

Sobrevivência e ocorrência de muda em *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) após choque de temperatura*

Survival and molting incidence in Triatoma infestans Klug (Hemiptera, Reduviidae) after temperature shocks.

Vera Lúcia C.C. Rodrigues**, Maria Luiza S. Mello***, Antenor N. Ferraz Filho**, Marly M. Dantas****

RODRIGUES, V. L. C. C. et al. Sobrevivência e ocorrência de muda em *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) após choque de temperatura. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 25: 461-67, 1991. A sobrevivência e a ocorrência de mudas em espécimes de *Triatoma infestans* foram estudados num período de 30 dias após choques de temperatura. Foi demonstrado que choques hipertérmico e hipotérmico interferem nesses processos, na dependência da temperatura do choque, tempo de sua duração, fase de desenvolvimento e sexo dos espécimes. Dentre as situações experimentais utilizadas, o choque a 0°C por 12 h pareceu produzir a ação mais deletéria, porém choques a 40°C e 0°C mesmo por uma hora são admitidos como afetando o desenvolvimento hormonal que controla a muda. Casos de aumento de sobrevivência pós-choque são sugeridos como tendo sido favorecidos por ação de proteínas de choque térmico.

Descritores: *Triatoma*, crescimento. Hipotermia induzida. Hipertermia induzida. Sobrevivência.

Introdução

Ninfas de 4º estágio de *Triatoma infestans* Klug, quando submetidas a choque de temperatura, sofrem alterações nucleares em células de seus túbulos de Malpighi (Dantas e Mello*, 1991). Essas alterações se processam a curto e a longo prazos e compreendem mudanças na supra-organização cromatínica,

fusão de núcleos e aparecimento de diversos níveis de degeneração em parte da população nuclear (Dantas e Mello****, 1991). Efeitos semelhantes haviam sido previamente detectados em espécimes submetidos a outros tipos de estresse, como o jejum prolongado e a ação de metais pesados (Kubrusly⁶, 1984; Mello⁷, 1989).

Dados os tipos de respostas em nível celular com os choques de temperatura, necessário se torna saber se esses efeitos estariam relacionados a um comprometimento da sobrevivência dos insetos a eles submetidos. Tal conhecimento permitiria em primeiro lugar melhor avaliar a extensão dos efeitos de choques de temperatura, em nível celular e da biologia do inseto, em *Triatoma infestans*. Por outro lado, contribuiria para interpretar expectativas de sobrevivência de espécimes que tivessem sido expostos a condições não recomendadas, estressantes, ainda que por curto espaço de tempo, em insetário ou fora dele.

No presente trabalho, espécimes de *Triatoma infestans* foram, portanto, submetidos a situações de choque hiper e hipotérmico idênticas às reportadas nos experimentos que salientaram alterações em nível celular (Dantas e Mello****, 1991) e tiveram seus níveis de sobrevivência avaliados ao longo de um período de 30 dias pós-choque. Buscando-se tornar o conhecimento mais abrangente, foram utilizados espécimes em várias fases do desenvolvimento.

Material e Métodos

Utilizaram-se ninfas de 3º, 4º e 5º estádios e adultos de ambos os sexos, com idades de 30, 45, 60 e

* Subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Processos nºs. 304691/89-5/GE/FV e 410602/89-2/GE/FV). Parte da tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, em 1990, sob o título "Efeitos de choques de temperatura sobre fenótipos nucleares de *Triatoma infestans* Klug, em condições de insetário da SUCEN de Mogi Guaçu".

** Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) - Mogi Guaçu, SP - Brasil.

*** Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP - Campinas, SP - Brasil.

**** Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe - Aracaju, SE - Brasil. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Programa Institucional de Capacitação de Docentes.

***** "Changes in nuclear phenotypes induced by thermal shocks in *Triatoma infestans* Klug", elaborado por M. M. Dantas e M. L. S. Mello. Dados inéditos, aguardando publicação.

Separatas/Reprints: M. L. S. Mello - Caixa Postal 6109 - 13081 - Campinas, SP - Brasil.

Publicação financiada pela FAPESP. Processo Medicina 90/4602-1.

90 dias, respectivamente, de *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) mantidos no insetário da (SUCEN), Superintendência de Controle de Endemias, em Mogi Guaçu (SP).

Os espécimes foram submetidos a situações de choque hipertérmico (40°C) e hipotérmico (0°C) por períodos de 1 e 12 horas. O choque hipertérmico foi efetuado em estufa microbiológica, calibrada para 40°C, enquanto o choque hipotérmico foi realizado em refrigerador, comprovando-se as temperaturas por meio de termômetro. Em ambas as situações de choque os insetos foram admitidos em grupos de 10 indivíduos no interior de frascos de plástico de 5,5 cm de altura por 6,5 cm de diâmetro, os quais eram vedados em sua parte superior com morim preso por elástico.

