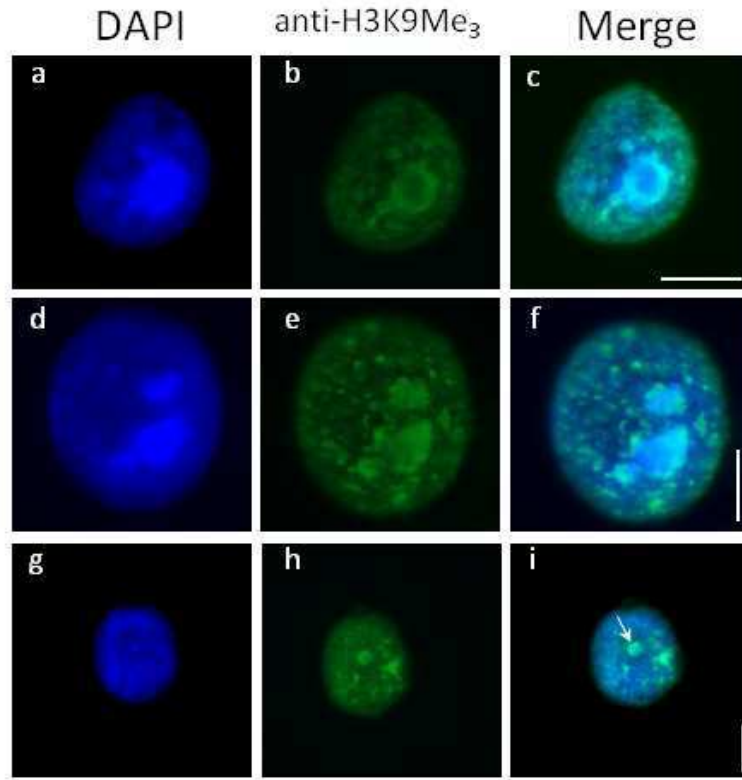


Fig. 6. Sinais representando H3K9Me₃ revelados por imunocitoquímica em núcleos de *T. infestans* com um (b, c) ou vários cromocentros (e, f) e em núcleos de *P. megistus* (h, i - seta) contracolorados com DAPI (a, c, d, f, g, i). A seta em i indica a área do cromocentro. Barras, 10 μm.

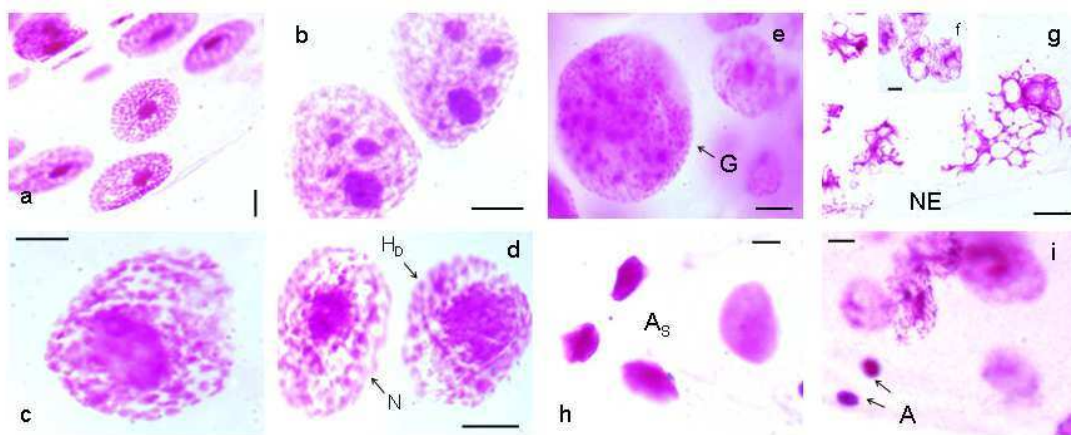


Fig. 7. Fenótipos nucleares em células epiteliais de túbulos de Malpighi de ninfas de 5º estadio de *T. infestans*. H_D: descompactação da heterocromatina; G: núcleo gigante; A: apoptose; A_S: suspeita de apoptose; NE: necrose; N: núcleo normal. Barras, 10 µm.

