

PATRÍCIA IANELLA

ANÁLISE CITOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE
Drosophila arizonae E *Drosophila mulleri* (DIPTERA) DURANTE
O DESENVOLVIMENTO LARVAL - PUPAL,





1910001281



PATRÍCIA IANELLA

**ANÁLISE CITOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE
Drosophila arizonae E *Drosophila mulleri* (DIPTERA) DURANTE
O DESENVOLVIMENTO LARVAL-PUPAL.**

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

São José do Rio Preto - SP



PATRÍCIA IANELLA

**ANÁLISE CITOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE
Drosophila arizonae E *Drosophila mulleri* (DIPTERA) DURANTE
O DESENVOLVIMENTO LARVAL-PUPAL.**

Orientadora: Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama



h. 1.281/04

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

São José do Rio Preto - SP

575
Illa

20204000

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PATRICIA IANELLA

ANÁLISE CITOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE
Drosophila arizone E *Drosophila mulleri* (DIPTERA) DURANTE
O DESENVOLVIMENTO LARVAL-PUPAL

Ianella, Patricia.

Análise citoquímica das glândulas salivares de *Drosophila arizone* e
Drosophila mulleri (Diptera) durante o desenvolvimento larval-pupal /
Patricia Ianella – São José do Rio Preto: [s.n.], 2003
96 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Mary Massumi Itoyama
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citoquímica. 2. Glândulas salivares. 3. *Drosophila*. 4. Morte
celular. 5.. I. Itoyama, Mary Massumi. II. Universidade Estadual
Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575

20/1851.1



PATRÍCIA IANELLA

ANÁLISE CITOQUÍMICA DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *Drosophila arizonae* E *Drosophila mulleri* (DIPTERA) DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL-PUPAL.

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:

2º Examinador

3º Examinador

São José do Rio Preto, 26 / 02 / 2004



Dedicatória

Dedico aos meus pais,
Francisco Ianella e Thereza Morettin Ianella,
dos quais me orgulho de ser filha.



Agradeço a Deus, por esta vitória alcançada, por ter me permitido para realizar este trabalho, e por ter colocado em meu caminho amigos e familiares, muitos dos quais foram fundamentais para a conclusão do mesmo.

A Profa. Dra. Mary Masumi Itoyama, por todas estas anos de orientação, pela sua amizade e pelo apoio incondicional nos momentos difíceis.

A Profa. Dra. Maria Yercilla Vilala de Azevedo Oliveira, sempre presente e pronta a ajudar nos momentos de dificuldade.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Carval, pela disponibilização do seu laboratório, críticas, sugestões e disposição a discutir.

A Profa. Dra. Ana Elizabeth Siles e à aluna Alina Targa, pela colaboração e amizade.

A Profa. Dra. Sonia Maria Ollari, que colocou à disposição o seu analisador de imagem, sem o qual tudo teria sido mais difícil.

Aos membros desta banca de dissertação: Profa. Dra. Hermilene Elly Matos de Campos Brinde (IBILCE/UNESP) e Profa. Dra. Ana Silvia Lapenta (UEM Maringá).

Agradecimentos

Aos funcionários da seção de pós-graduação, pelo tratamento cordial e a receptividade para com os alunos.

Agradeço a Deus, por mais uma vitória alcançada, por ter me capacitado para realizar este trabalho, e por ter colocado em meu caminho amigos verdadeiros, muitos dos quais foram fundamentais para a conclusão do mesmo.

A Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, por todos estes anos de orientação, pela sua amizade e pelo apoio incondicional nos momentos difíceis.

A Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, sempre presente e pronta a ajudar nos momentos de dificuldade.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, pela disponibilização do seu laboratório, críticas, sugestões e disposição a discutir.

A Profa. Dra. Ana Elizabete Silva e à aluna Aline Targa pela colaboração e amizade.

A Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, que colocou à disposição o seu analisador de imagens, sem o qual tudo teria sido mais difícil.

Aos membros desta banca de dissertação: Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campus Bicudo (IBILCE/UNESP) e Profa. Dra. Ana Silvia Lapenta (UEM, Maringá).

Aos funcionários da seção de pós-graduação, pelo tratamento carinhoso e respeitoso para com os alunos.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, e seus dirigentes por possibilitarem a realização deste projeto.

A todos os colegas da pós-graduação em Genética, pelo companheirismo e solidariedade, em especial: Karina Faria, Paula Renata, Melissa, Paola, Tatiana Mendonça, Cláudia Pacheco e Luis Gustavo.

Aos colegas de laboratório, Alessandra Morielle, Alan Berlese, Sandra Maruyama e Camila Iunes.

À grande amiga Kelly Terumi Abe, exemplo de amizade e companheirismo, do qual jamais me esquecerei.

Às amigas Viviane Mariguela e Tatiane Mariguela, pelos maravilhosos anos de graduação que passamos juntas morando na mesma república, com quem aprendi que as verdadeiras amizades continuam a crescer, mesmo à distância.

Às amigas Dani, Regina e Rosana, companhia dos últimos dois anos.

Às amigas de infância e adolescência em Penápolis: Aline, Dani Paixão, Patrícia e Renatinha, que, mesmo com nossas vidas tomando rumos tão diferentes, conseguimos manter a essência da nossa amizade. Muito obrigada, também, pelo socorro sempre presente nas horas de sufoco.

À Mercedes, Recildo, Carolina e Derly: nos últimos anos, uma segunda família. Obrigada pelas palavras amigas nas horas difíceis e pela torcida.



Aos meus irmãos Cezar, Adilson e Paulo, e meus sobrinhos Layra, Elisana, Raul, Leonardo e Guilherme, pois mesmo estando longe e com algumas diferenças, sei que se orgulham de mim.

Ao Renê, por todo seu amor, carinho, dedicação e disposição a ajudar.

Aos meus pais, Francisco e Thereza, que sempre me incentivaram e depositaram total confiança em mim, pelo exemplo de moral e dignidade, pelo amor e todo esforço empregado pra que eu chegasse até aqui.



"Confia ao Senhor as tuas obras, e teus planos serão estabelecidos."

Provérbios 16:3

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original."

Albert Einstein

"Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar, não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E começa aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olho adiante, com graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.

E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam,... E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-la de vez em quando, e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende que falar pode ativar dores emocionais...

Descobre que se levam anos pra construir a confiança e apenas segundos para destruí-la; e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.

E que não importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.

E que bons amigos são uma família que nos permitiram escolher.

Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam...

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém; algumas vezes você tem que aprender a perdoar a si mesmo.

Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum tempo condenado.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.

Portanto, plante seu jardim e decore a sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores."

W. Shakespeare

I. Introdução



O desenvolvimento de organismos superiores implica no crescimento e diferenciação com a destruição direcionada e ordenada de células obsoletas. Células iniciando sua própria destruição é um fenômeno comum no desenvolvimento de invertebrados e vertebrados (BOWEN; LOCKSHIN, 1981). A morte seletiva de células é observada como um processo fundamental da embriogênese (SAUNDERS, 1966) e da morfogênese de insetos e anfíbios, a qual envolve a destruição massiva e coordenada de células e tecidos transientes (LOCKSHIN, 1981 apud JONES; BOWEN, 1993). Em insetos holometábolos, que passam pelas fases de ovo, larva (subdividida em subfases), pupa e adulto (Figura 1), mudanças desenvolvimentais drásticas ocorrem durante a metamorfose pós-embriônica. Transformações do último estágio larval para o indivíduo adulto, através do estágio de pupa, são acompanhadas por mudanças histológicas e bioquímicas. A metamorfose em insetos acarreta uma reconstrução radical dos planos corporais e a destruição massiva de tecidos larvais obsoletos é inerente a esta transformação, que se segue da substituição dos tecidos larvais por tecidos e estruturas adultas. Os processos que levam à destruição do tecido larval e formação de novos tecidos adultos são os eventos mais característicos do desenvolvimento pós-embriônico em dípteros (CLEVER, 1965; SCHIN; CLEVER, 1968 apud SCHIN; LAUFER, 1973).



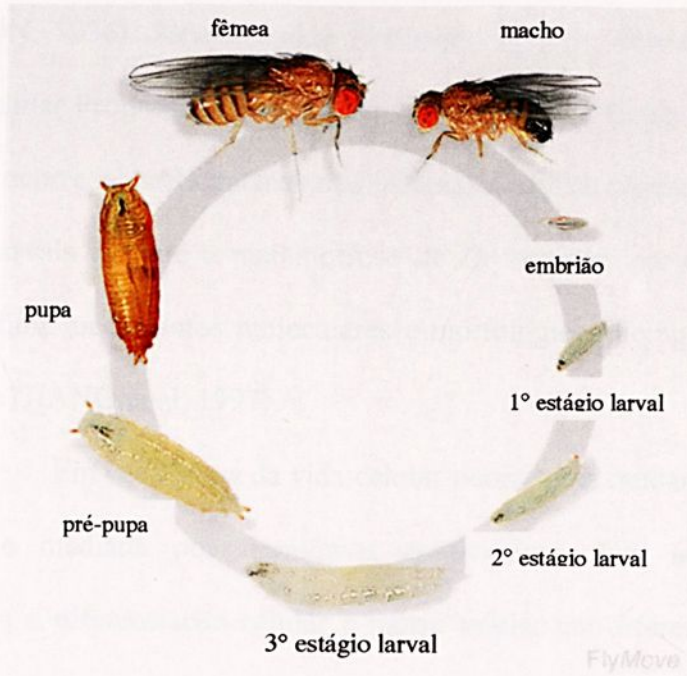


Figura 1: Ciclo de vida de *Drosophila* (FLYMOVE, 2003)

Em *Drosophila*, quase todos os órgãos são destruídos ou sofrem consideráveis modificações para formar o órgão adulto. Eles são destruídos por histólise e novas estruturas se desenvolvem em seu lugar a partir de grupos celulares embriônicos que permanecem indiferenciados no período larval (ROBERTSON, 1936). Sabe-se que a destruição massiva destes tecidos ocorre por Morte Celular Programada (MCP), no entanto, no que se diz respeito ao tipo de MCP que ocorre na metamorfose dos insetos, ainda há controvérsias. A MCP dos tecidos larvais durante a metamorfose de *Drosophila*, provém um sistema ideal para definir mecanismos moleculares e morfológicos de apoptose regulada por esteróides (JIANG et al, 1997).

Em cada etapa da vida celular ocorre uma mudança coordenada, provavelmente mediada por hormônios epigenéticos. Um único hormônio esteróide ativa a diferenciação celular e morte celular em diferentes tecidos em múltiplos estágios do desenvolvimento de *Drosophila*. Acredita-se que tais eventos estejam sob controle do hormônio da muda dos insetos, a ecdisona. Jiang et al. (1997) tiveram evidências de que a histólise da glândula salivar é uma resposta de MCP, desencadeada por estes hormônios esteróides.



1. 1. Glândula Salivar

A glândula salivar de *Drosophila* é um órgão relativamente simples (BRADLEY et al., 2001) e é formada por dois tipos celulares: as células do ducto e as células secretoras. As células secretoras são células epiteliais colunares que sintetizam altos níveis de proteínas. As células do ducto são células cuboidais que formam um tubo simples conectando as células secretoras à boca da larva (ANDREW et al., 2000). As glândulas salivares se originam de duas placas ectodermais de aproximadamente 100 células cada uma (CAMPOS-ORTEGA; HARTENSTEIN, 1997 apud ANDREW et al., 2000). Após a involução desta placa, a glândula se desenvolve sem divisões posteriores e conseqüentemente o número de células é fixado neste estágio do desenvolvimento. Somente algumas poucas células localizadas na junção entre o ducto e a glândula, escapam deste bloqueio mitótico, são as células do disco imaginal, que originarão a glândula salivar do indivíduo adulto. A ausência de atividade mitótica faz com que a glândula cresça simplesmente por aumento de volume das células secretoras e do ducto (BERENDES; ASHBURNER, 1978). Assim, todas as mudanças que ocorrem durante a sua diferenciação ocorrem nas células pré-existentes, simplificando grandemente a análise do desenvolvimento do órgão.

Concomitantemente aos movimentos necessários para a formação da glândula salivar embriônica, as futuras células secretoras também sofrem mudanças fisiológicas requeridas para os seus altos níveis de secreção. Durante a invaginação, as células secretoras iniciam múltiplas rodadas de

replicação do DNA sem divisão subsequente (endorreplicação) que geram os cromossomos politênicos necessários ao metabolismo aumentado destas células (SMITH; ORR-WEAVER, 1991). Nas larvas de terceiro estágio, o nível de politenia dos cromossomos das células posteriores é aproximadamente duas vezes maior que o das células da região anterior (BERENDES, 1965 apud BERENDES; ASHBURNER, 1978).

A principal função da glândula de *D. melanogaster* é a produção de glicosaminoglicanas que servem como um adesivo durante a formação do pupario (FRAENHKEL, 1953 apud VON GAUDECKER; SCHMALE, 1974). A secreção desta “cola” inicia nas glândulas salivares de *D. melanogaster*, aproximadamente no meio de terceiro estágio tardio (VON GAUDECKER; SCHMALE, 1974). Tal secreção foi observada por Berendes (1974), como grânulos refratários no citoplasma das células das glândulas. Estes grânulos começam a se formar nas células posteriores da glândula. O citoplasma glandular que até então era altamente basofílico perde essa característica quando os grânulos aparecem (LESHER, 1951a e 1952 apud BERENDES, 1978). O número de células com tais grânulos aumenta, da região posterior para anterior, no final do terceiro estágio tardio. Tais grânulos são PAS-positivos, ou seja, são corados pelo ácido periódico de Schiff. Todas as células glandulares sintetizam este material.

A glândula atinge seu tamanho máximo antes da formação do pupario, em seguida, os grânulos são exocitados no lúmen da glândula (VON GAUDECKER; SCHMALE, 1974).



Segundo Mitchell et al. (1977), a glândula salivar de *D. melanogaster* continua a funcionar como um importante órgão de secreção durante a pupação.

As glândulas salivares de *Drosophila* são relativamente homogêneas com respeito ao tipo celular e pelo fato de serem formadas por uma única camada de células, não existem diferenças na marcação devido a diferentes permeabilidades. Após um pico de atividade secretória, elas sofrem histólise por meio de MCP (THOMPOULOS et al., 1992; JOCHOVÁ et al., 1997).

I. 2. Morte Celular

A Morte Celular tem um papel essencial na manutenção dos tecidos renováveis. Um balanço homeostático parece ser conseguido através da interação de genes e hormônios tecido-específicos ou fatores de crescimento. Estes tipos de mortes celulares mediadas fisiologicamente e geneticamente são contrastadas com morte celular necrótica, resultado de trauma acidental (BOWEN, 1993; FARBER, 1985; TRUMP et al., 1981 apud BOWEN, 1993;). Desta forma a morte celular pode estar amplamente categorizada em Morte Celular Necrótica, isto é, patológica ou acidental e Morte Celular Programada (MCP).

A MCP é característica de tecidos normais, e pode ocorrer na forma de apoptose clássica, onde ocorre condensação do citoplasma, uma distinta



marginação da cromatina nuclear e ativação de endonucleases. Tais mudanças são acompanhadas por perdas das junções celulares e microvilosidades, dilatação do retículo endoplasmático rugoso, condensação das organelas, e eventualmente, o surgimento de esferas membranosas portadoras de fragmentos nucleares (corpos apoptóticos). Os corpos apoptóticos são engolfados por células vizinhas ou macrófagos (BOWEN et al., 1996).