As temperaturas de choque foram escolhidas por facilidades operacionais e objetivando-se a realização de experimentos em extremos opostos de temperatura com relação ao controle. No caso da hipertermia, evitou-se o uso de temperaturas mais elevadas que 40°C, que poderiam levar a uma morte quase imediata dos insetos, o que foi comprovado num teste prévio. Desconhecendo-se a existência de crioprotetores na hemolinfa desses insetos, evitou-se, por outro lado, o uso de temperaturas mais baixas do que 0°C.

Imediatamente após o choque, os insetos foram transferidos para ambiente de temperatura e umidade controle e acompanhados, a partir de então diariamente, durante um período de 30 dias, para se determinar seus níveis de sobrevivência. O processo de muda foi também acompanhado durante o mesmo período em que se analisou a sobrevivência das ninfas.

As condições consideradas controle foram aquelas usualmente empregadas no insetário da SUCEN, em Mogi Guaçu, desde 1980, ou seja, 30°C de temperatura e 80% de umidade, para esta espécie. Estas condições foram escolhidas visando-se adaptabilidade da espécie à manutenção em laboratório, incluindo-se melhoria na atividade de oviposição e eclosão dos ovos.

Os insetos utilizados haviam sido alimentados

semanalmente com sangue de galinha. No período de 30 dias de observação manteve-se este ritmo de alimentação.

Resultados

Para um período de observação de 30 dias em situação controle determinou-se que o nível usual de sobrevivência das ninfas foi muito maior do que o dos alados (Tabela). Constatou-se também nesse período que 94% das ninfas de 3º estágio, bem como 80% das ninfas de 4º e de 5º estágios, em condição controle, sofreram muda (Figs. 1A, 1D e 2A).

Dentre as fases de desenvolvimento testadas comprovou-se que as ninfas de 4º e de 5º estágios apresentaram declínio não marcante na sobrevivência, quando submetidas ao choque hipertérmico por uma hora, enquanto nas mesmas circunstâncias as ninfas de 3º estágio e principalmente os adultos, passaram a apresentar aumento de sobrevida (Tabela; Figs. 1B, 1E, 2B, 2D, 2E). Por outro lado, todas as ninfas de 3º estágio submetidas a este choque de temperatura mudaram para o 4º estágio, enquanto as desta fase ninfal e as do 5º estágio sofreram uma drástica queda na ocorrência de mudas (Figs. 1A, 1B, 1E, 2B).