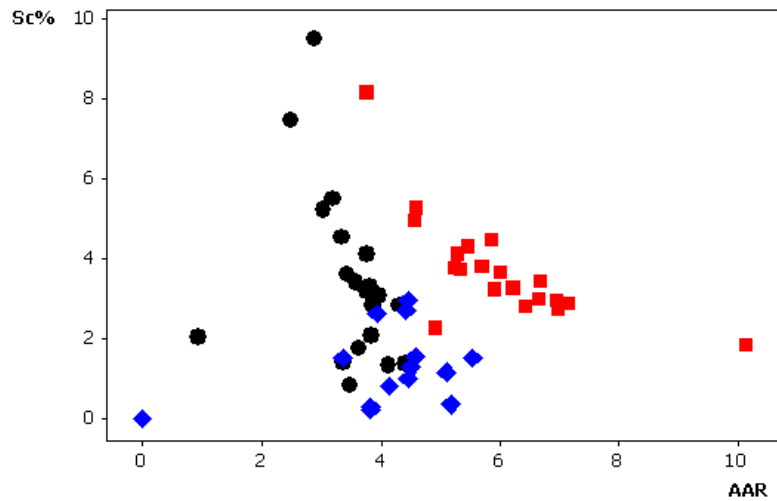


Fig. 8. Diagrama de dispersão Sc% versus AAR segundo Vidal (1984) para núcleos de *T. infestans* com corpo heterocromático único (controle, vermelho; insetos tratados com Tricostatina A, azul – núcleo com descompactação da cromatina) e núcleos com vários cromocentros (controle, preto).

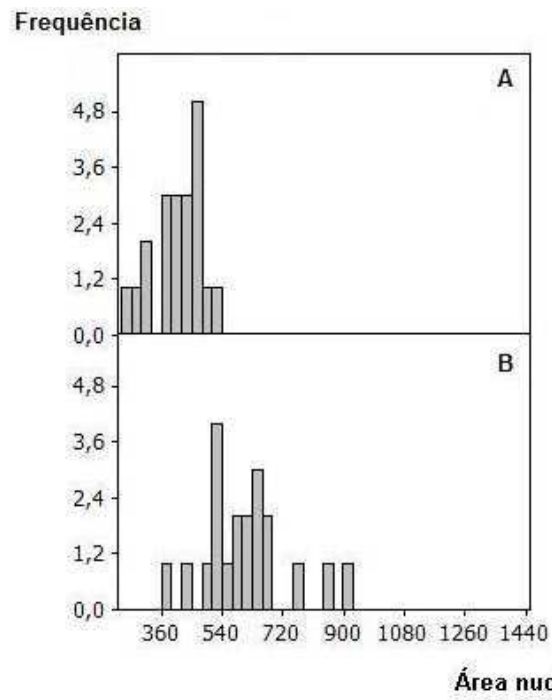


Fig. 9. Histogramas da área nuclear total (μm^2) para células de túbulos de Malpighi de *T. infestans* com um único cromocentro. (A) controle tratado com dimetilsulfóxido (DMSO), (B) núcleos com descompactação da cromatina em insetos tratados com Tricostatina A.

Frequência

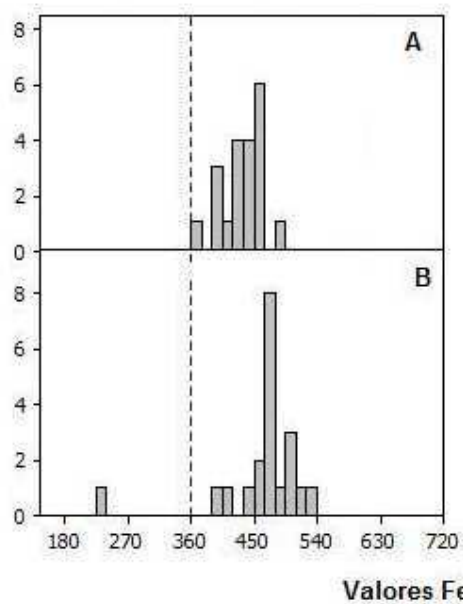


Fig. 10. Histogramas de valores Feulgen – DNA (unidades arbitrárias) para núcleos de células de túbulos de Malpighi de *T. infestans* com um único cromocentro. (A) controle tratado com dimetilsulfóxido (DMSO), (B) núcleos de insetos tratados com Tricostatina A com descompactação da cromatina.