Enquanto a necrose (ou oncose) serve para remover células danificadas de um organismo, a apoptose é um processo seletivo regulado para a deleção de células supérfluas, transformadas ou infectadas. A apoptose está envolvida em embriogênese, metamorfose, atrofia de tecidos endócrino-dependentes, tecidos normais em renovação e uma variedade de condições patológicas. Os processos de necrose e apoptose diferem em numerosos caminhos. Durante os estágios iniciais da necrose, as células e suas organelas (tais como mitocôndrias) sofrem lise devido à ruptura da membrana. O conteúdo celular então extravasa levando à inflamação, e por último, à desintegração celular. Em contraste, como foi mencionado acima, células apoptóticas são caracterizadas por perda da assimetria dos fosfolípidos da membrana celular, condensação da cromatina, redução do tamanho nuclear, contração da célula, formação de bolhas na membrana e a decomposição da célula em corpos apoptóticos. Halicka et al. (2000) observaram em seu trabalho que, no curso da apoptose, o RNA celular é sequestrado e empacotado em grânulos e em seguida, em corpos apoptóticos, separadamente do DNA. Tal separação parece iniciar com a segregação nucleolar, e foi observada em células humanas da linhagem HL-60 que estavam sofrendo



apoptose espontânea em cultura, ou sendo tratadas com drogas que causam dano ao DNA, ou com ligantes de morte celular.

Ao nível bioquímico, a apoptose é caracterizada por digestão do DNA nas regiões ligantes entre os nucleossomos, formando fragmentos oligonucleossômicos que podem ser separados por eletroforese em gel de agarose formando um padrão de bandas conhecido como “escada” de DNA (“DNA ladder” - COMPTON, 1992 apud MPOKE; WOLFE, 1997). Em seções teciduais, a fragmentação do DNA é frequentemente detectada pela técnica TUNEL (GRAVIELE et al., 1992), em que uma enzima transferase incorpora nucleotídeos marcados com biotina nos terminais 3'OH livres do DNA de cadeias simples ou duplas fragmentados.

A apoptose é peculiarmente um fenômeno característico de metazoários. Na verdade, morte organizada é observada em unicelulares, mas somente os metazoários possuem uma maquinaria elaborada evoluída para dismantelar, destruir ou dispor as células. Nos últimos anos, a apoptose tem sido considerada como um processo chave na homeostase, que juntamente com a proliferação celular, regula o balanço entre perda e ganho de células, necessário para o estabelecimento e manutenção de tecidos dos metazoários. A apoptose remove, por exemplo, as células não mais necessárias como neurônios e células musculares essenciais para a locomoção larval nos insetos holometábolos. Atua também como parte do controle de qualidade e mecanismo de reparo que contribuem para o alto nível de plasticidade durante o desenvolvimento por compensação de muitos erros genéticos estocásticos. Apoptose excessiva ou



insuficiente é agora relacionada como causa ou consequência de muitas patologias humanas e, conseqüentemente, existe intenso interesse em apoptose como alvo farmacológico.

A ativação da apoptose ocorre por meio de um programa controlado geneticamente, mas também responde a sinais extrínsecos, como por exemplo: radiação ionizante, infecção viral, interações celulares e hormônios.

As primeiras evidências dos genes que regulam apoptose vieram dos estudos do nematóide *Caenorhabditis elegans*. Durante a sua ontogenia, das suas 1090 células somáticas, 131 cometem suicídio, levando a um adulto de 959 células (MEIER et al., 2000). Análises genéticas identificaram três principais genes que são diretamente envolvidos na regulação e execução da morte; os produtos de *ced-3* e *ced-4* executam morte celular, enquanto que sua ação é antagonizada pelo produto de *ced-9* (ELLIS; HOROWITZ, 1986 apud MEIER; EVAN, 1998). *Ced-3* codifica uma caspase, uma das classes de proteases cisteínas que clivam após resíduos aspartato em proteínas alvo e que constituem a chave das máquinas destrutivas da morte celular. A família das caspases inclui genes altamente conservados nos metazoa, esta conservação é reflexo do seu papel chave nas maquinarias apoptóticas (MEIER et al., 2000). O supressor de morte *ced-9* codifica uma proteína associada à membrana, a qual é funcional e estruturalmente relacionada ao *bcl-2* (oncogene anti-apoptótico de vertebrados) (ADAMS; CORY, 1998). CED-4 seria uma proteína adaptadora crítica na ativação da maquinaria degradativa de caspases (CHINNAIYAN et al., 1997). Assim, CED-4 é necessária para ativar CED-3, e a interação de CED-9 com CED-



4 o impede de interagir com CED-3. Cada um destes genes tem pelo menos um equivalente funcional em mamíferos. CED-9 é um membro da família de reguladores de apoptose Bcl-2, CED-4 é homólogo ao Apaf-1, e CED-3 é uma caspase prototípica de vermes (HENGARTNER, 1998).

Em *Drosophila*, a maquinaria é mais complexa que em nematódeos (MEIER et al., 2000). Pesquisadores identificaram uma região do cromossomo 3, 75G-2, que é essencial para toda a morte celular que ocorre durante a sua embriogênese (WHITE et al., 1994). Três genes foram identificados na região: *reaper*, *head involution defective (hid)* e *grim*, sendo cada um deles um mediador chave de morte celular no desenvolvimento. A deleção de *reaper*, *grim* e *hid* bloqueia a apoptose e a superexpressão de qualquer um deles é suficiente para matar células que normalmente sobreviveriam. A expressão de *reaper* e *grim* é confinada àquelas células que estão destinadas a morrer. Em contraste, *hid* é expresso não somente nas células destinadas a morrer, mas também nas que sobrevivem (MEIER; EVAN, 1998). Sabe-se que a morte celular induzida por cada um dos produtos destes genes é precedida pela ativação de caspases. Na presença da proteína baculovírus p53, um inibidor de caspases, a apoptose dirigida por *rpr*, *hid* e *grim* é bloqueada (WHITE et al., 1994).

Morte Celular Programada, incluindo apoptose, ocorre como resultado da ativação de genes específicos (SCHWARTZ, 1990), mas não é sempre acompanhada por encolhimento celular e fragmentação do DNA (BOWEN; BOWEN, 1990 apud BOWEN et al., 1996).



Lockshin e Zakeri (1990), argumentam fortemente por uma categoria separada de Morte Celular Programada no Desenvolvimento, que especificamente não exhibe ativação de endonucleases. Bursh et al. (1992 apud OBERHAMMER et al., 1993), também concluem que a ativação de endonucleases não seria um bom marcador de apoptose.

Estudos recentes têm mostrado que a MCP, nem sempre precisa ocorrer pelo modo apoptótico clássico, e que a expressão molecular e morfológica de morte celular depende de quais caminhos específicos são engajados ou inibidos.

Grande número de autores tem descrito formas de morte celular aparentemente não apoptóticas ou formas apoptóticas aberrantes no desenvolvimento de insetos (SCHWARTZ, 1990) e metamorfose (BOWEN, 1993; BOWEN et al. 1996; LOCKSHIN; ZAKERI, 1996 apud DAI; GILBERT, 1997; MORAES; BOWEN, 2000). Segundo Bowen et al. (1996), que estudaram morte celular nas glândulas salivares de *Calliphora vomitoria* durante o desenvolvimento, o clássico marcador apoptótico, fragmentação e degeneração de DNA, não se aplica a este modelo, sendo que neste caso, o fenômeno é acompanhado por síntese de RNA, DNA e proteínas.

No entanto, Gregorc e Bowen (1998) e Moraes e Bowen (2000), estudando o modelo *Apis mellifera*, em glândulas salivares e túbulos de Malpighi, respectivamente, detectaram fragmentação do DNA frequentemente associada à MCP.



Dai e Gilbert (1997) analisaram as glândulas protorácicas de *Manduca sexta* e concluíram que ambos os tipos de morte celular ocorrem. Foram observadas características de morte apoptótica como: cromatina condensada, fragmentação do DNA nuclear, formação de corpos apoptóticos e heterofagocitose, e de morte celular autofágica como: numerosos vacúolos autofágicos e intensa endocitose membranar. Considerando estas duas modalidades de colapso celular, Armbruster et al. (1986), argüem que as duas coexistem nas glândulas salivares de *Calliphora erythrocephala*. Nesta mesma espécie, Levy e Bautz (1985) detectaram degeneração por apoptose, e eventos autofágicos ocorrendo nos estágios mais tardios.

Lee e Baehrecke (2001) realizaram um importante estudo sobre MCP em *Drosophila*. Baseados em uma ampla revisão na literatura, tais autores definiram três tipos de MCP. O primeiro tipo, a apoptose, já definida anteriormente, é encontrada em células que morrem isoladamente e que exibem condensação do núcleo e citoplasma, seguida por fragmentação e fagocitose por células que degradam seu conteúdo celular. O segundo tipo, conhecido como autofagia, é observado quando grupos de células ou tecidos inteiros são destruídos. Estas células contêm vacúolos autofágicos no citoplasma que funcionam na degradação dos componentes celulares. O terceiro tipo foi denominado morte não lisossômica, é a menos comum e é caracterizada por inchamento de cavidades com bordas membranosas, seguido por degeneração, sem atividade lisossômica.



A MCP em glândulas salivares de *Drosophila* tem sido considerada do tipo autofágica por Lee e Baehrecke (2001). No entanto, muitos trabalhos da literatura recente sugerem que na MCP deste órgão ocorrem características morfológicas e moleculares dos dois processos (apoptose e autofagocitose), sugerindo uma interação entre a atuação de ambos.

Células apoptóticas podem ser facilmente visualizadas em embriões vivos com corantes vitais. O alaranjado de acridina é específico para formas apoptóticas de MCP, não apresentando marcações em células sofrendo morte necrótica provocada por injúria. Até mesmo corpos apoptóticos dentro dos macrófagos são marcados (ABRANS et al., 1993).

O modo pelo qual este corante marca preferencialmente células apoptóticas, não é bem conhecido, embora muitos mecanismos sejam possíveis, incluindo um aumento da permeabilidade de membrana nuclear. Segundo Abrans et al. (1993), mudanças bioquímicas características para formas apoptóticas são responsáveis por esta afinidade seletiva para o alaranjado de acridina.

De modo geral, o alaranjado de acridina tem duas diferentes características de marcação: em tecidos fixados ele é usado como corante metacromático, marcando diferentemente ácidos nucleicos de fita simples em laranja e fita dupla em verde (DRARZYNKIEWICZ, 1990 apud LU; WOLFE, 2001). *In vivo* ele serve como um indicador de pH, sendo sequestrado por compartimentos ácidos como lisossomos e fagossomos (ZELENIN, 1966).



I. 3. Fosfatases

A adição de fosfatos a proteínas pelas enzimas quinases e sua remoção pelas fosfatases são, provavelmente, os mecanismos mais utilizados para manter a homeostase das células. Estes mecanismos são rápidos, versáteis e reversíveis, sendo utilizados por todos os organismos.

As fosfatases são responsáveis pela hidrólise de fosfatos de ésteres orgânicos, algumas atuam especificamente sobre um único substrato, como as fosfatases serina-treonina e fosfatase tirosina. Outras, cuja especificidade de substrato é menos limitada, dividem-se em dois grandes grupos: fosfatases ácidas, que apresentam atividade ótima em pHs de baixos valores, e fosfatases alcalinas, com atividades ótimas em altos valores de pH.

A base para a técnica citoquímica é a hidrólise de fosfatos de ésteres orgânicos durante a incubação. A liberação dos íons envolve uma série de mecanismos. Estes íons são geralmente precipitados como sais insolúveis, como chumbo, fosfato de cálcio e cério, e então convertidos a sulfetos coloridos que são visíveis sob o microscópio de luz.

A fosfatase ácida desempenha papel fundamental na autólise de tecidos e é considerada um marcador lisossomal. Sua atividade tem sido muito estudada durante a metamorfose de insetos. Lockshin (1981 apud JONES; BOWEN, 1993) observou que a perda do tecido larval que ocorre durante a metamorfose, é acompanhada por aumento da atividade histoquímica e bioquímica dos lisossomos. A autofagia e a degradação histolítica têm sido



freqüentemente associadas com eminência de morte celular. Bowen e Bowen (1990), consideram que a hidrolase lisossomal fosfatásica ácida, pode ser um marcador para a atividade lítica na histólise celular (apud JONES; BOWEN, 1993).

Jones e Bowen (1993) descreveram o perfil bioquímico e a localização estrutural da fosfatase ácida nas glândulas salivares de *D. melanogaster*. Bioquimicamente, a fosfatase ácida demonstrou picos de atividade em glândulas de larvas alimentadas, seguido de declínio acentuado. Entretanto, precedendo o início da histólise celular, há aumento da atividade enzimática, o qual é mantido. No decorrer do desenvolvimento, uma forma intensa e difusa de enzimas, é vista acompanhando um citoplasma vacuolizado. Ultraestruturalmente, a enzima está localizada em lisossomos, complexo de Golgi, corpos multivesiculares e superfície do retículo endoplasmático rugoso. Uma forma extracisternal e citosólica aparece imediatamente antes da lise celular e, eventualmente, mostra distribuição compreensível. Jones e Bowen (1993), sugeriram que a autofagia e a apoptose são complementares na fragmentação da glândula salivar de *D. melanogaster*.

O papel das fosfatases ácidas no núcleo é desconhecido. A questão da atividade fosfatásica nuclear é muito controversa. Sua presença no núcleo tem sido explicada por acúmulo de fosfatos inorgânicos, como um artefato devido a depósitos não específicos ou difusão de produtos do citoplasma para o núcleo durante a marcação (BARKA; ANDERSON, 1962; WASHITAN; SATO,



1976). No entanto, métodos que eliminam depósitos artefatuais, diminuem, mas não eliminam a marcação nuclear (BARKA; ANDERSON, 1962).

Deltour et al. (1981) observaram diferenças nos depósitos em núcleos quiescentes e germinativos de *Zea mays*, e em células antes e depois de choque térmico. Estes resultados, juntamente com os de Van de Wall et al. (1976) sugerem uma relação entre transcrição nuclear e atividade fosfatásica ácida. Isto ainda é suportado pelo fato de que a inibição da transcrição é acompanhada pela supressão de atividade da fosfatase ácida em algumas plantas (WALBOT, 1971).

Azeredo-Oliveira e Mello (1998; 1997) também encontraram marcações para fosfatase ácida na cromatina e nucléolo das células de insetos heteropteros, e no centro fibrilar do nucléolo.

Cruz-Landim et al. (2002) postularam que existe uma relação entre a intensidade de marcação e nível de transcrição em cromatina de abelha, o que também seria aplicável ao nucléolo, desde que a marcação dentro da massa nucleolar e a distribuição da cromatina organizadora nucleolar sejam coincidentes.

Pasteur e Kastritsis (1971) detectaram, com o uso de microeletroforese, duas diferentes fosfatases ácidas em glândula salivar de *Drosophila*. Uma delas aumenta em intensidade nas quatro horas seguintes à eversão do espiráculo da larva, e a outra praticamente desaparece em 12 horas após a eversão. A última pode estar relacionada a mudanças bioquímicas e aos eventos histolíticos que ocorrem durante a MCP das glândulas salivares de *Drosophila*.



I. 4. Objetivos

O presente estudo teve como objetivos principais:

- Verificar as características da morte celular programada que ocorre nas glândulas salivares das duas espécies de *Drosophila* (*D. arizonae* e *D. mulleri*) durante o desenvolvimento larval-pupal;
- Analisar a atividade enzimática da fosfatase ácida durante as fases do desenvolvimento estudadas, procurando relacionar essa atividade com a morte celular das glândulas salivares nas mesmas espécies;



PROGRAMMED CELL DEATH IN SALIVARY GLANDS OF *II. Artigo I*

PROGRAMMED CELL DEATH IN SALIVARY GLANDS OF

Protoparva artemesia and *H. dentata*

Protoparva artemesia and H. dentata

Protoparva artemesia and H. dentata

Protoparva artemesia and H. dentata

Protoparva artemesia and H. dentata

Departamento de Biologia - Instituto de Biologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Caixa Postal 682 - 21909-900 - Rio de Janeiro, RJ

Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Biologia - Caixa Postal 682 - 21909-900 - Rio de Janeiro, RJ

Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Biologia - Caixa Postal 682 - 21909-900 - Rio de Janeiro, RJ

CEP: 21909-900 - Rio de Janeiro, RJ

**MORTE CELULAR PROGRAMADA EM GLÂNDULAS
SALIVARES DE *Drosophila arizonae* e *D. mulleri*.**

**PROGRAMMED CELL DEATH IN SALIVARY GLANDS OF
Drosophila arizonae and *D. mulleri*.**

Patricia Ianella and Mary Massumi Itoyama

Laboratório de Biologia Celular

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas –
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (IBILCE – UNESP).