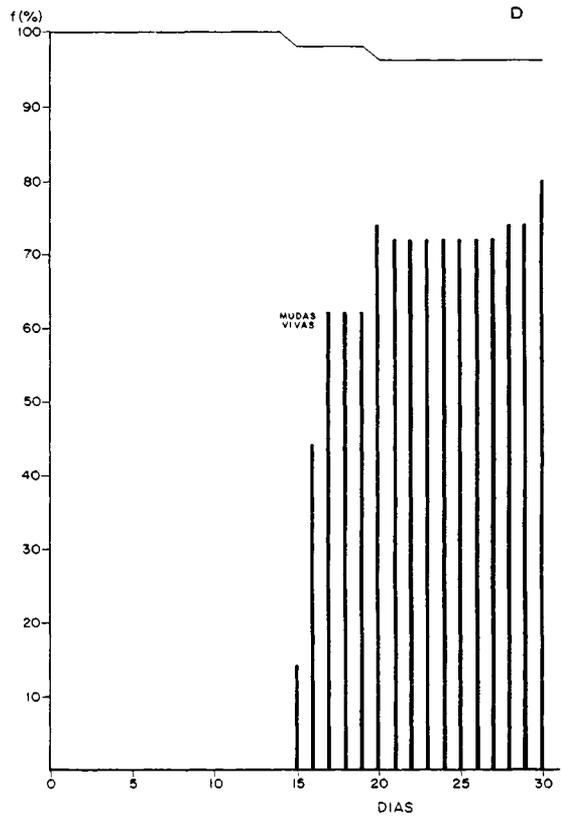
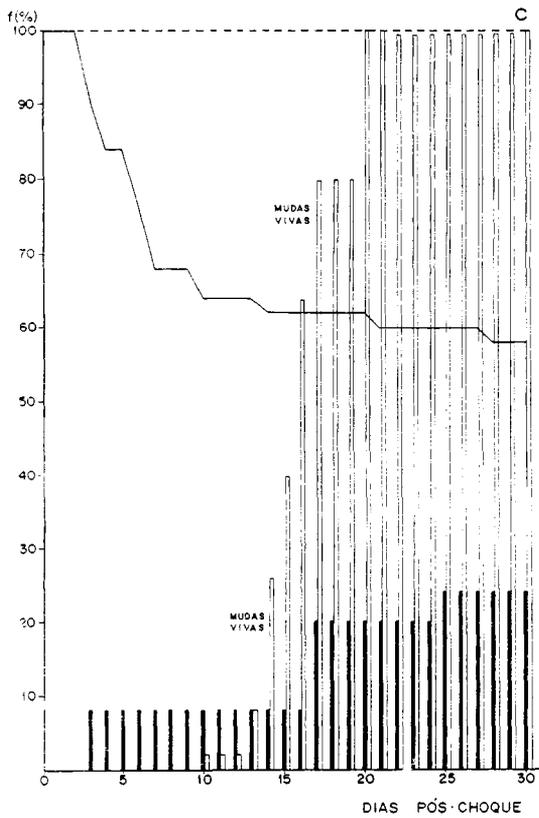
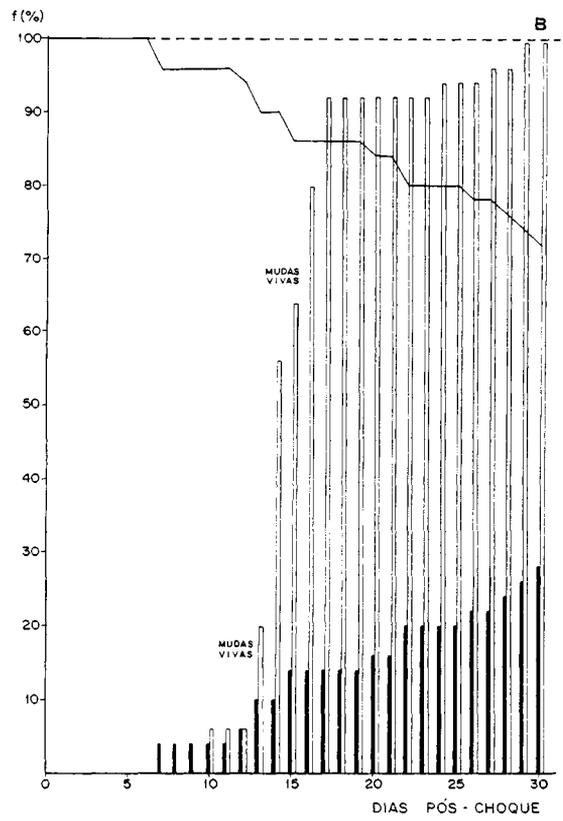
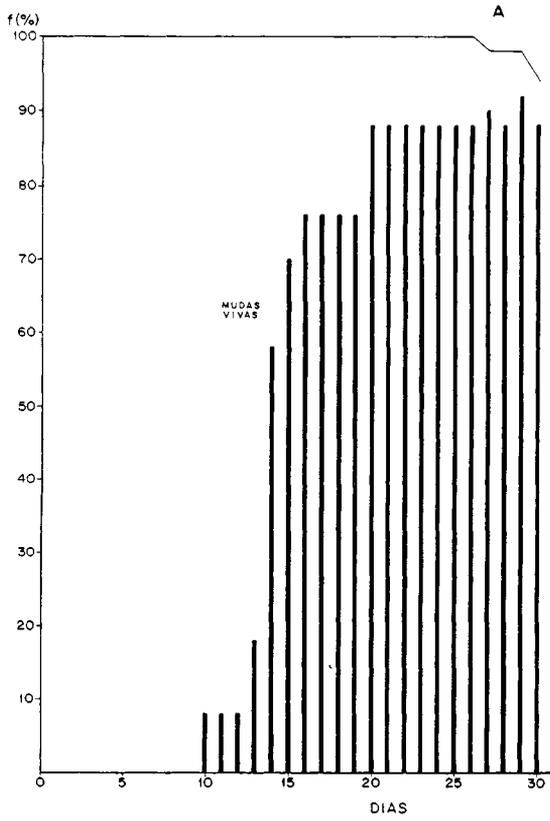
Quando o choque hipertérmico foi mais longo (12 h), as ninfas de 3º estágio assim como os adultos fêmeas passaram a apresentar sensível queda de sobrevida, enquanto as ninfas de 4º e de 5º estágios e os adultos machos não apresentaram alterações significativas (Tabela; Figs. 1A, 1B, 1D, 1E, 2A, 2B, 2D, 2E). Quanto à ocorrência de mudas nos insetos submetidos a este choque, houve um sensível decréscimo no 3º estágio (Fig. 1A e 1B), porém não tão drástico no 4º estágio (Fig. 1D e 1E). No 5º estágio a ocorrência de mudas progrediu lentamente e, embora se iniciasse antes do que no controle, afetou no período estudado, 52% dos indivíduos contra 80% dos insetos controle (Fig. 2A e 2B).