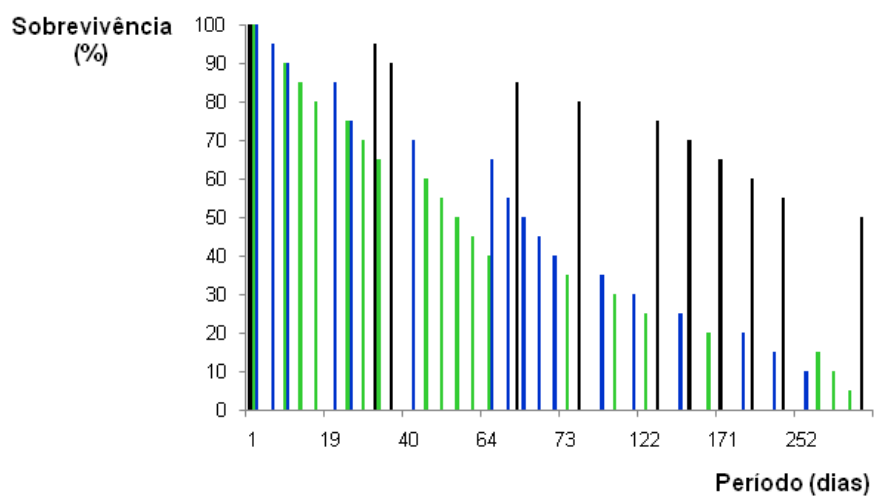


Fig. 11. Sobrevivência de ninfas de 5º estadio de *T. infestans* submetidas à injeção com solução salina (verde; n = 20) e ácido valproico a 1 mM (azul; n = 20), em comparação a controles não injetadas (preto; n = 20).

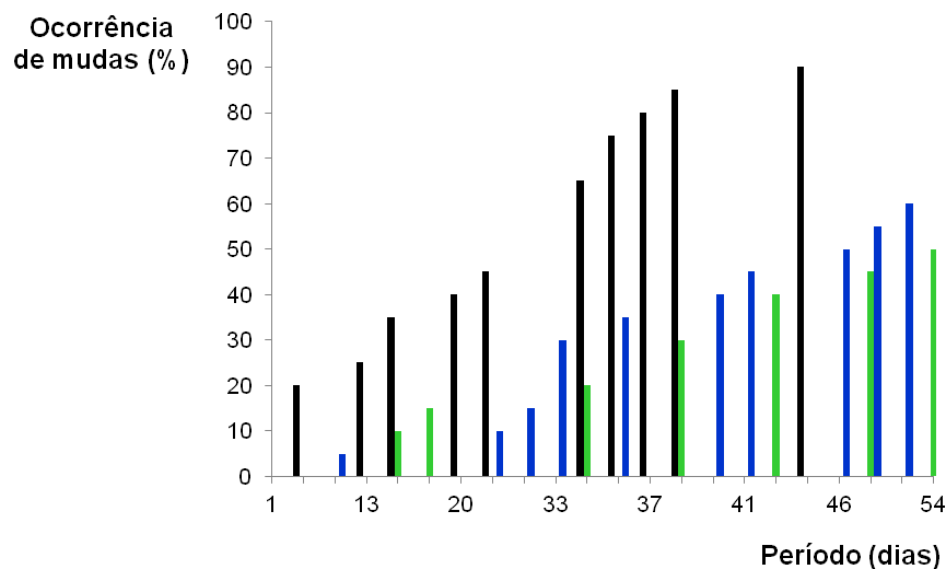


Fig. 12. Ocorrência de mudas em ninfas de 5^o estadio de *T. infestans* submetidas à injeção com solução salina (verde; n = 20) e ácido valproico a 1 mM (azul; n = 20), em comparação a controles não injetadas (preto; n = 20).

DISCUSSÃO

Diversas características importantes a fim de se melhor compreender a organização dos corpos heterocromáticos presentes em células somáticas de *T. infestans* e *P. megistus* foram observadas no presente Projeto.

Os estudos topoquímicos demonstraram que uma riqueza em bases GC no DNA da cromatina de núcleos em *T. infestans* foi nítida ao redor dos cromocentros, onde houve frequentemente coincidência com a distribuição de proteínas argirófilas. Contudo, é possível que os sítios NOR possam estar associados a sequências onde predominam bases AT. Em machos de *P. megistus*, os achados são similares, havendo coincidência entre o DNA rico em GC, ao redor dos cromocentros, e a distribuição das NORs. Contudo, a partir das análises sobre o conteúdo em sequências de DNA e sobre a presença de proteínas argirofílicas nos núcleos de *P. megistus*, foi possível se excluir por completo a possibilidade da ocorrência de NORs no cromocentro, com base em resultados obtidos em outros estudos, mas, principalmente, pelo fato de as fêmeas, mesmo não contendo cromocentros, apresentarem nucléolo evidente disperso pelo citoplasma. No DNA da heterocromatina de núcleos em *T. infestans* e *P. megistus* também se identificou riqueza em bases AT. Tais similaridades observadas entre as duas espécies, principalmente no que se refere à composição em bases no DNA, podem ser justificadas pela grande proximidade filogenética aí existente.