Endereço para correspondência: Rua Cristóvão Colombo, 2265

CEP: 15054-000 – São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil



Resumo

Durante a metamorfose de insetos holometábolos, ocorre reconstrução radical dos planos corporais, e os tecidos larvais são substituídos por tecidos adultos. A destruição dos tecidos larvais ocorre por Morte Celular Programada (MCP). Vários pesquisadores têm focado esta temática em seus estudos, entretanto, ainda há muitas controvérsias sobre o tipo de MCP que ocorre durante a metamorfose dos insetos. Com objetivo de obter informações sobre esse processo controverso, estudamos glândulas salivares de *Drosophila arizonae* e *D. mulleri* durante o desenvolvimento larval-pupal. Dos resultados obtidos, podemos concluir que o tipo de MCP que ocorre neste órgão, nas espécies analisadas, é morfológicamente típico de apoptose, isto é, caracteriza-se pela formação de núcleos picnóticos, seguidos de fragmentação destes em corpos apoptóticos; pudemos observar também que a histólise ocorre, em ambas as espécies, entre 22 e 23 horas após a pupação; que não houve diferenças significativas entre as duas espécies analisadas; e que a apoptose não ocorre simultaneamente em todas as células, mas seus eventos ocorrem na mesma ordem e tempo nas células deste tecido.

Palavras Chave: *Drosophila*; Morte Celular Programada; Glândula Salivar; Desenvolvimento.



Abstract

Considering the process of metamorphosis of the holometabolic insects, a radical reconstruction of the body plane occurs and the larval tissues (destroyed by Programmed Cell Death – PCD) are replaced by adult tissues. Several researchers have focalized this theme in their studies. However, there are a lot of controversies about the kind of PCD that occurs during insect metamorphosing. With the objective of obtaining information about such controversial process, we studied salivary glands of *Drosophila arizonae* and *D. mulleri* during larval-pupal developing. By the results obtained we can conclude that the type of the PCD, which occurs in these organ, *D. arizonae* and *D. mulleri*, is morphologically typical of apoptosis (characterized by formation of the pycnotics nuclei followed of its fragmentation in apoptotics bodies). We could also observe that the histolysis, in both species, happens between 22 and 23 hours after the pupation; there were not significant differences between studied species; and the apoptosis does not occur simultaneously in all cells, but it s events occurs in the same order and time in thi tissue

Key words: *Drosophila*; Programmed Cell Death; Salivary Gland; Development;



Introdução

Células iniciando sua própria destruição é um fenômeno comum no desenvolvimento de invertebrados e vertebrados (Bowen e Lockshin, 1981). A morte seletiva de células é observada como um processo fundamental da embriogênese (Saunders, 1936) e da morfogênese de insetos e anfíbios, a qual envolve a destruição massiva e coordenada de células e tecidos transientes (Lockshin, 1981 *apud* Jones e Bowen, 1993). Em insetos holometábolos, a metamorfose acarreta reconstrução radical dos planos corporais, levando à substituição dos tecidos larvais por tecidos e estruturas adultas. Os processos que direcionam tais mudanças estão sob controle do hormônio da muda dos insetos, a ecdisona (Jiang *et al.*, 1997 e 2000).

Em *Drosophila*, quase todos os órgãos são destruídos, e novas estruturas se desenvolvem em seu lugar a partir de grupos celulares embriônicos que permanecem indiferenciados no período larval (Robertson, 1966). Sabe-se que a histólise deste tecido ocorre por Morte Celular Programada (MCP), no entanto, ainda existem muitas controvérsias no que se refere ao tipo de MCP que ocorre na metamorfose de insetos. Jiang *et al.* (1997) tiveram evidências de que a histólise das glândulas salivares de *Drosophila melanogaster* é uma resposta de MCP desencadeada por hormônios esteróides. Muitos autores têm descrito formas de morte celular aparentemente não apoptóticas ou formas apoptóticas incomuns no desenvolvimento (Schwartz, 1990) e metamorfose de insetos (Lockshin e Zakeri, 1996; Bowen *et al.*, 1993; Moraes e Bowen, 2000). Segundo Bowen *et al.* (1993), que estudaram morte celular nas glândulas salivares de *Calliphora*

vomitória durante o desenvolvimento, o clássico marcador apoptótico, fragmentação e degeneração de DNA, não se aplica a este modelo. No entanto, Gregorc e Bowen (1997) e Moraes e Bowen (2000), no modelo *Apis mellifera*, em glândulas protorácicas e intestino médio de larvas, respectivamente, detectaram fragmentação do DNA frequentemente associada à morte celular. Dai e Gilbert (1997), concluíram que ambos os tipos de MCP ocorrem nas glândulas salivares de *Manduca sexta*. Os achados de Armbruster *et al.* (1986) e Levy e Bautz (1985), em *Calliphora erythrocephala*, permitem inferir que as duas modalidades de MCP (apoptose e autofagia), coexistem nas glândulas salivares desta espécie. A MCP das glândulas salivares de *Drosophila melanogaster* foi considerada autofágica por Lee e Baehrecke (2001) e Oliveira (2003), mas estes autores não descartaram a possibilidade dos dois mecanismos atuarem em conjunto.

Levando-se em consideração tais discordâncias da literatura, referentes ao tipo de MCP que ocorre nos insetos holometábolos, o presente estudo teve como principal objetivo, detectar morfologicamente, através da Reação de Feulgen, o tipo de morte celular que ocorre nas glândulas salivares de *Drosophila arizonae* e *D. mulleri*, e suas características. E desta maneira, verificar em que momento da transição pupa-adulto ocorre a histólise deste tecido, e se existem diferenças significativas entre as duas espécies analisadas.

Material e Métodos

As espécies simpátricas *Drosophila arizonae* e *D. mulleri* (grupo repleta), foram mantidas em meio de cultura de cactus em câmara de temperatura constante a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em garrafas de $\frac{1}{4}$ de litro.

Larvas de terceiro estágio tardio (3T), pré-pupas (PP – larvas com espiráculos evertidos, com envoltório não rijo), pupas (pré-pupas envelhecidas) de 8 (P8), 16 (P16), 22 (P22), 22:30 (P22:30) e 23 horas (P23) foram utilizadas para análise das células das glândulas salivares.

As glândulas nos diferentes estágios de desenvolvimento foram extraídas e submetidas a uma hidrólise com HCl 4 N por 65 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a um banho rápido em HCl 0,1 N para bloquear a hidrólise. O material foi então corado com Reativo de Schiff por 40 minutos a 37°C e submetidos a três banhos de cinco minutos em água sulfurosa e três banhos rápidos em água destilada.

As glândulas foram analisadas e as imagens capturadas no microscópio de luz AXIOSKOP 2 ZEISS.

Resultados e Discussão



relacionadas a eventos de MCP. Como ilustração nas Figuras 1A-C e 2A-C estão apresentadas as células das glândulas salivares de pupas P16 das duas espécies, sem alterações relacionadas com MCP. Pupas P22 de ambas as espécies, começam a apresentar sinais de histólise (Figuras 1D-F e 2D-F setas), como por exemplo, núcleos picnóticos (condensados), que são característicos de células apoptóticas. Nas glândulas de P22:30, encontramos um estágio mais avançado de degeneração do órgão podendo ser observados núcleos típicos deste tecido, núcleos pré-apoptóticos (núcleos de células que já estão no cometimento de morte, que se encontram mais condensados que o normal) e núcleo apoptóticos, bem como corpos apoptóticos, resultante da fragmentação destes últimos (Figuras 1G-I e 2G-I). Nas glândulas de pupas P23 das duas espécies, podemos observar processos bem avançados de histólise, e por isso são encontrados somente núcleos pré-apoptóticos e apoptóticos, sendo que a maioria destes estão fragmentando-se ou já se encontram fragmentados em corpos apoptóticos (Figuras 1J-N e 2J-L).

Como mencionado, o tipo de morte celular que ocorre durante a histólise da glândula salivar de *Drosophila*, tem sido alvo de controvérsia entre vários autores. Alguns autores têm atribuído esta degeneração ao mecanismo de apoptose (Berendes e Ashburner, 1978; Jiang *et al.*, 1997; Farkas e Merchler, 2000), outros à autofagia (Lee e baehrecke, 2001; Oliveira, 2003), e outros ainda, tem chegado a um consenso de que se trata de uma combinação entre estes dois mecanismos (Dai e Gilbert, 1997; Levy e Bautz, 1985).

Em estudos realizados por vários autores em insetos holometábolos, excelentes modelos para o estudo de MCP no desenvolvimento,

uma grande variedade de fenótipos de MCP são observados. Bowen *et al.* (1993), em seus estudos com *Calliphora vomitoria*, não encontraram as características de apoptose clássica como contração celular e compactação da cromatina. Lockshin e Zakeri (1984, 1990 e 1991 *apud* Jones e Bowen, 1993) chegaram a sugerir uma classificação diferenciada para a morte celular que ocorre no desenvolvimento dos insetos, a Morte Celular do Desenvolvimento, que especificamente não exhibe ativação de endonucleases. Lee e Baehrecke (2001) arguem em seu estudo, que a MCP ativada por hormônios esteróides ocorre via autofagia utiliza alguns mecanismos regulatórios comuns à apoptose. Jochová *et al.* (1997), estudando o rearranjo da tubulina e actina do citoesqueleto durante a MCP nas glândulas salivares de *D. mulleri*, obtiveram resultados consistentes com a hipótese de que, uma extensa atividade autofágica ocorre durante a degradação do núcleo.

De acordo com Armbruster *et al.* (1986) as duas modalidades coexistem nas glândulas salivares de *Calliphora erythrocephala*. Nesta mesma espécie, Levy e Bautz (1985) chegaram à conclusão de que as glândulas salivares e epiderme sofrem degeneração por apoptose, e eventos autofágicos ocorrem somente nos estádios mais tardios.

Dai e Gilbert (1997) sugerem que a apoptose é o mecanismo básico pelo qual as glândulas protorácicas de *Manduca sexta* sofrem histólise, o que é suportado por Jiang *et al.* (1997), que analisaram a histólise de diversos tecidos de *Drosophila* durante a metamorfose em resposta à atuação do hormônio ecdisona. Neste trabalho, os autores encontraram, entre outras características típicas de apoptose, a fragmentação de DNA.



No presente trabalho podemos observar que as glândulas, tanto de *D. arizonae* como de *D. mulleri*, começam a se degenerar a partir de 22 horas após a pupação, aproximadamente, existindo uma variação individual do tempo em que a histólise se inicia. Não existe nenhuma variação morfológica relacionada a MCP nas fases do desenvolvimento anteriormente analisadas, provavelmente porque este órgão é um dos últimos a degenerar. Segundo Jiang *et al.* (1997), a metamorfose pós embriônica em *Drosophila*, é desencadeada por hormônios esteróides. As glândulas salivares se degeneram em resposta a um segundo pulso de ecdisona liberado mais tardiamente.

A partir destes resultados podemos concluir que a morte não ocorre em todas as células simultaneamente, sendo aparentemente aleatória quanto à região na qual iniciarão as alterações celulares. Desta maneira, observamos nas fases intermediárias da histólise, núcleos morfológicamente típicos, núcleos pré-apoptóticos (núcleos que já são picnóticos, mas se encontram em um estágio intermediário entre típico e apoptótico) e núcleos apoptóticos. Já as glândulas de estágios mais avançados de desenvolvimento, como por exemplo, pupas P24, podemos observar a maioria dos núcleos apoptóticos fragmentando-se em corpos apoptóticos de diferentes tamanhos, variando de muito pequenos a grandes.

O tempo de degeneração total da glândula de *D. arizonae* e *D. mulleri* pode variar de uma a uma hora e meia, e seu início ocorre, geralmente, 22 horas depois que a larva empupa (PP). Com respeito ao tipo de MCP que ocorre nas glândulas salivares de *Drosophila*, podemos afirmar que ela é



O tempo de degeneração total da glândula de *D. arizonae* e *D. mulleri* pode variar de uma a uma hora e meia, e seu início ocorre, geralmente, 22 horas depois que a larva empupa (PP). Com respeito ao tipo de MCP que ocorre nas glândulas salivares de *Drosophila*, podemos afirmar que ela é morfológicamente característica de apoptose. O aspecto geral da histólise deste tecido, nas duas espécies analisadas, é semelhante, não existindo, aparentemente, nenhuma característica que permita diferenciá-las.

Desta maneira, nosso trabalho vem corroborar com os resultados da literatura que atribuem a histólise de tecidos de insetos holometábolos à apoptose (Dai e Gilbert, 1997; Jiang *et al.*, 1997). Evidentemente, a hipótese de que os dois mecanismos de MCP frequentemente relacionados com a histólise destes organismos, apoptose e autofagia, possam atuar em conjunto não é descartada. No entanto, podemos afirmar com certeza que a MCP deste tecido, nas espécies analisadas, tem características morfológicas de apoptose.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.



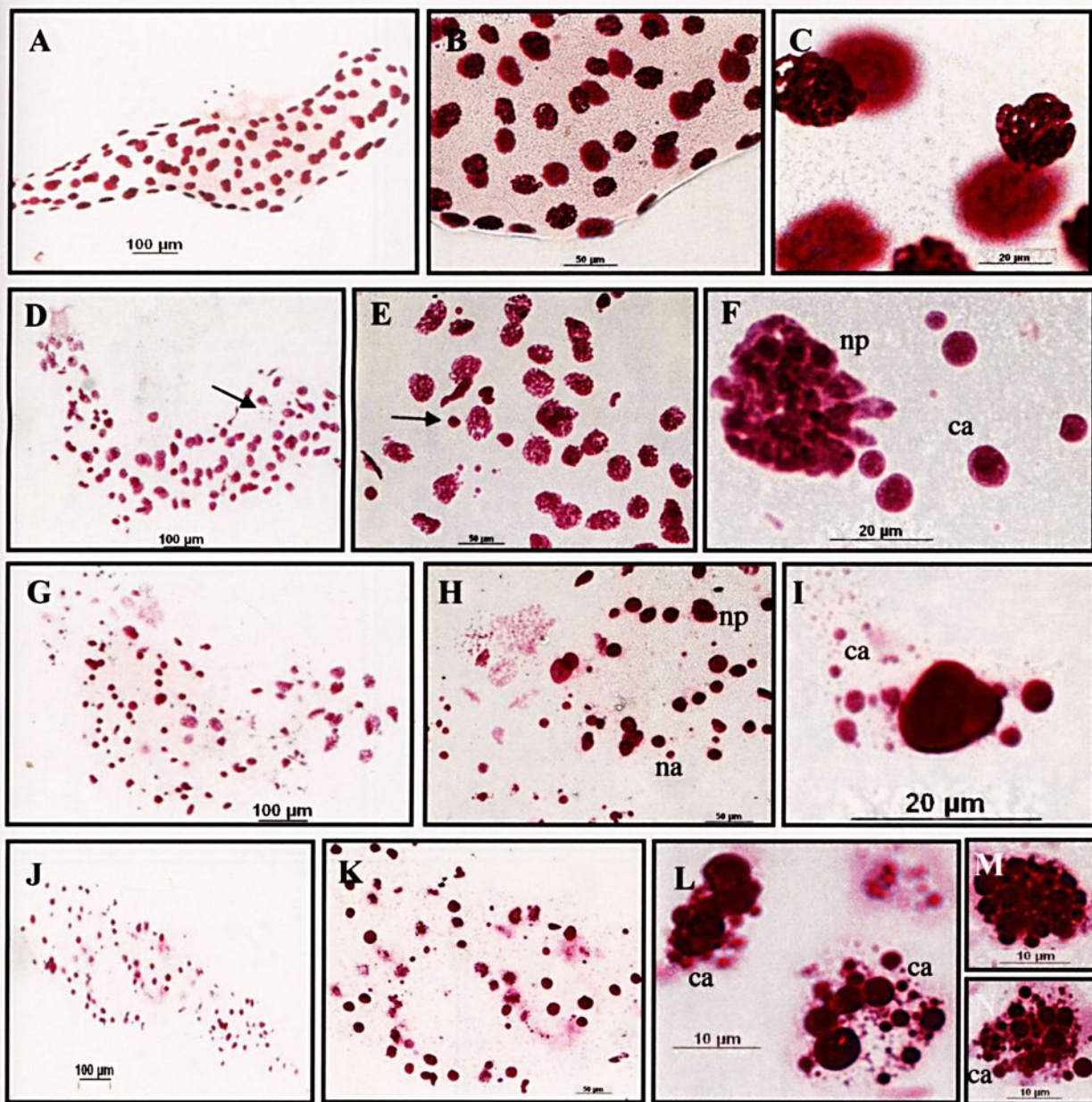


Figura 1 A-N: Glândulas salivares de pré-pupas de *Drosophila arizonae* envelhecidas por 16 (P16, A-C), 22 (P22, D-F), 22:30 (P22:30, G-I) e 23 horas (P23, J-N), submetidas à Reação de Feulgen. **ca:** corpos apoptóticos; **na:** núcleo apoptótico; **np:** núcleos pré apoptóticos; **setas:** núcleos apoptóticos.