Já após o choque hipertérmico de uma h, as

Tabela. Sobrevivência 30 dias após choque de temperatura em espécimes de *Triatoma infestans*

Condições experimentais de temperatura	Fase do desenvolvimento									
	3º estágio		ninfas 4º estágio		5º estágio		adultos machos		adultos fêmeas	
	n	sobrevida (%)	n	sobrevida (%)	n	sobrevida (%)	n	sobrevida (%)	n	sobrevida (%)
controle, 30°C	50	94	50	96	50	96	100	69	100	58
choque hipertérmico	50	100	50	90	50	92	50	88	50	92
	50	72	50	92	50	92	100	68	100	48
choque hipotérmico	50	100	50	98	50	98	50	94	50	86
	50	58	50	66	50	68	100	61	100	66

n = nº de insetos



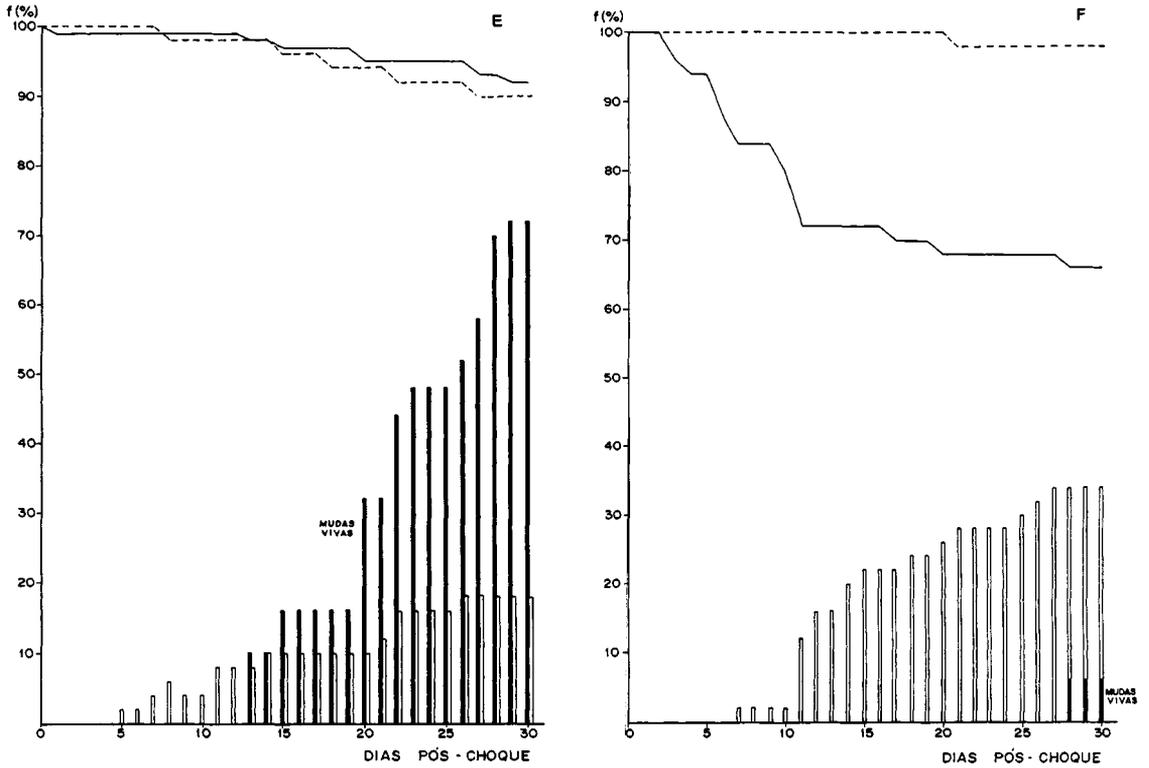
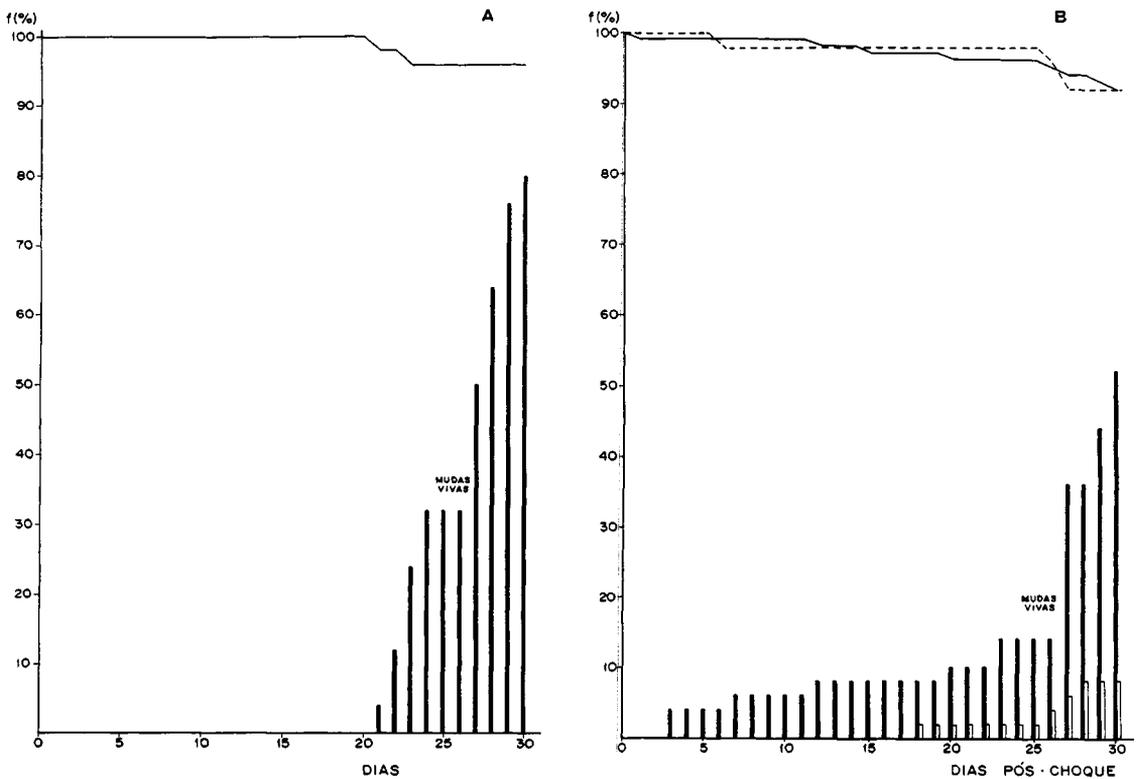