Quanto aos fatores determinantes para a formação e manutenção da heterocromatina nos cromocentros de *T. infestans* e *P. megistus*, os estudos imunocitoquímicos demonstraram que a metilação de DNA não é um dos fatores responsáveis pela estruturação dos cromocentros. Quanto aos marcadores epigenéticos para alguns resíduos de lisina nas histonas H3 e H4, em ninfas de 5º estadio, foi possível notar hipoacetilação e alta metilação de histonas na heterocromatina das células somáticas desses insetos. A demonstração da hipoacetilação é corroborada pelos estudos dos efeitos das drogas inibidoras de

deacetilases de histonas, em que ficou demonstrado haver participação de deacetilases de histonas na organização da heterocromatina nas células dos insetos de ambas as espécies. A ocorrência de trimetilação da histona H3 em resíduo específico de lisina foi consistente com a distribuição desse marcador heterocromático em outros tipos celulares de outros organismos, em que altos padrões de metilação em resíduo de lisina nesta histona estão associados com a presença de heterocromatina constitutiva.

As análises quantitativas de fenótipos nucleares após tratamentos com drogas inibidoras de deacetilases de histonas mostram que tanto mecanismos de sobrevivência celular quanto de morte celular podem ser ativados, sendo a morte celular por necrose mais frequente, em detrimento da apoptose. Observou-se que os tempos de tratamento e concentrações das drogas utilizados nos experimentos foram eficientes para produzir descompactação da heterocromatina apenas após os tratamentos com TSA e NaBt, não tendo sido tão significativa a descompactação da cromatina nos núcleos de insetos submetidos ao VPA. A diversidade de fenótipos nucleares encontrada mesmo nos insetos não submetidos a qualquer tratamento experimental nos leva a crer que outros fatores estressantes, por vezes anteriores aos tratamentos, possam estar contribuindo para a ocorrência dos mesmos ou até que estes, em certa medida, possam tratar-se de produtos de um evento regular.

Após o período de observação da ocorrência de muda e de sobrevivência dos insetos foi possível perceber que ambos os parâmetros (sobrevivência e muda) foram alterados nos insetos que sofreram algum tipo de injeção, seja com a solução salina ou com a droga. Como os níveis de sobrevivência e da ocorrência de mudas nos insetos foram praticamente os mesmos, quando se comparam os dois grupos que foram injetados, não se pode afirmar que a droga em si tenha sido responsável pela maior mortalidade dos insetos ou pela diminuição na incidência de mudas. Assim, tendo a injeção como principal fator afetando esses parâmetros associados ao desenvolvimento dos insetos, em última instância, cabe apenas suscitar hipóteses que possam, de alguma forma, justificar as causas de

tais alterações. A esse respeito, como aspectos a serem apontados, tem-se o próprio estresse causado pela injeção, que poderia, talvez, ser eliminado com uma aplicação tópica da substância, um nível insuficiente de oxigênio, causando interferências no sistema endócrino dos insetos e a má alimentação das ninfas.

CONCLUSÕES

- Em *T. infestans* e *P. megistus*, sequências de DNA ricas em bases AT e pobres em GC ocorrem predominantemente nos corpos de cromatina condensada que constituem os cromocentros. O DNA rico em bases GC ocorre na eucromatina e margeando algumas regiões dos cromocentros.
- Em *T. infestans*, os sítios NOR podem não estar associados a sequências ricas em GC, mas sim a sequências onde predominam bases AT. Já em machos e fêmeas de *P. megistus*, pode-se considerar que a riqueza em bases GC esteja associada à presença de NORs.
- A metilação de DNA não pode ser considerada como fator determinante na condensação cromatínica dos cromocentros de células epiteliais de *T. infestans* e *P. megistus*.
- A heterocromatina de células somáticas de *T. infestans* e *P. megistus* apresenta histonas hipoacetiladas e altamente metiladas demonstráveis por imunocitoquímica e corroborado pela ação das enzimas deacetilases de histonas sobre os cromocentros, indicando que a modificação de histonas possa ser um dos fatores preponderantes na condensação cromatínica dos cromocentros.
- Em função de achados de descompactação da cromatina após tratamentos com drogas inibidoras de enzimas deacetilases de histonas, pode-se concluir que tais enzimas apresentem função na estruturação da cromatina nos cromocentros de ambas as espécies.
- Atrasos na ocorrência de mudas e diminuição no número de insetos que sofrem mudas e também do período de sobrevivência das ninfas, indicativos de