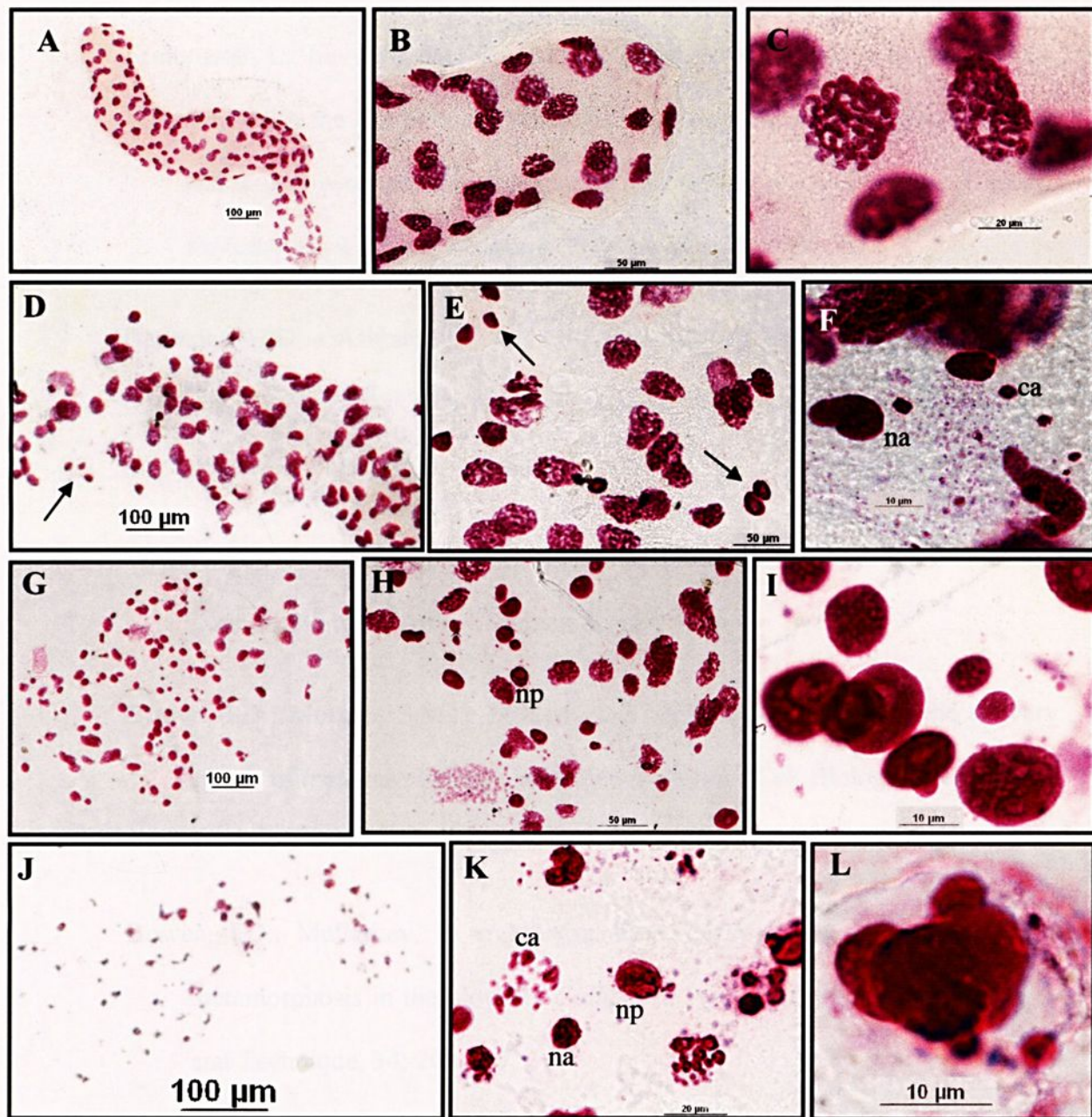


Figura 2 A-N: Glândulas salivares de pré-pupas de *Drosophila mulleri* envelhecidas por 16 (P16, A-C), 22 (P22, D-F), 22:30 (P22:30, G-I) e 23 horas (P23, J-N), submetidas à Reação de Feulgen. **ca:** corpos apoptóticos; **na:** núcleo apoptótico; **np;** núcleos pré apoptóticos; **setas:** núcleos apoptóticos.

Referências Bibliográficas

- Armbruster, L.; Levy, M. Mathieu, M.N. e Bautz, M.M (1986). Acid phosphatase activity in the hemolymph, hemocytes, fat body and salivary glands during larval and prepupal development in *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae). *Comp. Biochem. Physiol.* 84b: 348-354.
- Berendes, H.D. e Ashburner, M. (1978). The salivary glands. In: Ashburner, M and Whigth, T.R.F. The salivary glands and biology of *Drosophila*. London: Academic Press, v. 2b, 453-498.
- Bowen, I.D. e Lockshin, R.A. (1981). *Cell Death in Biology and Pathology*. London and New York: Chapman & Hall, 493pp.
- Bowen, I.D.; Morgan, S.M. e Mullarkey, K. (1993). Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. *Cell Biology International*, 17: 13-33.
- Bowen, I.D.; Mullarkey, K. e Morgan, S.M. (1996). Programmed cell death metamorphosis in the blow-fly *Calliphora vomitoria*. *Microscopy Research and Technique*, 34: 202-217.
- Dai, J. e Gilbert, L.I. (1997). Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. *Insect Biochem Molec Biol*, 27: 69-78.

- Farkas, R. e Merckler, B.M. (2000). The timing of *Drosophila* salivary gland apoptosis displays an I(2)gl-response. *Cell Death Differ*, 7: 89-101.
- Gregorc, A. e Bowen, I.D. (1997). Programmed cell death in the honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. *Cell Biology International*, 21: 151-158.
- Jiang, C.; Baehrecke, E.H. e Thummel, C.S. (1997). Steroid regulation cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development*, 124: 4673-4683.
- Jiang, C.; Lamblin, A.J.; Steller, H. e Thummel, C.S. (2000). A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Molecular Cell*, 5: 445-455.
- Jochova, J.; Zakeri, Z. e Lockshin, R.A. (1997). Rearrangement of the tubulin and actin cytoskeleton during programmed cell death in *Drosophila* salivary glands. *Cell Death and Differentiation*, 4: 140-149.
- Jones, H.E. e Bowen, I.D. (1993). Acid phosphatase activity in the larval salivary glands of developing *Drosophila melanogaster*. *Biology International*, 17: 305-315.
- Lee, C. e Baehrecke, E.H. (2001). Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development*, 128: 1443-1455.
- Levy, M. e Bautz, A. (1985). Degeneration of larval salivary gland during metamorphosis of the blow fly, *Calliphora erythrocephala* Meigen (Diptera: Calliphoridae). *Int J Insect Morphol & Embryol*, 14: 281-290.

Moraes, R.L.M.S. e Bowen, I.D. (2000). Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Cell Biology International*, 21: 151-158.

Oliveira, C.C. (2003). Alterações morfológicas e estruturais nas glândulas salivares de *Drosophila saltans*, relacionadas com a morte celular programada. Dissertação de Mestrado, UNESP, São Paulo.

Robertson, C.W. (1936). The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*: including an accurately timed account of the principal morphological changes. *J. Morphol.* 59: 351-399.

Saunders, J.D. (1966). Death in embryonic systems. *Science*, 154: 604-611.

Schwartz, L.M. (1981). The role of cell death genes during development. *Bioessays*, 13: 389-395.

O artigo anteriormente apresentado será submetido a *Reviews*

Genetics and Molecular Biology



III. Artigo II

O artigo anteriormente apresentado será submetido à Revista
Genetics and Molecular Biology.



ALABRANTADO DE ACRIDINA NAS GLANDAS SALIVARES DE

Demophila arigwaia E *D. nulleri* DURANTE O DESENVOLVIMENTO
LARVAL-FETAL

ACID PHOSPHATASE ACTIVITY AND ACRIDINA ORANGE
STAINING AT THE SALIVARY GLANDS OF *Demophila arigwaia* AND
D. nulleri DURING LARVAL-FETAL DEVELOPMENT

Patrícia Inácio e Mary Massumi Jeyaraj

Laboratório de Biologia Celular

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

IBB-CE/UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo

Departamento de Biologia - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas -

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (IBB-CE - UNESP)

Endereço para correspondência: Rua Crisóvão César, 2265

CEP: 13054-000 - São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil

**ATIVIDADE FOSFATÁSICA ÁCIDA E MARCAÇÃO DO
ALARANJADO DE ACRIDINA NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE
Drosophila arizonae E *D. mulleri* DURANTE O DESENVOLVIMENTO
LARVAL-PUPAL.**

**ACID PHOSPHATASE ACTIVITY AND ACRIDINA ORANGE
STAINING AT THE SALIVARY GLANDS OF *Drosophila arizonae* AND
D. mulleri DURING LARVAL-PUPAL DEVELOPMENT.**

Patrícia Ianella e Mary Massumi Itoyama

Laboratório de Biologia Celular

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas –
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (IBILCE – UNESP).

Endereço para correspondência: Rua Cristóvão Colombo, 2265

CEP: 15054-000 – São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil



Resumo

20/08/2017
f. 2.381/07

Durante a metamorfose, as glândulas salivares de *Drosophila* sofrem Morte Celular Programada. Este é o mecanismo pelo qual estas estruturas são eliminadas, dando lugar ao novo órgão do adulto. Muitos estudos têm relacionado atividade fosfatásica ácida com este evento, mas muitas questões ainda permanecem. O presente estudo tem o objetivo de caracterizar a atividade fosfatásica ácida durante o desenvolvimento larval-pupal de *Drosophila arizonae* e *D. mulleri*, e verificar se ocorre acidificação do núcleo durante este período. Dos resultados obtidos, podemos concluir que a atividade fosfatásica ácida citoplasmática aumenta gradualmente durante as fases estudadas; que pode haver tipos de fosfatases ácidas específicas do evento de apoptose; que as glândulas de pupas após 20 horas de empupação, já apresentam sinais de alterações bioquímicas relativas à permeabilidade nuclear; que tal acidificação pode ser devido à fusão de lisossomos com o núcleo poucas horas antes da apoptose; a autofagia parece ter um papel secundário na morte celular.

Palavras Chave: *Drosophila*; Fosfatase Ácida; Morte Celular; Desenvolvimento; Alaranjado de Acridina.

Abstract

During the metamorphosis, the salivary glands of *Drosophila* suffer Programmed Cell Death (PCD). This is the process by the way this structures are removed allowing the formation the new adults organs. Many studies have related acid phosphatase activity with this event, but many questions still remain. The present study has the objective to characterize the acid phosphatase activity during the larval-pupal development of *Drosophila arizonae* and *D. mulleri*, and to verify if it occurs acidification of the nucleus during this period. By the results obtained we can conclude that the cytoplasmatic acid phosphatase activity increases gradually during the studied phases; that it can have specific acid phosphatase types to the event of apoptosis; that the glands of pupes after 20 hours of empupation already present signals of biochemistry alterations relative to permeability nuclear; that such acidification can be due to fusion of lisossomes with the nucleus few hours before apoptosis; the autophagy seems to have a secondary paper in the cell death.

Key words: *Drosophila*; Acid Phosphatase; Cell death; Development; Acridine Orange



Introdução

A Morte Celular Programada (MCP) é um evento típico da metamorfose pós-embriônica de insetos holometábolos. Tal evento, em insetos, está sob controle do hormônio da muda, a ecdisona (Jiang *et al.*, 1997), e leva à substituição de todos os órgãos e tecidos larvais por adultos, a partir de células primordiais indiferenciadas. As glândulas salivares de *Drosophila* estão programadas para morrer, mas continuam atuando como importantes órgãos secretores até a formação do pupário (Berendes e Ashburner, 1978). Nas espécies simpátricas *D. arizonae* e *D. mulleri*, a degeneração total da glândula ocorre rapidamente entre 22 e 23 horas após a formação do pupário (Ianella e Itoyama, 2004).

A MCP é característica de tecidos normais e pode ocorrer na forma de apoptose clássica. Nesta ocorre condensação do núcleo e citoplasma, enquanto a morfologia das organelas celulares permanece bem preservada, e em muitos casos, a célula condensando fragmenta-se em corpos apoptóticos. A marginação da cromatina e ativação de endonucleases também são frequentes.

Lee e Baehrecke (2001) realizaram um importante estudo sobre MCP em *Drosophila*, e baseados em ampla revisão da literatura, tais autores definiram três tipos de MCP: o primeiro é a apoptose, já definido anteriormente, é encontrada em células que morrem isoladamente e que exibem condensação do núcleo e citoplasma, seguida por fragmentação e fagocitose por células vizinhas. O segundo tipo, conhecido como autofagia, é observado quando grupos de células ou tecidos inteiros são destruídos. Tais células contêm vacúolos autofágicos no citoplasma que atuam na degradação dos componentes celulares. O terceiro tipo

foi denominado morte não-lisossômica, é a menos comum e é caracterizada por inchamento de cavidades com bordas membranosas, seguido de degeneração sem atividade lisossômica.

A MCP tem sido considerada do tipo autofágica nas glândulas de *Manduca sexta* (Dai e Gilbert, 1997). Os achados de Armbruster *et al.* (1986) e Levy e Bautz (1985), em *Calliphora vomitória*, permitem inferir que as duas modalidades de MCP (apoptótica e autofágica), coexistem nas glândulas salivares desta espécie. Gregorc e Bowen (1997) e Moraes e Bowen (2000) estudando o modelo *Apis mellifera*, detectaram fragmentação do DNA nuclear freqüentemente associada à morte celular. Tal característica é típica de apoptose. Ianella e Itoyama (2004), estudando o tipo de morte celular que ocorre nas glândulas salivares de *D. arizonae* e *D. mulleri* durante o desenvolvimento larval-pupal concluíram que o tipo de MCP deste órgão possui características morfológicas de apoptose (núcleos picnóticos e fragmentação em corpos apoptóticos). No entanto, não descartaram a possibilidade de apoptose e autofagia atuarem em conjunto.