Figura 1. Curvas de sobrevivência e ocorrência de mudas. Ninfas de 3^o (A, B, C) e 4^o estádios (D, E, F). A, D. Temperatura controle. B, E. Temperatura de 40°C por uma h (linha tracejada; blocos claros) e 12 h (linha contínua; blocos escuros). C, F. Temperatura de 0° C por uma h (linha tracejada; blocos claros) e 12 h (linha contínua; blocos escuros). f = nº de sobreviventes; n = 50.



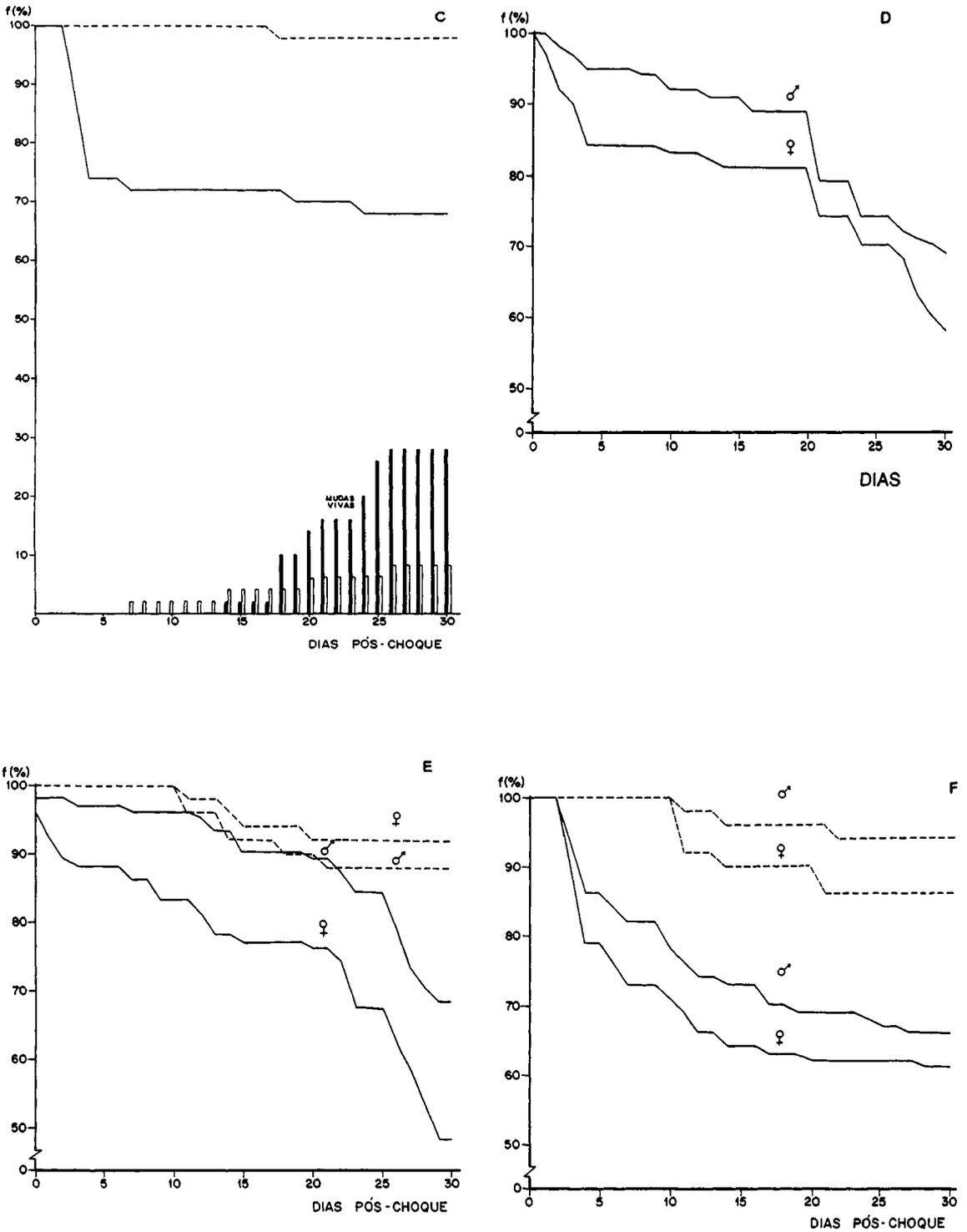


Figura 2. Curvas de sobrevivência (A-F) e ocorrência de mudas (A-C). Ninfas de 5^o estágio (A-C; n = 50) e adultos (D-F; n = 100). A, D. Temperatura controle. B, E. Temperatura de 40°C por uma h (linha tracejada; blocos claros) e 12 h (linha contínua; blocos escuros). C, F. Temperatura de 0°C por uma h (linha tracejada; blocos claros) e 12 h (linha contínua; blocos escuros).
f = n^o de sobreviventes

ninfas, com exceção das de 3º estágio, que mostraram aumento em sobrevivência, não sofreram alterações em sobrevivência (Tabela 1; Figs. 1A, 1C, 1D, 1F, 2A, 2C). Contudo, à semelhança dos resultados após o choque hipertérmico curto, os adultos tiveram aumento significativo de sobrevivência (Tabela; Fig. 2D-F).

Enquanto o total das ninfas de 3º estágio submetidas ao choque de 0°C por uma h mudaram para o 4º estágio (Fig. 1A e 1C), houve uma sensível queda na ocorrência de mudas nas ninfas de 4º e de 5º estágios (Figs. 1D, 1F, 2A, 2C).

Em condições de choque hipotérmico mais longo (12 h), as ninfas dos vários estágios estudados tiveram grande queda em sobrevivência (Tabela) e em ocorrência de mudas (Figs. 1A, 1C, 1D, 1F, 2A, 2C). Por outro lado, os adultos foram muito pouco afetados, no sentido de um decréscimo (machos) ou aumento (fêmeas) em sobrevivência (Tabela; Fig. 2D, 2F).

De modo geral, dentre as fases de desenvolvimento testadas, as ninfas de 3º estágio foram as mais resistentes aos choques de temperatura de curta duração e as mais sensíveis aos choques mais longos, em termos de sobrevivência após os tratamentos, independente da temperatura utilizada. Por outro lado, as ninfas de 5º estágio foram as mais resistentes aos choques por tempos mais longos.

Discussão

Os resultados indicam variabilidade de resposta ao choque de temperatura em *Triatoma infestans*, quando se consideram a sobrevivência dos espécimes e a ocorrência de mudas. Essa variabilidade depende da temperatura a que são expostos os insetos, tempo de tratamento, fase de desenvolvimento considerada e sexo dos espécimes.