alterações no desenvolvimento normal dos insetos, são evidenciados após injeção das ninfas de *T. infestans* com VPA e solução salina.

Referências

- Alberts, B. et al., 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publ. Inc., New York & London, pp. 195-262.
- Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D., 2007. In *Epigenetics, Overview and Concepts*, eds Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), pp 23-62.
- Álvares, R.S., Mello, M.L.S., 1987. Alterações nos fenótipos nucleares de células somáticas com diferentes graus de ploidia em espécimes de *Triatoma infestans* submetidos à radiação. *Ciênc Cult (Supl)* 39, 778-779.
- Avila, M.L., Tekiel, V., Moretti, G., Nicosia, S., Bua, J., Lammel, E.M., Stroppa, M.M., de Burgos, N.M., Sánchez, D.O., 2011. Gene discovery in *Triatoma infestans*. *Parasites & Vectors* 4:39.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., Kouzarides, T., 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120–124.
- Bartova, E., Kozubek, S., 2006. Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies. *Biol Cell* 98, 323–336.
- Bérenger, J.M., Blanchet, D., 2007. A new species of the genus *Panstrogylus* from French Guiana (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 733-736.
- Bernardi, G., 1989. The isochore organization of the human genome. *Annu. Rev. Genet.* 23, 637-661.
- Bernardi, G., 1993. The Vertebrate Genome: Isochores and Evolution. *Mol Biol Evol* 10, 186-204.
- Bernardi, G., 2000. Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates. *Gene* 241, 3–17.
- Bird, A.P., 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.

- Bolden, J.E., Peart, M.J., Johnstone, R.W., 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews/Drug Discovery* 5, 769-784.
- Borden, J., Manuelidis, L., 1988. Movement of the X chromosome in epilepsy. *Science* 242, 1687-1691.
- Buck, R.C., 1967. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: The fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. *J Ultrastruct Res* 18, 489-501.
- Campos, S.G.P., Rodrigues, V.L.C.C., Mello, M.L.S., 2002. Changes in nuclear phenotype frequencies following sequential cold shocks in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 857-864.
- Clouaire, T., Stancheva, I., 2008. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell mol Life Sci* 65, 1509-1522.
- Costa, J., Argolo, A.M., Felix, M.E., 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385, 47-52.
- Costa, J., Felix, M., 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 87-90.
- Craig, J.M., Bickmore, W.A., 1993. Chromosome bands—flavours to savour. *BioEssays* 15, 349–354.
- Cremer, T., Dietzel, S., Eils, R., Lichter, R., Cremer, C. 1996. Chromosome territories, nuclear matrix filaments and inter-chromatin channels: a topological view on nuclear architecture and function. In: P. E. Brandharn, M. D. Bennett (editors). *Kew Chromosome Conference IV*, Royal Botanic Gardens, Kew: 63-81.
- Cremer, T., Cremer, C., 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev Genet* 2, 292-301.
- Cremer, T., Cremer, M., 2010. Chromosome Territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003889.