Células apoptóticas podem ser facilmente visualizadas em embriões vivos com corantes vitais, como por exemplo, o alaranjado de acridina. O modo pelo qual este corante marca preferencialmente células apoptóticas, não é conhecido, embora muitos mecanismos sejam possíveis, incluindo um aumento da permeabilidade da membrana nuclear. Zelenin (1966) observou que em células vivas, o alaranjado de acridina serve como um indicador de pH, tornando-se capturado em compartimentos acídicos tais como lisossomos e fagossomos.

Sabe-se que durante a histólise de tecidos de insetos holometábolos, espera-se que algumas funções enzimáticas, como as das fosfatases ácidas, tornem-se alteradas, uma vez que há um colapso funcional e morfológico das células. As fosfatases ácidas são um amplo grupo de enzimas não específicas que hidrolisam uma variedade de ésteres orgânicos com a liberação de íon fosfato, em um pH ótimo que varia de 4,5 a 6,0 (Essner, 1973). Elas têm sido consideradas marcadores lisossomais, mas alguns autores detectaram sítios extralisossomais. Sua atividade tem sido muito estudada durante a metamorfose dos insetos, pois alguns autores associam sua atividade com eminência de morte celular. As fosfatases ácidas atuam por meio da degradação hidrolítica de tecidos. Lockshin (1981 *apud* Jones e Bowen, 1993) observou que a perda do tecido larval que ocorre durante a metamorfose de *Drosophila* é acompanhada por um aumento da atividade bioquímica e histoquímica dos lisossomos.

Jones e Bowen (1993) descreveram o perfil bioquímico e localização estrutural das fosfatases ácidas em glândulas salivares de *Drosophila*. Antes da histólise ocorre um aumento da atividade fosfatásica ácida relacionada a MCP em diversas espécies de insetos (Gregorc e Bowen, 1997; Bowen *et al.*, 1996; Bowen, 1993; Armbruster *et al.*, 1986; Schin e Laufer, 1973; Aidells *et al.*, 1971).

Levando-se em consideração as discordâncias existentes sobre a MCP da metamorfose dos insetos e a ausência de dados relativos à atuação das fosfatases ácidas durante os processos de MCP, o presente estudo teve como

objetivo estabelecer uma relação entre atividade desta enzima com a MCP e corroborar com a elucidação do tipo de MCP que ocorre em *Drosophila*.

Material e Métodos

Foram estudadas glândulas salivares de larvas, pré-pupas e pupas de diferentes estádios de desenvolvimento das duas espécies simpátricas *Drosophila arizonae* e *D. mulleri*. As espécies foram mantidas em garrafas de 1/4 de litro com meio de cultura de cactus, em temperatura constante de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As fases do desenvolvimento utilizadas foram terceiro estágio tardio (3T), pré-pupas (PP) e pupas (pré-pupas envelhecidas) por 8 (P8), 16 (P16), 20 P(20), 22 (P22), 22:30 (P22:30) e 23 horas (P23).

Dos indivíduos nos estádios acima mencionados foram retiradas as glândulas salivares, as quais foram submetidas à reação citoquímica para fosfatase ácida, segundo descrito por Gömori (1950, com modificações) e, também, coradas com alaranjado de acridina como corante vital (segundo Abrans *et al.*, 1993).

Para a reação de fosfatase ácida, as glândulas não fixadas foram incubadas por 45 minutos na solução de incubação (tampão fosfato, β -glicerofosfato e nitrato de chumbo) a 37°C , e após, lavadas em tampão fosfato. Em seguida, foram tratadas com sulfeto de amônia a 1% por 2 minutos, lavadas com água destilada, e por fim montadas em glicerina.

Para a coloração com alaranjado de acridina, as glândulas foram submetidas à solução de alaranjado de acridina (5µg/ml em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2) por cinco minutos.

As lâminas foram analisadas e as imagens capturadas no microscópio de luz AXIOSKOP 2 ZEISS. Para as lâminas de fluorescência foi utilizado o filtro verde (FITC).

Resultados

A glândula inteira de todos os estádios do desenvolvimento analisados foi marcada positivamente para esta técnica. No terceiro estádio tardio (3T) de *Drosophila arizonae* (Figura 1A-C) e *D. mulleri* (Figura 3A-C) observamos marcações no nucléolo, núcleo (especificamente nos cromossomos) e marcações citoplasmáticas. Nas fases de pré-pupa (PP) (Figuras 1D-F e 3D-F) e pupa P8 (Figuras 1G-I e 3G-I), de ambas as espécies, os nucléolos marcaram-se fortemente (Figuras 1F e I e 3F e I), mas o núcleo foi marcado em menor intensidade que na fase 3T. As glândulas destas fases mostraram um aumento gradativo nas marcações citoplasmáticas.

Nas glândulas de pupas P16 de *D. arizonae* (Figura 2A-C) e *D. mulleri* (Figura 4A-C) observamos uma forte marcação citoplasmática por toda a glândula, e nos núcleos celulares, os cromossomos politênicos foram intensamente marcados. Nas fases P22, P22:30 e P23 das duas espécies analisadas (Figuras 2D-J e 4D-J), os seus citoplasmas e núcleos foram intensamente marcados. Os núcleos pré-apoptóticos (np) em *D. arizonae* (Figura 2I) e *D.*

mulleri (Figura 4L), núcleos apoptóticos (na – Figura 4L) e corpos apoptóticos (ca) em *D. arizonae* (Figuras 2J, M) e *D. mulleri* (Figuras 4F, I e L), encontram-se intensamente marcados.

Nas glândulas coradas com o alaranjado de acridina, na fase 3T (Figuras 5A-C e 6A-C), das duas espécies analisadas, observa-se uma leve marcação nas regiões das membranas celulares. Os núcleos das células desta fase, não foram evidenciados. As fases desenvolvimentais PP, P8 e P16 de ambas as espécies, apresentaram o mesmo padrão de marcação, representado pela fase P16 (Figura 5D-F e 6D-F), onde os núcleos celulares estão negativamente marcados. Nas pupas P20 de *D. arizonae* e *D. mulleri*, alguns núcleos estão positivamente marcados pelo alaranjado de acridina, isto é, são permeáveis à acridina. A maioria das células das glândulas de pupas P22 de ambas as espécies apresentaram núcleos positivamente marcados.

Discussão

De modo geral, nas fases do desenvolvimento analisadas, não houve diferenças significativas nos resultados obtidos nas duas espécies. Todos os estágios do desenvolvimento analisados, de ambas as espécies, apresentaram resultados positivos à reação para fosfatase ácida. Os citoplasmas e os núcleos de todas as fases se encontram marcados, sendo que a atividade citoplasmática aumentou gradativamente durante o período analisado. A marcação nuclear ocorre nos cromossomos politênicos, sendo mais intensa no estágio 3T (Figuras 1C e 2C) e P16 (3C e 4C) do que em PP (1F e 2F) e P8 (1I e 2I). Segundo Cruz-Landim

et al. (2002), as diferenças de intensidade e distribuição dos depósitos nucleares podem ser interpretadas como variações no estado funcional do núcleo. O mesmo foi observado por Deultour *et al.* (1981) e Van de Wall *et al* (1976). Desta maneira, uma relação entre transcrição nuclear e atividade fosfatásica ácida pode ser inferida. Tal inferência pode ser reforçada uma vez que a inibição da transcrição é acompanhada pela supressão da atividade fosfatásica ácida em algumas plantas (Walbodt, 1971). Isto nos permite concluir que os estágios 3T e P16 apresentam maior atividade transcricional que os outros estádios analisados.

As marcações existentes nos núcleos de P22 a P23 (fase na qual ocorre a apoptose segundo Ianella e Itoyama, 2004), podem ser de dois tipos: como depósitos granulares intranucleares (Figura 2I, np – núcleo pré-apoptótico) e marcações no núcleo como um todo (Figura 2L, na – núcleo apoptótico), estes tipos de marcações, provavelmente estão relacionadas à acidificação do núcleo. Lu e Wolfe (2001) associaram a atividade de fosfatases ácidas ao evento de degradação do macronúcleo em *Tetrahymena*. Este organismo é um protozoário ciliado que possui dois núcleos, e em determinada fase do seu ciclo, o seu macronúcleo é degradado por um evento com características de apoptose. Tais autores observaram que corpos lisossomais circundam o núcleo que vai ser degradado e logo após se fundem a ele, concomitantemente estes núcleos tornam-se permeáveis à acridina, um corante vital específico para apoptose.

Pasteur e Kastritsis (1971) detectaram bioquimicamente, por microeletroforese, a presença de fosfatase ácida em extratos totais e de glândulas salivares em todos os estádios do desenvolvimento analisados. Comparações do

homogeneizado total com o glandular revelaram duas bandas coincidentes. Estas duas bandas também apresentam um padrão de evolução similar nos dois extratos. Uma delas desaparece até 12 horas após a eversão do espiráculo (empupação), a outra parece aumentar em intensidade após este período, levando à conclusão de que esta última está relacionada aos eventos de morte celular. A partir destes dados podemos inferir que existem tipos de fosfatase atuantes no núcleo antes e durante as fases em que ocorre a apoptose, mas estas possuem diferentes funções.

As glândulas de 3T quando coradas com o alaranjado de acridina, não apresentam marcação nuclear. Nesta fase, aparecem grânulos altamente refratáveis nas células da glândula (Berendes e Ashburner, 1978). Tais grânulos são coráveis por Ácido Periódico de Schiff (PAS), específico para polissacarídeos. Estes grânulos, no final do terceiro estágio tardio e antes da empupação, são eliminados para o lúmen da glândula para compor a “cola” que a larva vai usar para construir seu casulo. É possível que a presença destes grânulos no citoplasma das células de glândulas de larvas 3T, impeça a visualização do núcleo, com marcação negativa para o alaranjado de acridina.

Das glândulas dos estádios de pré-pupa PP a pupas P16, nas quais não há mais material PAS-positivo no citoplasma celular, podemos notar os núcleos destas células negativamente marcados, ou seja, o corante não penetra no núcleo das células.

Nas pupas de P20, de ambas as espécies, visualizamos alguns núcleos com marcação positiva para o alaranjado de acridina. Segundo Ianella e Itoyama (2004) algumas células das glândulas de pupas P22 são apoptóticas, e

outras pré-apoptóticas. Nesta fase, a maioria dos núcleos são marcados com acridina, e podemos associar esta permeabilidade nuclear à acridina com morte celular eminente.

Vários autores têm relacionado a atividade fosfatásica ácida com morte celular ocorrendo por autofagia (Lee e Baehrecke, 2001; Oliveira, 2003; Jochova *et al.*, 1997) ou eventos autofágicos ocorrendo junto com apoptose (Dai e Gilbert, 1997; Armbruster *et al.*, 1986). Em, nosso estudo, observamos a principal característica de apoptose, que são os corpos apoptóticos, marcados pela técnica de fosfatase ácida. Assim, associamos a atividade fosfatásica ácida com autofagia, mas como um evento secundário na morte celular das glândulas das espécies de *Drosophila* analisadas. As fosfatases presentes nestes corpos apoptóticos, podem estar atuando na degradação de componentes proteínáceos do núcleo.

Conclusões

A partir dos dados obtidos neste trabalho em conjunto com os dados da literatura, podemos inferir que, de maneira geral, não existem diferenças significativas que permitam distinguir entre os processos das duas espécies analisadas neste trabalho, *Drosophila arizonae* e *D. mulleri*.

As glândulas de ambas as espécies mostram sinais morfológicos de apoptose a partir de 22 horas após a empupação, mas apresentam sinais de alterações bioquímicas relativas à permeabilidade nuclear a partir de 20 horas após a empupação. Esta acidificação pode ser devido à fusão de lisossomos com o

núcleo em algumas poucas horas antes do evento apoptótico, porém, isto precisa ser melhor estudado.

A atividade fosfatásica ácida citoplasmática aumenta gradualmente durante as fases estudadas (larva a pupa). Pode haver tipos de fosfatases ácidas específicas aos eventos de apoptose. Admitimos que a autofagia tenha um papel secundário na morte celular deste tecido.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

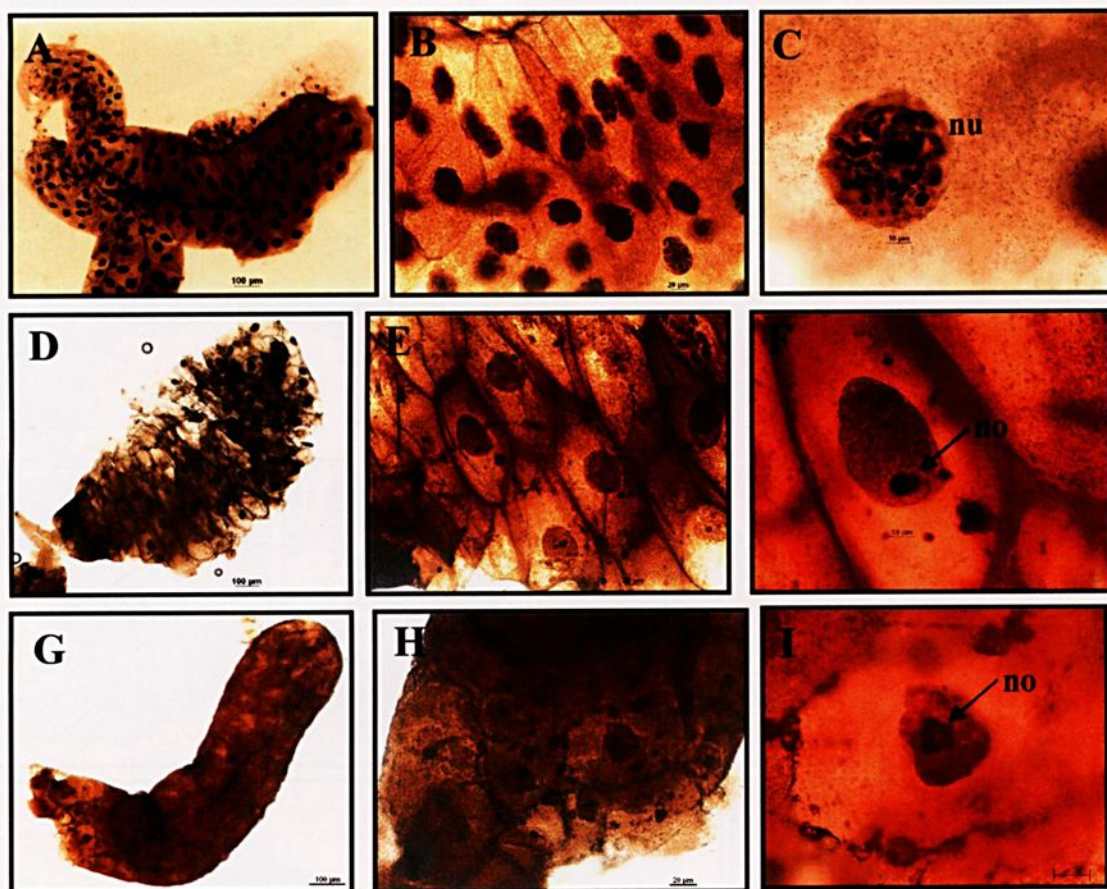


Figura 1 A-I: Glândulas salivares de *Drosophila arizonae*, submetidas à reação citoquímica para fosfatase ácida. **A-C** terceiro estágio tardio (3T); **D-F**:pré-pupa (PP); **G-I**: pré-pupa envelhecida por 8 horas (P8). **nu**: núcleo; **no**: nucléolo.