É largamente conhecido que o choque de temperatura induz como resposta, desde as bactérias até o ser humano, a síntese de proteínas de choque térmico (hsp) (Atkinson e Walden², 1985). Estas proteínas desempenham um papel essencial na defesa da célula contra o estresse, mas algumas delas podem também ser sintetizadas constitutivamente, ou seja, em condições fisiológicas normais. As hsp de baixo peso molecular, como as hsp 23, por exemplo, além de participarem na proteção de organismos contra um brusco aumento de temperatura (Berger e Woodward³, 1983), são normalmente sintetizadas em simultaneidade com a produção de ecdisona que antecede a muda em insetos (Cheney e Shearn⁴, 1983; Atkinson e Walden², 1985).

Assim, as ninfas de 4º e 5º estágios de *Triatoma infestans*, que apresentaram maior resistência ao choque hipertérmico de 12 h, poderiam ter sua sobrevivência resguardada por terem sintetizado quantidades significativas de hsp por ocasião do choque, ou constitutivamente, em simultaneidade à

produção de ecdisona. Contudo, não deve ser esquecido que ninfas de 4º estágio, submetidas ao choque de 40°C por 12 h, mostram uma acentuada incidência de núcleos gigantes, originados por fusão (Dantas e Mello⁵, 1991). O fenômeno de fusão nuclear nos redutíveis tem sido aventado como fator importante na sobrevivência celular e do próprio inseto em condições de estresse acentuado (Wigglesworth⁹, 1967; Mello⁷, 1989). Este fenômeno poderia ser, portanto, de grande valia na manutenção da sobrevivência dos insetos na condição descrita.

Já para as ninfas de 3º estágio, os mecanismos mencionados acima não as teriam protegido de igual forma, possivelmente dado o menor tamanho dos espécimes, um fator que vem sendo apontado como responsável pela diminuição da habilidade do inseto em suportar o estresse (Wigglesworth¹⁰, 1984). Por outro lado, com relação à sobrevivência dos adultos nessa mesmas condições experimentais, a consideração apenas de tamanho dos espécimes (Wigglesworth¹⁰, 1984) não poderia explicar seu comportamento diverso, conforme o sexo. Talvez, neste caso, fatores outros que a produção de hsp e que variassem conforme o sexo, fossem responsáveis pela sensibilidade apenas de adultos fêmeas a esse tratamento.

Embora as ninfas em fases mais adiantadas do desenvolvimento apresentem uma sobrevivência não alterada após o choque a 40°C, por 12 h, houve indicação de que este tratamento tenha alterado o desempenho hormonal que controla os eventos de muda no inseto. Tal hipótese encontra apoio em relato de que em *Rhodnius* o processo de muda é acentuadamente retardado em temperaturas altas, por haver interferência no seu balanço hormonal, com favorecimento ao hormônio juvenilizante (Sherlock⁸, 1979; Wigglesworth¹⁰, 1984). O mesmo fenômeno poderia ocorrer em *Triatoma infestans* nas condições de choque descritas.

Com relação ao choque hipotérmico, não há relato de que o mesmo induza síntese de proteínas de estresse, como no caso do choque hipertérmico. Isto, porém, não é descartado, desde que o estresse produzido possa induzir a presença de proteínas denaturadas e/ou anormais, que sejam como tal reconhecidas pela célula e elicitam uma resposta típica como aquela esperada de um choque hipertérmico (Ananthan e col¹, 1986; Edington e col⁵, 1989). Se tal síntese ocorre em *Triatoma infestans*, não é tão eficiente na defesa celular e do organismo, como no caso do choque hipertérmico. Quando o choque a 0°C foi efetuado por 12 h, as ninfas foram as mais afetadas, tendo sido este efeito muito mais drástico do que pelo choque hipertérmico. Nessa situação há relato, ao menos para ninfas de 4º estágio, de que

* Op cit

ocorra maior frequência de alterações nucleares degenerativas e ausência de núcleos gigantes, dentre as condições de choque consideradas (Dantas e Mello, 1991)*. Pode-se também inferir que esta espécie, diferindo do que acontece em alguns grupos de insetos que suportam baixas temperaturas sem danos (Wigglesworth¹⁰, 1984), não possua substâncias crioprotetoras.

Igualmente após o choque hipotérmico por 12 h constatou-se em *Triatoma infestans* interferência no processo de muda, atribuível à alteração no desempenho hormonal que coordena as mudas. Não são, portanto, somente as temperaturas altas que a promovem. Os adultos, especialmente as fêmeas, mostraram-se muito menos afetados pela baixa temperatura, o que estaria de acordo com relatos para outros grupos de insetos (Wigglesworth¹⁰, 1984).