- Cremer, T., Kupper, K., Dietzel, S., Kakan, S., 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell* 96, 555-567.
- Deniaud, E., Bickmore, W.A., 2009. Transcription and the nuclear periphery: edge of darkness? *Current Op Genet.Devel* 19, 187-191.
- Elgin, S.C.R., Grewal, S.I.S., 2003. Heterochromatin: silence is golden. *Current Biology* 13, R895-R898.
- Eyal, S., Yagen, B., Sobol, E., Altschuler, Y., Shmuel, M., Bialer, M., 2004. The activity of anti-epileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45, 737-744.
- Federico, C., Cantarella, C.D., Di Mare, P., Tosi, S., Saccone, S., 2008. The radial arrangement of the human chromosome 7 in the lymphocyte cell nucleus is associated with chromosomal band gene density. *Chromosoma* 117, 399-410.
- Felisbino, M.B., Tamashiro, W.M.S.C., Mello, M.L.S. Chromatin supraorganization, cell death and chromosome abnormalities evaluated in valproic acid-treated HeLa cells. In: 18th International Chromosome Conference, 2011, Manchester. Delegate Book. Manchester : ICC, 2011. p. 136-136 (tese em andamento, 2011).
- Field, L.M., Lyko, F., Mandrioli, M., Prantera, G., 2004. DNA methylation in insects. *Insect Molecular Biology* 13, 109–115.
- Flores-Ancona, R.M., García-Gómez, F.Y., Jiménez-Betanzos, A.M., Solis-Paredes, M., Castro-Leyva, V., Cruz-Orea, A., Arenas-Huertero, F., Ramón-Gallegos, E., 2009. Effects of sodium butyrate on cell death induced by Photodynamic Therapy in U373-MG and D54-MG astrocytoma cell lines. *Photochem Photobiol* 85, 1182-1188.
- Forero, D., Weirauch, C., Baena, M., 2004. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa* 670, 1-12.

- Foster, H.A., Bridger, J.M., 2005. The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. *Genome organization and nuclear architecture*. *Chromosoma* 114, 212–229.
- Furey, T.S., Haussler, D., 2003. Integration of the cytogenetic map with the draft human genome sequence. *Hum Mol Genet* 12, 1037–1044.
- Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D. S., Jurberg, J., 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202, 1-36.
- Galvão, C., Angulo, V.M., 2006. *Belminus corredori*, a new species of *Bolboderini* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa* 1241, 61-68.
- Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C., and Ausio, J., 1995. Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 270, 17923–17928.
- Garcia, S.L., Mello, M.L.S., Garcia, N.L., Rodrigues, V.L.C.C., 2000a. Changes in nuclear phenotypes following cold shock in *Panstrongylus megistus* (Burmeister). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95, 893-898.
- Garcia, S.L., Mello, M.L.S., Rodrigues, V.L.C.C., Garcia, N.L., 2000b. Nuclear phenotype changes after heat shock in *Panstrongylus megistus* (Burmeister). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95, 271-277.
- Garcia, S.L., Pacheco, R.M., Rodrigues, V.L.C.C., Mello, M.L.S., 2002. Effect of sequential heat and cold shocks on nuclear phenotypes of the blood-sucking insect, *Panstrongylus megistus* (Bumeister) (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 1111-1116.
- Garcia, S.L., Rodrigues, V.L.C.C., Garcia, N.L., Mello, M.L.S., 2011. Prevalence and intensity of infection, metacyclogenesis and nuclear phenotypes in *Panstrongylus megistus* (Burmeister) after ingestion of *Trypanosoma cruzi* (Chagas) II and subjection to heat shock. *Braz J Biol* 71, 1-10.

- Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N.P., Bickmore, W.A. 2004. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118, 555-566.
- Grewal, S.I., Moazed, D., 2003. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798-802.
- Guerra, M., Cabral, G., Cuacos, M., González-García, M., González-Sánchez, M., Vega, J., Puertas, M.J., 2010. Neocentrics and holokinetics (holocentrics): Chromosomes out of the centromeric rules. *Cytogenet Genome Res* 129, 82–96.
- Herold, C., Ganslmayer, M., Ocker, M., Hermann, M., Geerts, A., Hahn, E.G., Schuppan, D., 2002. The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *Journal of Hepatology* 36, 233–240.
- Holmquist, G., Gray, M., Porter, T., Jordan, J., 1982. Characterization of Giemsa dark-and light-band DNA. *Cell* 31, 121–129.
- Hübner, M.R., Spector, D.L., 2010. Chromatin Dynamics. *Annu Rev Biophys* 39, 471–489.
- Hughes-Schrader, S., Schrader, F., 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12, 327–350.
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., Nakatani, Y., 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463–473.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., Jacobsen, S.E., 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416, 556–560.
- Jasencakova, Z., Meister, A., Schubert, I., 2001. Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma* 110, 83–92.
- Jasencakova, Z., Meister, A., Walter, J., Turner, B.M., Schubert, I., 2000. Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent

- and correlated with replication rather than with transcription. *The Plant Cell* 12, 2087–2100.
- Jasencakova Z., Soppe, W.J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B.M., Schubert, I., 2003. Histone modifications in *Arabidopsis*—high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J* 33: 471–480.
- Jergil M., Forsberg, M., Salter, H., Stockling, K., Gustafson, A., Dencker, L., Stigson, M., 2011. Short-Time gene expression response to valproic acid and valproic acid analogs in mouse embryonic stem cells. *Toxic Sci* 121, 328-342.
- Jurberg, J., Rocha, D.S., Galvão, C., 2009. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota. Neotrop.* 9:1.
- Kimmins, S., Sassone-Corsi, P., 2005. Chromatin remodeling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434, 583-589.
- Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., Goto, Y., Takizawa, N., Nozaki, N., 2008. The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Structure and Function* 33, 61-73.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Küpper, K., Kölbl, A., Biener, D., Dittrich, S., von Hase, J., Thormeyer, T., Fiegler, H., Carter, N.P., Speicher, M.R., Cremer, T., Cremer, M., 2007. Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma* 116, 285–306.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature* 8: 104-115, 2007.
- Mandrioli, M., Azzoni, P., Lombardo, G., Manicardi, G.C., 2011. Composition and epigenetic markers of heterochromatin in the aphid *Aphis nerii* (Hemiptera: Aphididae). *Cytogenet Genome Res* 133, 67–77.
- Martínez, E., Chávez, T., Sossa, D., Aranda, R., Vargas, B., Vidaurre, P., 2007. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia

- (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. Bol Inst Invest Salud Desar 3, 1-11.
- McMurry, M.T., Krangel, M.S., 2000. A role for histone acetylation in the developmental regulation of V(D)J recombination. Science 287, 495–498.
- Mello, M.L.S., 1971. Nuclear behavior in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans*. Cytologia 36, 42-49.
- Mello, M.L.S., 1975. Feulgen-DNA values and ploidy degrees in the Malpighian tubes of some triatomids. Revta bras Pesq Méd Biol 8, 101-107.
- Mello, M.L.S., 1978. Computer analysis of stained chromatin on Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae). Mikroskopie 34, 285-299.
- Mello, M.L.S., 1979. Patterns of lability towards acid hydrolysis in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. Cell Mol Biol 21, 1-16.
- Mello, M.L.S., 1980. Toluidine blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. Histochem 69, 181-187.
- Mello, M.L.S., 1985. Different affinity for clupein in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. Revta bras Genét 8, 755-758.
- Mello, M.L.S., 1989. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. Revta bras Genét 12, 485-498.
- Mello, M.L.S., Pudney, M., 1987. Polyploidization of the BTC-32 cell line from *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). Genetica (Dordrecht) 74, 131-136.
- Mello, M.L.S., Raymundo, H.H., 1980. Nuclear fusion in the Malpighian tubes of a bloodsucking hemipteran. Cytologic 45: 203-209.
- Mello, M.L.S., Recco-Pimentel, S.M., 1987. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. Cytobios 52, 175-184.
- Mello, M.L.S., Dolder, H., Dias, C.A., 1990. Nuclear ultrastructure of Malpighian tubule cells in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) under conditions of full nourishment and starvation. Revta bras Genét 13, 5-17.

- Mello, M.L.S., Kubrusly, F.S., Randi, M.A.F., Rodrigues, V.L.C.C., Ferraz-Filho, A.N., 1995. Effect of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. *Entom exp appl* 74, 209-218.
- Mello, M.L.S., Randi, M.A., Giorgio, S., Ferraz-Filho, A.N., Rodrigues, V.L.C.C., Rocha-e-Silva, E.O., Cordeiro, J.A., 1986. Number of chromosomes, Feulgen-DNA content and nuclear phenotypes in domestic and wild specimens of *Panstrongylus megistus*. *Ann Trop Med Parasitol* 80, 641-648.
- Mello, M.L.S., Tavares, M.C.H., Dantas, M.M., Rodrigues, V.L.C.C., Maria-Engler, S.S., Campos, S.G.P., Garcia, N.L., 2001. Cell death and survival alterations in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* following heat shock. *Biochem Cell Biol* 79, 709-717.
- Mola, L.M., Papeschi, A.G., 2006. Holokinetic chromosomes at a glance. *J Basic Appl Genet* 17, 17–33.
- Morielle-Souza, A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2007. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization. *Genet Mol Res* 6, 713-720.
- Nightingale, K.P., O'Neill, L.P., Turner, B.M., 2006. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 125–136.
- Panzer, F., Pérez, R., Panzer, Y., Ferrandis, I., Ferreiro, M.J., Calleros, L., 2010. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenet Genome Res* 128, 77–87.
- Panzer, F., Pérez, R., Panzer, Y., Alvarez, F., Scvortzoff, E., Salvatella R., 1995. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera – Reduviidae). *Chromosome Research* 3, 143-150.
- Panzer, F., Dujardin, J.P., Nicolini, P., Caraccio, M.N., Rose, V., Tellez, T., Bermudez, H., Bargas, M.D., Mas-Coma, S., O'Connor, J.E., Perez, R., 2004. Genomic changes of Chagas' disease vector, South America. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 438-446.