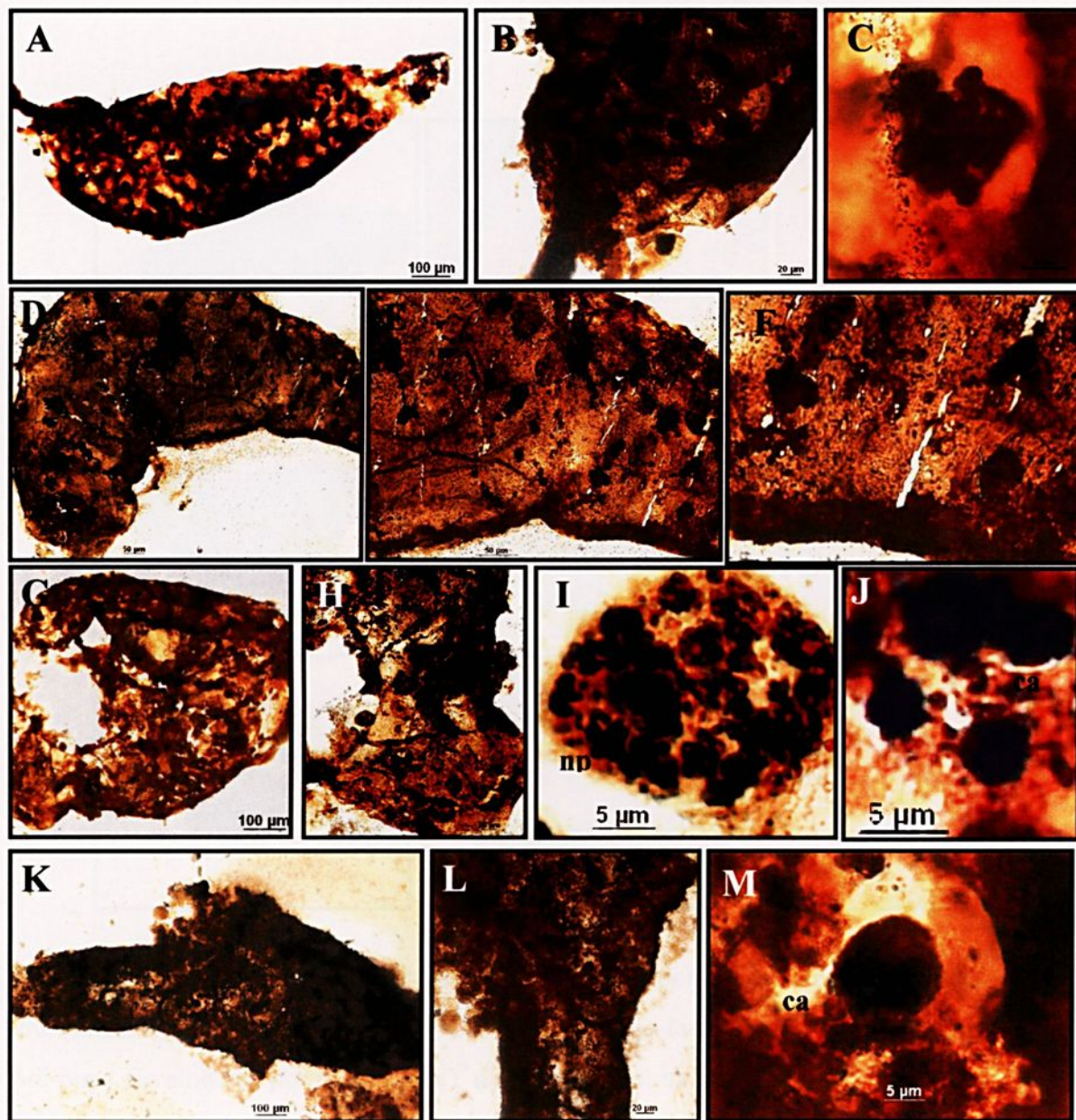


Figura 2 A-M: Glândulas salivares de *Drosophila arizonae* submetidas à reação citoquímica para fosfatase ácida. Pré-pupas envelhecidas por 16 (P16, A-C), 22 (P22, D-F), 22:30 (P22:30, G-I) e 23 horas (P23, J-M). np: núcleos pré-apoptóticos; nu: núcleo; ca: corpos apoptóticos.

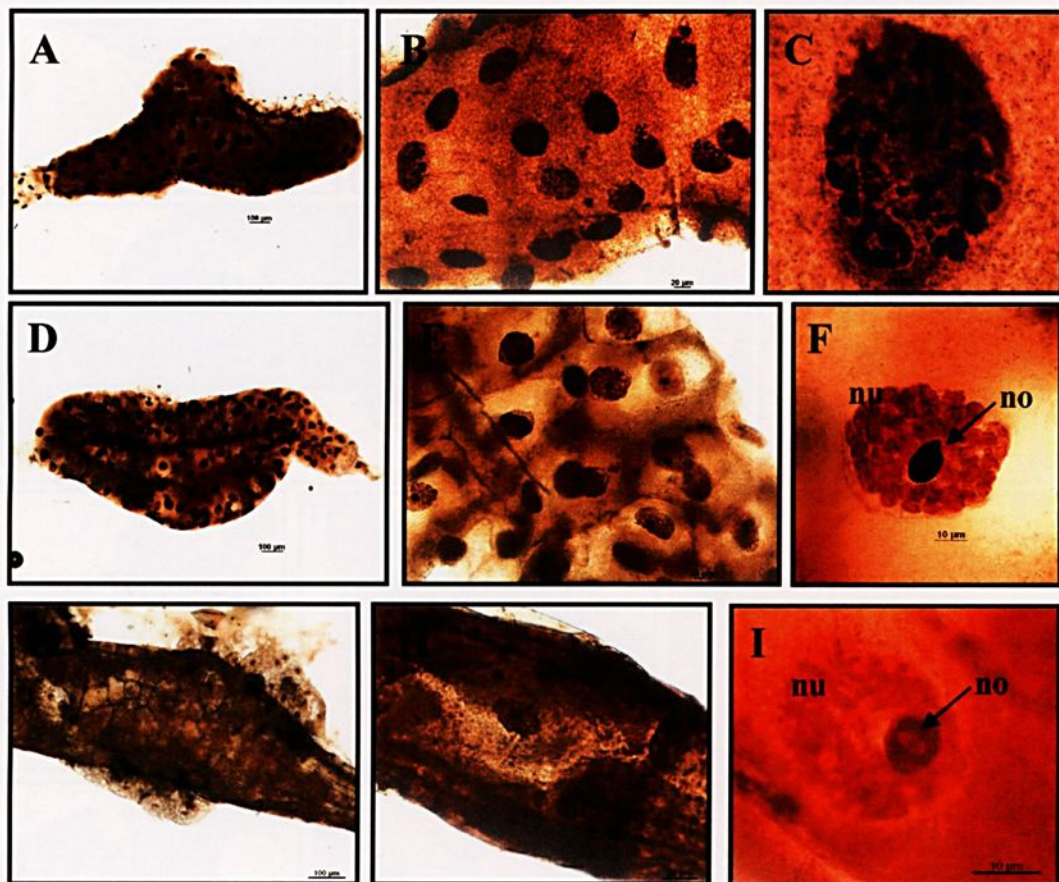


Figura 3 A-I: Glândulas salivares de *Drosophila mulleri*, submetidas à reação citoquímica para fosfatase ácida. **A-C** terceiro estágio tardio (3T); **D-F**:pré-pupa (PP); **G-I**: pré-pupa envelhecida por 8 horas (P8). **nu**: núcleo; **no**: nucléolo.

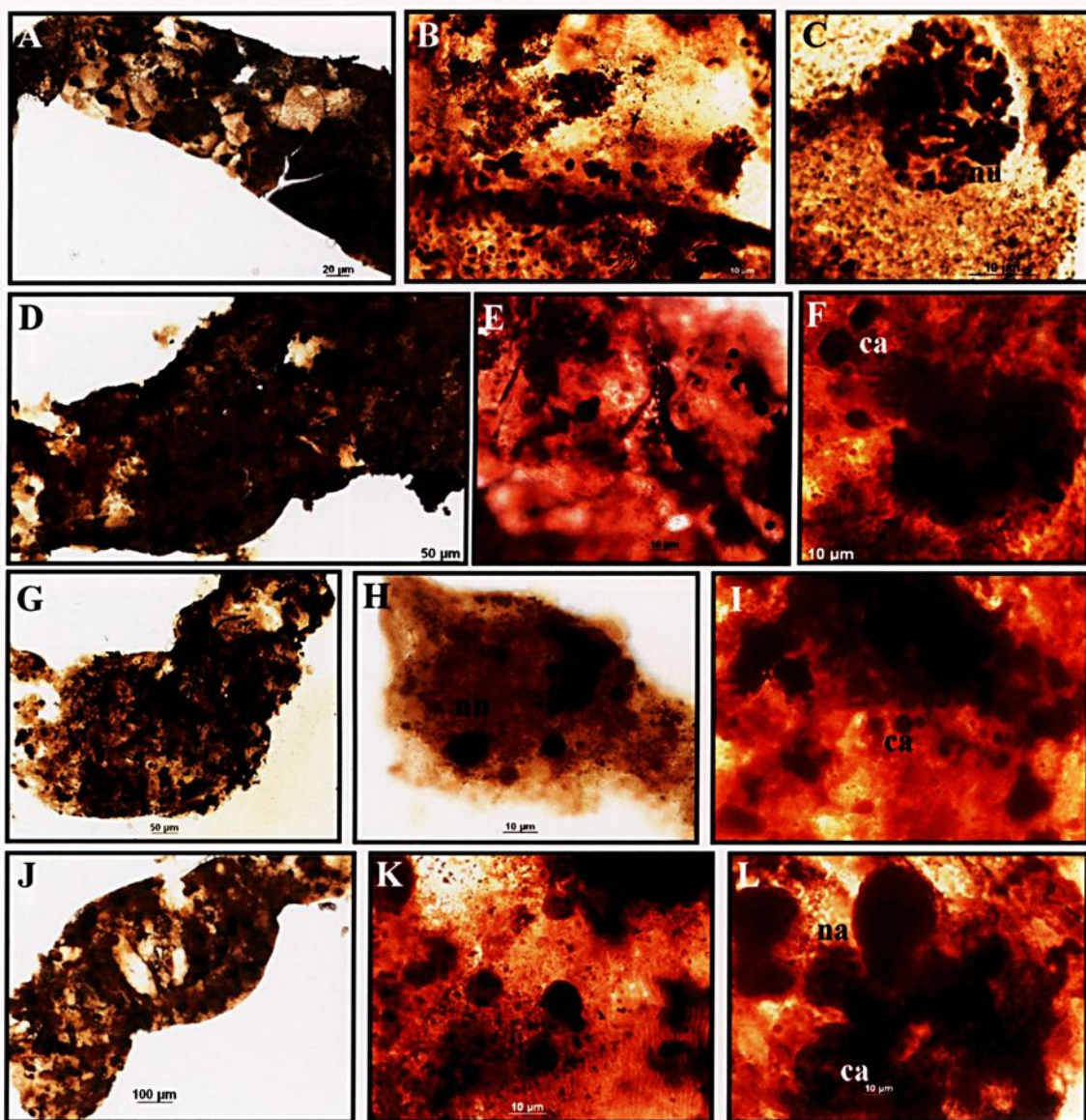


Figura 4 A-M: Glândulas salivares de *Drosophila mulleri* submetidas à reação citoquímica para fosfatase ácida. Pré-pupas envelhecidas por 16 (P16, A-C), 22 (P22, D-F), 22:30 (P22:30, G-I) e 23 horas (P23, J-M). np: núcleos pré-apoptóticos; nu: núcleo; ca: corpos apoptóticos.

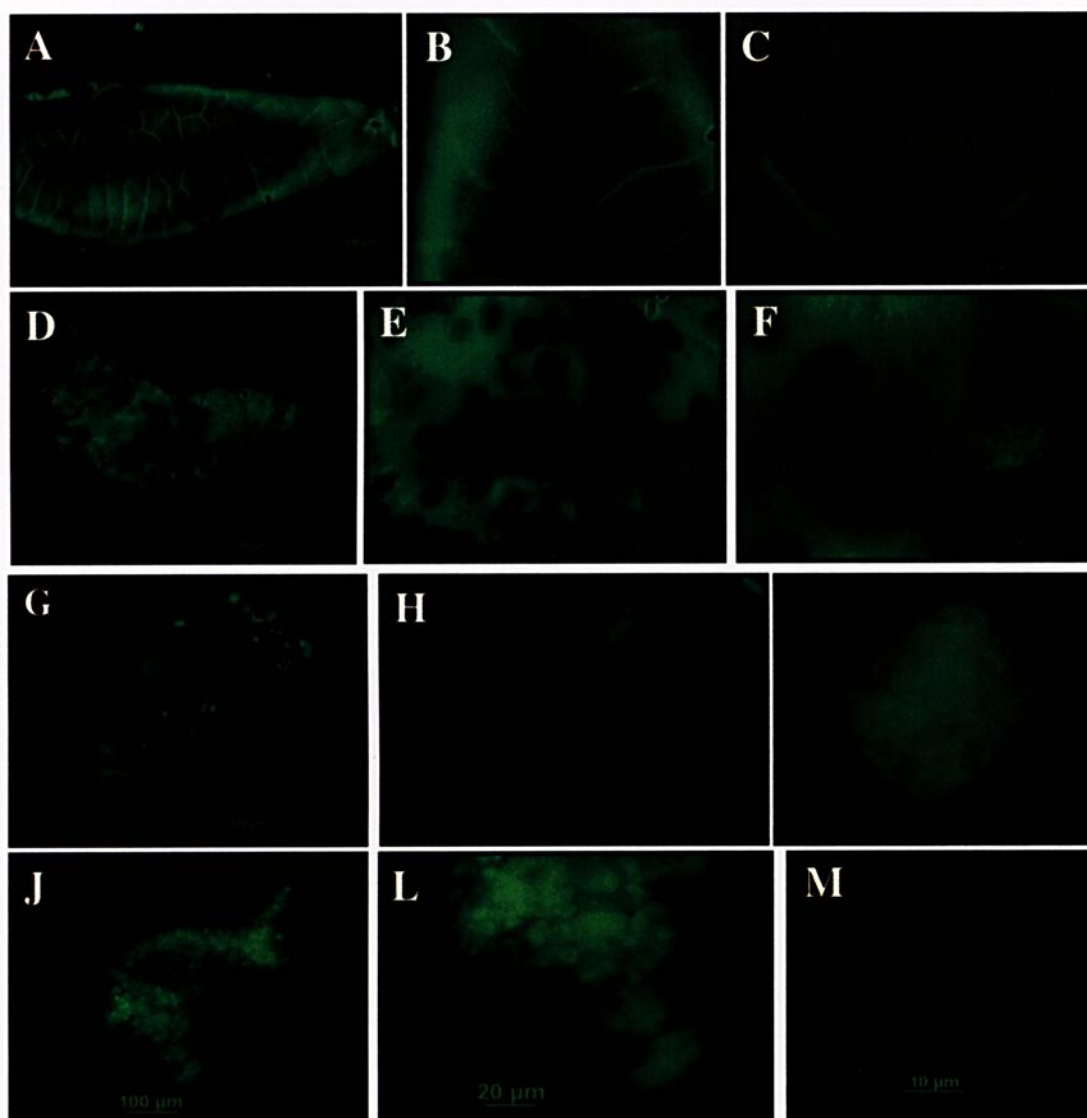


Figura 5 A-M: Glândulas salivares de *Drosophila arizonae*, coradas com alaranjado de acridina: **A-C:** 3T; **D-F:** P16; **G-I:** P20; **J-M:** P22. **nu:** núcleo.