Já o choque por uma hora seja hipertérmico ou hipotérmico, ao contrário de uma queda em sobrevida, promove aparentemente uma melhoria na sobrevivência dos adultos e não prejudica a sobrevivência das ninfas. Possivelmente elicit um aumento de atividade transcricional pós-choque, permitindo não só recuperação das atividades celulares normais, mas estimulando o seu metabolismo, como em outros casos de resposta ao choque hipertérmico (Atkinson e Walden², 1985).

Quanto à ocorrência de mudas, os dados indicam que mesmo uma exposição relativamente curta ao choque, independente da temperatura testada, pôde interferir no balanço hormonal do inseto e o fez diferentemente, conforme a fase de desenvolvimento do mesmo. Assim, a muda em fase mais precoce foi acelerada e em fases mais adiantadas foi retardada. O afastamento com relação à temperatura controle, seja para valor superior ou inferior, trouxe o mesmo tipo de consequência, no sentido de uma interferência nesse balanço hormonal.

O menor nível de sobrevivência de adultos em comparação a ninfas, na situação controle, pode se dever a que a alteração em temperatura para a criação de *Triatoma infestans* em laboratório, introduzida no insetário da SUCEN, de Mogi Guaçu, visando melhoria na atividade de oviposição e de eclosão de ovos desta espécie, não seja o mais ideal no sentido de obtenção de maior sobrevivência para os indivíduos adultos.

As anomalias em nível dos núcleos celulares em *Triatoma infestans* em condições de choque de temperatura (Dantas e Mello, 1991)* podem ser, portanto, associadas a efeitos deletérios na sobrevivência das ninfas, no caso do choque a 0°C, por 12 h, ou à própria manutenção dos espécimes, no caso do choque a 40°C, por 12 h.

Por outro lado, os dados aqui apresentados são no geral indicativos de que devam ser tomados em consideração, quando a sobrevivência e o desenvolvimento ninfal de *Triatoma infestans* implicarem em avaliação da ação de outros agentes, em espécimes suspeitos de terem sido expostos a irregularidades de manutenção de temperatura em insetário ou por provirem de ambientes da natureza.

RODRIGUES, V. L. C. C. et al. [Survival and molting occurrence in *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera, Reduviidae) after temperature shocks]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 25: 461-67, 1991. Survival and molting occurrence were studied in specimens of *Triatoma infestans* over 30 days after temperature shocks. Hyperthermal and hypothermal shocks could be found to affect both survival and molting incidence as a function of temperature and period of the development phase and sex of the specimens. Considering the various test conditions, the shock at 0°C for 12 h was found to elicit the most deleterious effect, whereas shocks at 40°C and 0°C even for 1 h are interpreted as affecting the hormonal balance which controls molting. Cases of a rise in post-shock survival are suggested to have been favored by heat-shock protein action.

Keywords: *Triatoma*, growth and development. Hypothermic, induced. Hyperthermic, induced. Survival.

Referências Bibliográficas

1. ANANTHAN, J.; GOLDBERG, A.L.; VOELLMY, R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 232: 522-4, 1986.
2. ATKINSON, B.G. & WALDEN, D.B. *Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress*. Orlando, Academic Press, 1985.
3. BERGER, E.M. & WOODWARD, M.P. Small heat shock proteins in *Drosophila* may confer thermal tolerance. *Exp. Cell Res.*, 147: 437-42, 1983.
4. CHENEY, C.M. & SHEARN, A. Developmental regulation of *Drosophila* imaginal disc proteins: synthesis of a heat-shock protein under nonheat-shock conditions. *Dev. Biol.*, 95: 325-30, 1983.
5. EDINGTON, B.V.; WHELAN, S.A.; HIGHTOWER, L.E. Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *J. Cell Physiol.*, 139: 219-28, 1989.
6. KUBRUSLY, F.S. Ação de cobre e mercúrio sobre estrutura nuclear e atividade de alguns sistemas enzimáticos em *Triatoma infestans* Klug. Campinas, 1984 [Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia da UNICAMP].
7. MELLO, M.L.S. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. bras. Genét.*, 12: 485-98, 1989.
8. SHERLOCK, I.A. Vetores. In: Brener, Z. & Andrade, Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979. p. 42-88.
9. WIGGLESWORTH, V.B. Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of *Rhodnius* (Hemiptera). *J. Cell Sci.*, 2: 603-16, 1967.
10. WIGGLESWORTH, V.B. *Insect Physiology*. London, Chapman and Hall, 1984.

Recebido para publicação em 2/5/1991
Reapresentado em 29/7/1991
Aprovado para publicação em 12/8/1991

* Op cit