- Parada, L.A., Sotiriou, S., Misteli, T., 2004. Spatial genome organization. *Exp Cell Res* 296, 64–70.
- Pederson, T., 2004. The spatial organization of the genome in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 14, 203–209.
- Peters, A.H.F.M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., Jenuwein, T., 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323–337.
- Piel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Klein, P.S., 2001. Histone deacetylase is a direct target of Valproic Acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *The Journal Of Biological Chemistry* 276, 36734–36741.
- Poinar, G.Jr., 2005. *Triatoma dominicana* sp. n (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and *Tripanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria, Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a triatominae-tripanosomatid vector association. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5, 72-81.
- Pray, L. 2008. Eukaryotic genome complexity. *Nature Education* 1(1).
- Richards, E.J., Elgin, S.C.R., 2002. Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Rounding up the Usual Suspects. *Cell*, Vol. 108, 489–500.
- Rippe, K., 2007. Dynamic organization of the cell nucleus. *Curr Op Genet Dev* 17, 373-380.
- Saccone, S., Federico, C., Bernardi, G., 2002. Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds. *Gene* 300, 169–178.
- Saitoh, Y., Laemmli, U.K., 1994. Metaphase chromosome structure:bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76, 609–622.

- Sandoval, C.M., Pabón, E., Jurberg, J., Galvão, C., 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443, 55-64.
- Sawa, H., Murakami, H., Ohshima, Y., Sugino, T., Nakajyo, T., Kisanuki, T., Tamura, Y., Satone, A., Ide, W., Hashimoto, I., Kamada, H., 2001. Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein Bad. *Brain Tumor Pathol* 18, 109-114.
- Schofield, C.J., Galvão, C., 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110, 88–100.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., Reuter, G., 2002. Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* 21, 1121-1131.
- Schreiber, G., Pellegrino, J., 1950. Eteropicnosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici). *Sci Genet* 3, 215-226.
- Schreiber, G., Bogliolo, A.R., Pinho, A.C., 1972. Cytogenetics of Triatominae: caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes. *Revta Bras Biol* 32, 255-263.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J., Pazin, M. J., Davie, J. R., Peterson, C.L., 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and Protein interactions. *Science* 311, 844-847.
- Siavoshian, S., Segain, J., Kornprobst, M., Bonnet, C., Cherbut, C., Galmiche, J., Blottiere, H., 2000. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 46, 507-514.
- Simões, L.C.G., Amabis, J.M., Cestari, N.A., 1975. Puffs in the heterochromatin in chromosomes of *Rhynchosciara*. *Ciênc Cult* 27, 159-161.

- Soppe, W.J.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., Fransz, P.F., 2002. DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 21, 6549–6559.
- Suganuma, T., Workman, J.L., 2011. Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu Rev Biochem* 80, 473–99.
- Tartarotti, E., Ceron, C.R., 2005. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Biochemical Genetics* 43, 365-373.
- Tóth, K.F., Knoch, T.A., Wachsmut, M., Frank-Stöhr, M., Stöhr, M., Bacher, C.P., Müller, G., Rippe, K., 2004. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* 117, 4277-4287.
- Ueshima, N., 1966. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 18, 97-122.
- Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I., Coombes, R.C., 2001. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clinical Cancer Research* 7, 971–976.
- Wigglesworth, V.B., 1965. *The Principles of Insect Physiology*. Butler & Tanner Ltd, pp. 513.
- WHO, 2010. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340.
- Zhang, C., Wang, Y., Zhou, Z., Zhang, J., Tian, Z., 2009. Sodium butyrate upregulates expression of NKG2D ligand MICA/B in HeLa and HepG2 cell lines and increases their susceptibility to NK lysis. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1275-1285.

Submitted at November, 11, 2011.