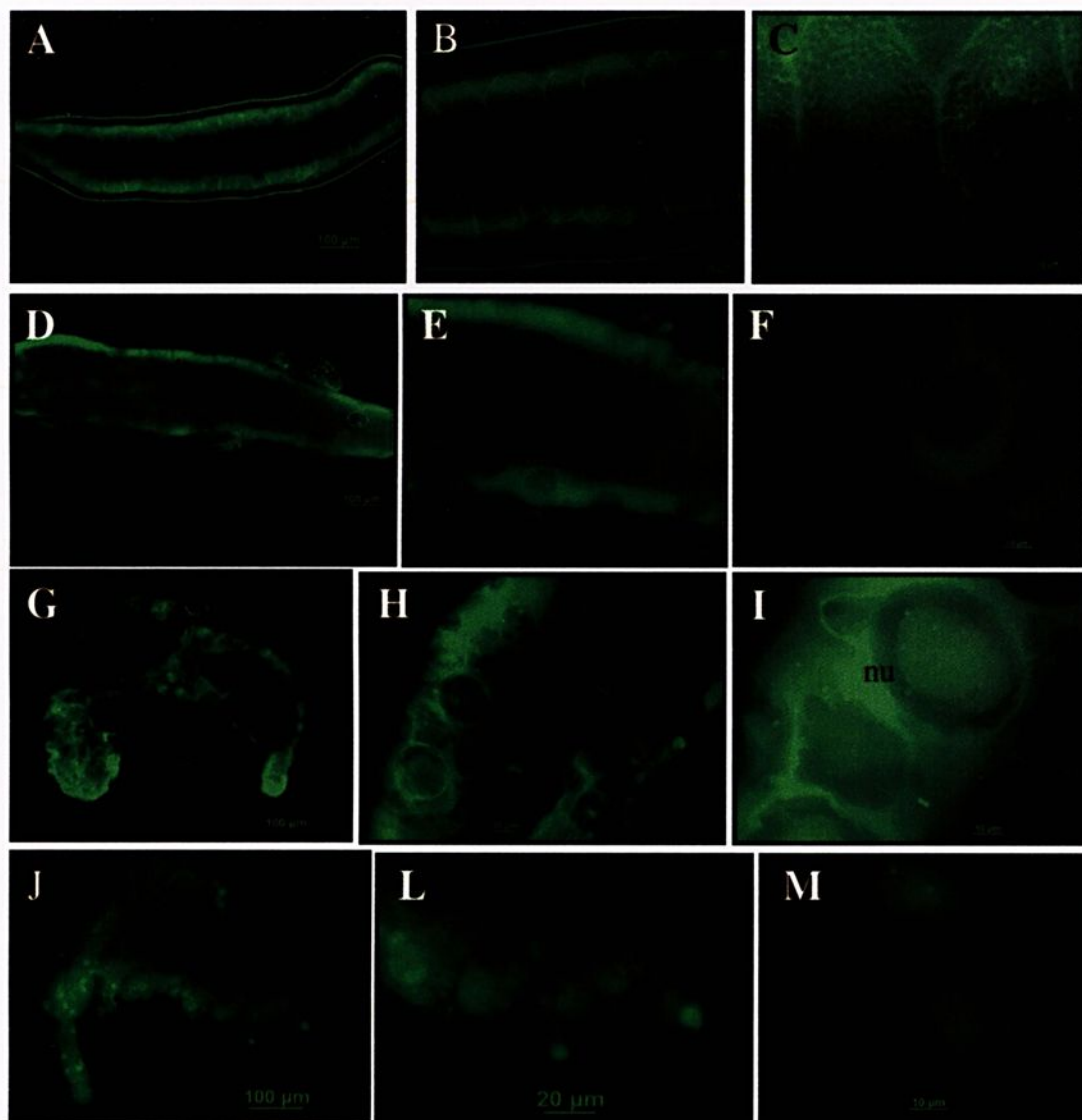


Figura 6 A-M: Glândulas salivares de *Drosophila mulleri*, coradas com alaranjado de acridina: **A-C** 3T; **D-F** P16; **G-I** P20; **J-M** P22. **nu:** núcleo.

Referências Bibliográficas

- Abrams, J.M.; White, K.; Fessler, L.I.; Steller, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, v. 117, p. 29-43.
- Aidells, B.; Lockshin, R.A.; Cullin, A. (1971). Breakdown of the silk glands of *Galleria mellonella* – acid phosphatase in involuting glands. *J. Insect Physiol.*, v. 17, p. 857-869.
- Armbruster, L.; Levy, M. Mathieu, M.N. e Bautz, M.M (1986). Acid phosphatase activity in the hemolymph, hemocytes, fat body and salivary glands during larval and prepupal development in *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae). *Comp. Biochem. Physiol.* 84b: 348-354.
- Berendes, H.D. e Ashburner, M. (1978). The salivary glands. In: Ashburner, M and Whighth, T.R.F. *The salivary glands and biology of Drosophila*. London: Academic Press, v. 2b, 453-498.
- Bowen, I.D.; Mullarkey, K. e Morgan, S.M. (1996). Programmed cell death metamorphosis in the blow-fly *Calliphora vomitoria*. *Icroscopy Research and Technique*, 34: 202-217.
- Bowen, I.D. (1993). Apoptosis or programmed cell death? *Cell Biology International*, v. 17, p. 365-380



- Bowen, I.D.; Morgan, S.M. e Mullarkey, K. (1993). Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. Cell Biology International, 17: 13-33.
- Cruz-Landim, C.C.; Reginato, R.D.; Moraes, R.L.M.S.; Cavalcante, V.M. (2002). Cell nucleus activity during post-embryonic development of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera- Apidae). Intranuclear acid phosphatase. Genetic and Molecular Research, v. 1, p. 131-138.
- Dai, J. e Gilbert, L.I. (1997). Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. Insect Biochem Molec Biol, 27: 69-78.
- Deultour, R.; Fransolet, S.; Loppes, R. (1981). Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo root cells. J Cell Sci, v. 47, p. 77-89.
- Essner, E. (1973). Phosphatases. In: Electron Microscopy of Enzymes: Principles and Methods. Edited by M.A. Hayot, v. 1, p. 44-76.
- Farkas, R. Disponível em: : <http://www.ou.edu/journals/dis/DIS84/Tec5%20Farka.html>. Acesso em dezembro de 2003.
- Gomori, G. (1950). An improved histochemical technic for acid phosphatase. Stain Tech, v. 25, p. 81-85.
- Gregorc, A. e Bowen, I.D. (1997). Programmed cell death in the honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. Cell biology International, v. 21: p. 151-158.



- Ianella, P.; Itoyama, M.M. (2004). Programmed cell death in salivary glands of *Drosophila*. Genetics and Molecular Biology.
- Jiang, C.; Baehrecke, E.H. e Thummel, C.S. (1997). Steroid regulation cell death during *Drosophila* metamorphosis. Development, 124: 4673-4683.
- Jochova, J.; Zakeri, Z.; Lockshin, R.A. (1997). Rearrangement of the tubulin and actin cytoskeleton during programmed cell death in *Drosophila* salivary glands. Cell Death and Differentiation, v. 4, p. 140-149.
- Jones, H.E. e Bowen, I.D. (1993). Acid phosphatase activity in the larval salivary glands of developing *Drosophila melanogaster*. Biology International, 17: 305-315.
- Lee, C.; Baehrecke, E.H. (2001). Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. Development, v. 128, p. 1443-1455.
- Levy, M. e Bautz, A. (1985). Degeneration of larval salivary gland during metamorphosis of the blow fly, *Calliphora erythrocephala* Meigen (Diptera: Calliphoridae). Int J Insect Morphol & Embryol, 14: 281-290.
- Lu, E.; Wolfe, J. (2001). Lysosomal enzymes in the macronucleus of *Tetrahymena* during its apoptosis-like degradation. Cell Death Differentiation, v. 8, p. 289-297.



- Moraes, R.L.M.S. e Bowen, I.D. (2000). Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Cell Biology International*, 21: 151-158.
- Oliveira, C.C. (2003). Alterações morfológicas e estruturais nas glândulas salivares de *Drosophila saltans*, relacionadas com a morte celular programada. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.
- Pasteur, N.; Kastriitis, C.D. (1971). Developmental studies in *Drosophila*. I. Acid phosphatases, esterases, and other proteins in organs and whole-fly homogenates during development of *Drosophila pseudobscura*. *Developmental Biology*, v. 25, p. 525-536.
- Schin, K.; Laufer, H. (1973). Studies of programmed salivary gland regression during larval-pupal transformation in *Chironomus thummi*. *Experimental Cell Research*, v. 82, p. 335-340.
- Van de Wall, C.; Bernier, G.; Deultour, R.; Bronchart, R. (1976). Sequence of reactivation of ribonucleic acid synthesis during early germination of the maize embryo. *Plant Physiol*, v. 157, p. 632-639.
- Walbot, V. (1971). RNA metabolism during embryo development and germination of *Phaseolus*. *Dev Biol*, v. 26, p. 369-379.



Zelenin, A. (1966). Fluorescence microscopy of lisossomes and related structures in living cells. *Nature*, v. 212, p. 425-426.



V. Discussão

Desde a descoberta da localização celular do sistema de controle da morte celular programada, a apoptose tem sido considerada um mecanismo fundamental para o desenvolvimento normal de organismos multicelulares. A apoptose desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da morte celular por meio da eliminação de células indesejadas (GREEN, DIERRE, 2000 apud FARKAS, 2003; WHITE et al., 1994), células (KUMAR, DOMANIS, 2000 apud FARKAS, 2003) e células de células (HAY et al., 1995 apud FARKAS, 2003).

A apoptose das glândulas salivares de *Drosophila* e de outros modelos de órgãos multicelulares tem sido muito discutida na literatura. O tipo de morte celular que ocorre durante a histogênese dos órgãos tem sido alvo de pesquisas de vários autores. Alguns têm atribuído esta degeneração ao processo de apoptose (FARKAS, MERKLE, 2000; JIANG et al., 1997) e outros à necrose (GIVHARA, 2003; LEE, DALDRUPKE, 2001), e outros ainda, têm alegado a ocorrência de uma combinação entre essas duas modalidades (KONIG, BOWEN, 2003). Lockshin e Zaker (1990) chegaram ao mesmo tipo de conclusão para a morte celular que ocorre no desenvolvimento do cérebro, a Morte Celular do Desenvolvimento.

Segundo estudos realizados por vários autores em outros organismos multicelulares, acredita-se que a morte celular programada (MCP) em *Drosophila* seja semelhante à apoptose observada em *Caenorhabditis elegans* (KONIG, BOWEN, 2003). Em seus estudos com *Caenorhabditis elegans*, os pesquisadores observaram que a morte celular programada em *Drosophila* apresenta características semelhantes às observadas em *Caenorhabditis elegans*, como a formação de corpos apoptóticos e a formação de corpos apoptóticos (LEE e DALDRUPKE, 2001). Segundo os autores, a MCP observada em *Drosophila* é semelhante à

Os processos de morte celular programada e sua mais freqüente forma, a apoptose, são características críticas do desenvolvimento regulado de organismos multicelulares. A espécie *Drosophila* contribuiu significativamente para o entendimento da morte celular por análises genéticas de ativadores de morte celular (GREEN; BEERE, 2000 apud FARKAS, 2003; WHITE et al., 1994), caspases (KUMAR; DOMANIS, 2000 apud FARKAS, 2003) e inibidores de caspases (HAY et al., 1995 apud FARKAS, 2003).

A histólise das glândulas salivares de *Drosophila*, e de outros tecidos de insetos holometábolos, tem sido muito discutida na literatura. O tipo de morte celular que ocorre durante a histólise deste órgão, tem sido alvo de controvérsia entre vários autores. Alguns têm atribuído esta degeneração ao mecanismo de apoptose (FARKAS; MERKLER, 2000; JIANG et al., 1997) outros à autofagia (OLIVEIRA; 2003; LEE; BAEHRECKE, 2001), e outros ainda, têm chegado à um consenso de que se trata de uma combinação entre estes dois mecanismos (JONES; BOWEN, 1993). Lockshin e Zakeri (1990) chegaram até a sugerir uma classificação diferenciada para a morte celular que ocorre no desenvolvimento de insetos, a Morte Celular do Desenvolvimento.

Em estudos realizados por vários autores em insetos holometábolos, excelentes modelos para o estudo de MCP, uma grande variedade de fenótipos de MCP foram observados. Bowen et al. (1993) em seus estudos com *Calliphora vomitoria*, não encontraram as características de apoptose clássica como contração celular e compactação da cromatina. Lee e Baehrecke (2001) arguem em seu estudo que a MCP desencadeada por esteróides ocorre via

autofagia, e que esta autofagia utiliza mecanismos reguladores comuns a apoptose. Jochová et al. (1997) estudando o rearranjo da tubulina e actina do citoesqueleto durante a MCP nas glândulas salivares de *D. mulleri*, obtiveram resultados consistentes com a hipótese de que, uma extensiva atividade autofágica ocorre durante a degradação do núcleo.

Armbruster et al. (1986) argumentam que as duas modalidades (apoptótica e autofágica) coexistem nas glândulas salivares de *Calliphora erythrocephala*. Nesta mesma espécie, Levy e Bautz (1985) chegaram à conclusão de que as glândulas salivares e epiderme sofrem degeneração por apoptose, e eventos autofágicos ocorrem somente nos estágios mais tardios.

Dai e Gilbert (1997) sugerem que a apoptose é o mecanismo básico pelo qual as glândulas protorácicas de *Manduca sexta* sofrem histólise, o que é suportado por Jiang et al. (1997), que analisaram a histólise de diversos tecidos de *Drosophila melanogaster* durante a metamorfose em resposta à atuação do hormônio ecdisona. Neste trabalho, os autores encontraram, entre outras características típicas de apoptose, a fragmentação de DNA.

No presente trabalho, observamos que tanto as glândulas de *D. arizonae* quanto as de *D. mulleri*, começam a se degenerar, aproximadamente, a partir de 22 horas após a empupação, aproximadamente, existindo uma variação individual de quando a histólise se inicia. Não observamos nenhuma variação morfológica relacionada à MCP nas fases de desenvolvimento anteriormente analisadas, provavelmente porque este, é um dos últimos órgãos a se degenerar. Segundo Jiang et al. (1997), a metamorfose pós embriônica de *Drosophila*



melanogaster, é desencadeada por hormônios esteróides. As glândulas salivares se degeneram em resposta a um segundo pulso de ecdisona liberado mais tardiamente.

A morte não ocorre em todas as células simultaneamente, mas atinge todas as células deste tecido de maneira ordenada. Desta maneira, podemos observar nas fases intermediárias da histólise (pupas de aproximadamente 22:30 horas), núcleos morfologicamente típicos, núcleos pré-apoptóticos (núcleos que já são picnóticos, mas se encontram em um estágio intermediário entre típico e apoptótico) e núcleos apoptóticos. Já em glândulas de estádios mais avançados do desenvolvimento, como por exemplo, de P23, podemos observar a maioria dos núcleos apoptóticos fragmentando-se em corpos apoptóticos e alguns poucos núcleos pré-apoptóticos. A fragmentação do núcleo apoptótico pode formar corpos apoptóticos de tamanhos variados: muito pequenos ou de tamanhos maiores.

Jiang et al. (1997) verificaram que a histólise da glândula é acompanhada por permeabilidade nuclear à acridina orange, um corante vital que proporciona uma rápida e acurada indicação de apoptose em tecidos de insetos. White et al. (1994) e Abrans et al. (1993), utilizaram este corante para identificar células apoptóticas em embriões de *Drosophila*.

Sabe-se que o alaranjado de acridina marca seletivamente núcleos apoptóticos porque estes se tornam permeáveis ao corante. O corante é capturado por compartimentos membranosos ácidos como lisossomos e fagossomos, ou compartimentos derivados de lisossomos (LU; WOLFE, 2001).



Mpoke e Wolfe (1997) usaram alaranjado de acridina para estudar a eliminação do macronúcleo em *Tetrahymena* (um protozoário ciliado). Acredita-se que a eliminação do macronúcleo de *Tetrahymena* ocorre por um mecanismo muito similar a apoptose, onde somente um núcleo da célula (o macronúcleo) morre, apresentando condensação e fragmentação do DNA por endonucleases. Tais autores descobriram que lisossomos circundam o núcleo que está morrendo, e mais importante que isso, o núcleo torna-se marcado com o alaranjado de acridina sugerindo que ele se torne um compartimento ácido. Assim, o núcleo apoptótico é considerado por tais autores um compartimento ácido que sequestra alaranjado de acridina.

No presente estudo, nas larvas de terceiro estágio tardio, não foi possível observar núcleos negativamente marcados, e uma fraca marcação positiva foi observada na região da membrana plasmática das células. Nesta fase o citoplasma das células de toda a glândula encontrava-se repleto de grânulos de secreção. Tais grânulos, descritos por Ross (1939 apud BERENDES, 1978), são fortemente marcados quando corados com o ácido periódico de Schiff (são PAS-positivos). No final do terceiro estágio tardio, pouco antes da empupação, este material PAS-positivo é liberado das células para o lúmen da glândula (BERENDES; ASHBURNER, 1978). Provavelmente, a presença destes grânulos por todo o citoplasma glandular, impede a visualização do núcleo nesta fase do desenvolvimento, mesmo como uma estrutura negativamente marcada (não permeável ao corante).

Observamos que nas fases de pré-pupa a pupa de 16 horas, os núcleos não estão positivamente marcados pelo alaranjado de acridina, indicando que não há nenhuma alteração do pH nuclear, que permanece fracamente básico.

Durante a fase de pupa de 20 horas (P20), nenhuma célula apresenta sinal morfológico de apoptose e todos os núcleos apresentam características típicas deste tecido, como cromatina descompactada. No entanto, glândulas P20 submetidas ao alaranjado de acridina, mostram núcleos de algumas células marcados positivamente (permeáveis à acridina). Isto indica que estes núcleos já estão se tornando permeáveis ao corante e, conseqüentemente, com pH diminuído. De modo geral, podemos inferir que nas glândulas salivares de *Drosophila arizonae* e *D. mulleri*, o sinal bioquímico de apoptose, acidificação do núcleo, inicia-se perto de 20 horas após a empupação.

Na fase de pupa de 22 horas, como era esperado, os núcleos apoptóticos e pré-apoptóticos estavam marcados positivamente pelo alaranjado de acridina, evidenciando que durante a MCP da glândula de *Drosophila*, os núcleos das células tornam-se permeáveis à acridina, provavelmente, por se tornarem compartimentos ácidos, ou seja, o pH nuclear diminui.

Lu e Wolfe (2001) ao investigar a degeneração do macronúcleo de *Tetrahymena*, questionaram se corpos lisossomais fundem-se ao núcleo para formar um autofagossomo. Eles monitoraram a atividade fosfatásica ácida, que está relacionada com corpos lisossomais e observaram que os lisossomos fundem-se e formam um anel ao redor do núcleo. Mais tardiamente, alguns depósitos são observados no interior do núcleo. Lu e Wolfe (2001) concluíram que a eliminação

do macronúcleo é iniciada por eventos apoptóticos (condensação do núcleo e fragmentação do DNA por ativação de endonuclease) e posteriormente a degradação prossegue por meio de autofagocitose.

Vários autores têm relacionado lisossomos e a atividade fosfatásica ácida à eminência de MCP. Em biologia do desenvolvimento, a fosfatase ácida é freqüentemente relacionada ao aumento da freqüência lisossômica, e subseqüente processos degenerativos (LOCKSHIN, 1981 apud JONES; BOWEN, 1993). A atividade fosfatásica ácida livre e lisossomal têm sido determinada histoquimicamente em hemócitos e glândulas salivares (ARMBRUSTER et al., 1986), em corpos gordurosos (DE PRIESTER et al., 1979), nas glândulas salivares (BOWEN et al., 1996) durante a metamorfose de *Calliphora vomitoria*. Dados similares foram obtidos no intestino médio de *Drosophila auraria* (DIMIATRIDIS; KASTRITSIS, 1985).

Barry e Eastman (1993 apud MPOKE; WOLFE, 1997) propuseram a existência de uma endonuclease acídica em células ovarianas de hamster chinês, que clivam o DNA de sítios internucleossomais produzindo o padrão apoptótico característico. Tal enzima não é ativada por cátions bivalentes e não é inibida por Zn^{+2} como as endonucleases já descritas. Em alguns outros organismos têm sido identificadas enzimas com tais características e que requerem um ambiente ácido para sua atividade ótima (MPOKE; WOLFE, 1997).

De acordo com estas informações, os lisossomos podem atuar de duas maneiras importantes na MCP. Primeiro, por fusionar com o núcleo alvo,



liberar seu conteúdo, que pode incluir uma endonuclease ácida que dentro do núcleo vai iniciar sua degradação do DNA. Alternativamente, o papel primário do lisossomo pode ser o de baixar o pH do núcleo, facilitando a ativação da endonuclease residente latente, que então digere o DNA nuclear. Finalmente, após providenciar condições ácidas, os lisossomos podem ter um papel na degradação dos componentes proteínicos do núcleo condensado (MPOKE; WOLFE, 1997).

No presente estudo, observamos atividade fosfatásica ácida presente em todos os estádios do desenvolvimento analisados, em ambas as espécies. Não houve diferenças no comportamento enzimático da fosfatase ácida que pudessem diferenciar uma espécie da outra (*D. mulleri* e *D. arizonae*). A atividade desta enzima foi citoplasmática, nuclear e nucleolar. A atividade citoplasmática aumentou gradativamente durante o desenvolvimento.

Cruz-Landim et al. (2002) arguem que a heterogeneidade de intensidade e distribuição dos depósitos da atividade fosfatásica ácida pode ser interpretada como uma variação no estado funcional nuclear, relacionada com as funções celulares deste tecido. Assim, podemos inferir que, esta marcação diferenciada, deve-se à transcrição diferencial de genes nas fases citadas. Assim, a fase de terceiro estágio tardio teria uma maior transcrição de genes. Da mesma forma, podemos inferir que existe uma maior transcrição de RNA ribossomal nestas fases, comprovado pelos nucléolos mais corados. Bowen et al. (1993) observaram depósitos no nucléolo durante a fase pré-pupal em *C. vomitoria*, e concluíram que trata-se de produção de RNAr para a síntese de proteínas relacionadas à MCP.



Durante as fases desenvolvimentais P22, P22:30 e P23 de *D. arizonae*, quando as glândulas salivares encontram-se em processo de histólise, existe uma intensa atividade desta enzima. O citoplasma das células glandulares encontra-se fortemente marcado. O mesmo foi observado na espécie *D. mulleri*.

Em *D. arizonae*, os núcleos de praticamente todas as células, mostram-se integralmente marcados (Figura 2F) ou com alguns depósitos granulares dentro do núcleo (Figura 2I). Os corpos apoptóticos, da mesma forma, são intensamente marcados com a reação de fosfatase ácida (Figuras 2J e M). As células de *D. mulleri* exibem o mesmo padrão.

Tais resultados são concordantes com os obtidos com a coloração de alaranjado de acridina, ou seja, o núcleo, durante a histólise da glândula, é um compartimento ácido. Não foi possível com o uso da microscopia de luz, monitorar o comportamento dos lisossomos, não ficando claro se, neste caso, a acidificação do núcleo é dada pela sua fusão com lisossomos, como foi observado por Lu e Wolfe (2001).

Muitos autores têm detectado atividade fosfatásica ácida extralisossomal (ARMBRUSTER et al., 1986; LEVY; BAUTZ, 1985). A própria presença desta enzima nos núcleos em fases anteriores à histólise da glândula salivar é um exemplo de atividade extralisossomal, e deixa dúvidas sobre a função das fosfatases. Tal grupo enzimático não pode ser considerado um marcador de morte celular eminente, uma vez que sua presença no núcleo pode estar relacionado à transcrição.

Esta ambigüidade pode ser explicada por experimentos de Pasteur e Kastritsis (1971). Eles detectaram bioquimicamente, por eletroforese, a presença de fosfatase ácida em extratos totais e de glândulas salivares em todos os estágios do desenvolvimento analisados. Comparações do extrato total com o glandular revelaram duas bandas coincidentes. Estas duas bandas também apresentam um padrão de evolução similar nos dois extratos. Uma delas desaparece até 12 horas após a eversão do espiráculo (empupação), a outra parece aumentar em intensidade após este período, levando à conclusão de que esta última está relacionada aos eventos de morte celular.

Assim, as enzimas encontradas no citoplasma e núcleo celular em fases precedentes a histólise, devem ter funções diferentes das encontradas durante a histólise.



V. Conclusões

De maneira geral, os resultados obtidos no presente trabalho, nos permitem concluir que:

1) a Morte Celular Programada não ocorre em todas as células simultaneamente, sendo aparentemente aleatória quanto ao posicionamento das células na glândula.

2) tempo de degeneração total da glândula de *Drosophila mulleri* e *D. arizonae* pode variar de 22 horas a 23 horas.

3) o processo total dura em torno de uma a uma hora e meia.

4) o tipo de morte celular programada que ocorre nas glândulas de *Drosophila arizonae* e *D. mulleri* é morfologicamente característico de apoptose.

5) mudanças bioquímicas relacionadas à morte celular, como por exemplo a acidificação nuclear, iniciam-se neste órgão aproximadamente 20 horas após a empupação.

6) durante a histólise existe atuação de fosfatases ácidas, o que reforça a hipótese de que o núcleo se comporta como um compartimento ácido durante o evento de morte celular.

7) aparentemente, a morte celular é apoptótica, mas alguns eventos autofágicos parecem ocorrer durante as fases finais deste processo, com a atuação de fosfatases ácidas.

Tais resultados abrem novas questões sobre o assunto, por exemplo, como as fosfatases atuam na histólise, se existem fosfatases ácidas específicas que atuam durante a degradação, se ocorre a ativação de



endonucleases neste tecido e se a acidificação do núcleo é dada realmente pela fusão com corpos lisossomais, entre muitas outras.



ABRAMS, J.M. et al. Programmed
Development. v. 117, p. 29-43, 1990.

VI. Referências Bibliográficas

ADAMS, J.M., CORY, S. The p53-2 protein family: a key to cell survival.
Science, v. 281, n. 5351, p.1423-1426, 1998.

ANDREW, D.J., HENDERSON, K.B., ELISH-JAH, P. Salivary gland
development in *Protophila* as a model. Mechanisms of development. v. 92,
p. 117-2000.

ARMISTEER, L. et al. Acid phosphatase activity in the hemolymph,
hemolymph, fat body and midgut glands during larval and pupal development
in *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae). Comp. Biochem.
Physiol., v. 84B, n. 3, p. 349-354, 1985.

AZEVEDO-OLIVEIRA, M.T.V., MELLO, M.L.S. Ultrastructural aspects of
acid phosphatase activity in Malpighian tubules in *Triatoma infestans* Klug.
Cytologia, v. 59, p. 33-42, 1994.

AZEVEDO-OLIVEIRA, M.T.V., MELLO, M.L.S. Acid phosphatase activity in
malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. Cytologia, v. 59, p. 33-42, 1994.

BARRA, T., ANDERSON, P.J. Histochemical methods for acid phosphatase
using hexazonium pararosaniline as coupler. J. Histochem. Cytochem., v. 10, p. 741-
751, 1962.

BERENDES, H.J., ASHBIJCHNER, M. The salivary glands of *Aedes aegypti*. M.
Wright, L.R.F. The genetics and biology of *Drosophila*. 1981. London: Academic
Press, v. 2b, p. 453-499, 1978.

BOWEN, I.D., MORGAN, S.M., MULLARKY, K. Cell death in the salivary
glands of metamorphosing *Calliphora vicina*. Microscopy Research and
Techniques, v. 34, p. 202-217, 1996.

BOWEN, I.D. Apoptosis or pre-programmed cell death? Cell Biology International
Reviews, v. 17, p. 365-380, 1993.

ABRANS, J.M. et al. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. **Development**, v. 117, p. 29-43, 1993.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, n. 5381, p.1322-1326, 1998.

ANDREW, D.J., HENDERSON, K.D.; SESHIAIAH, P. Salivary gland development in *Drosophila melanogaster*. **Mechanisms of Development**, v. 92, p. 5-17, 2000.

ARMBRUSTER, L. et al. Acid phosphatase activity in the hemolymph, hemocytes, fat body and salivary glands during larval and prepupal development in *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 84B, n. 3, p. 349-354, 1986.

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MELLO, M.L.S. Ultrastructural aspects of acid phosphatase activity in Malpighian tubules in *Triatoma infestans* Klug. **Cytobios**, v. 93, p. 33-42, 1998.

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MELLO, M.L.S. Acid phosphatase activity in malpighian tubules of *Triatoma infestan* Klug. **Cytobios**, v. 92, p. 23-28, 1997.

BARKA, T.; ANDERSON, P.J. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. **J. Histochem. Cytochem.**, v 10, p. 741-753, 1962.

BERENDES, H.A.; ASHBURNER, M. The salivary glands **In:** Ashburner, M.; Whight, T.R.F. The genetics and biology of *Drosophila*. 1ed. London: Academic Press, v. 2b, p. 453-498, 1978.

BOWEN, I.D.; MORGAN, S.M.; MULLARKEY, K. Cell death in the salivary glands of metamorphosis *Calliphora vomitoria*. **Microscopy Reserch and Technique**, v. 34, p. 202-217, 1996.

BOWEN, I.D. Apoptosis or programmed cell death? **Cell Biology International**, v. 17, p. 365-380, 1993.



BOWEN, I.D.; LOCKSHIN, R.A. **Cell Death in Biology and Pathology**. London and New York: Chapman & Hall, p. 1-493, 1981.

BRADLEY, P.L.; HABERMAN, A.S.; ANDREW, D.J. Organ formation in *Drosophila*: specification and morphogenesis of the salivary gland. **Bioessays**, v. 23, n. 10, p. 901-909, 2001.

CHINNAIYAN, A.M. et al. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. **Nature**, v. 388, p. 728-729, 1997.

CRUZ-LANDIM, C.C. et al. Cell nucleus activity during post-embryonic development of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera- Apidae). Intranuclear acid phosphatase. **Genetic and Molecular Research**, v. 1, p. 131-138, 2002.

DAI, J.; GILBERT, L.I. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 27, n. 1, p. 69-78, 1997.

DE PRIESTER, W.; VAN OELT-VERKUIL, E.; DE LEEUW, P.H. Demonstration of acid phosphatase activity induced by 20-hydroxyecdysone in the fat body of *Calliphora*. **Cell Tissue Res.**, v. 200, p. 435-442, 1979.

DEULTOUR, R.; FRANSOLET, S.; LOPPES, R. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo root cells. **J. Cell Sci.**, v. 47, p. 77-89, 1981.

DIMIATRIDIS, V.K.; KASTRITSIS, C.D. Ultrastructural analysis of the midgut of *Drosophila auraria* larvae-distribution of alkaline phosphatase, acid phosphatase, leucine aminopeptidase, and glycogen. **Cytologia**, v. 50, p. 689-700, 1985.

FARBER, J.L. The biochemical pathology of toxic cell death. **Monogr. Pathol.**, v. 26, p. 19-31, 1985

FARKAS, R. Disponível em: <http://www.ou.edu/journals/dis/DIS84/Tec5%20Farka.html>. Acesso em dezembro de 2003.



FARKAS, R.; MECHLER, B.M. The timing of *Drosophila* salivary gland apoptosis displays an L(2)gl-dose response. **Cell Death Differ**, v. 7, n. 1, p. 89-101, 2000.

FLYMOVE. Disponível em: <http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclepage.html?http&&flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCycleTxt.html>. Acesso em 17 de novembro de 2003.

GRAVIELE, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of Cell Biology**, v. 119, p. 493-500, 1992.

GREGORC, A.; BOWEN, I.D. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of american foulbrood disease. **Cell Biology International**, v. 22, n. 2, p. 1998.

HALICKA, H. D.; BEDNER, E.; DARZYNKIEWICZ, Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 260, p. 248-256, 2000.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HENGARTNER, M.O. Death by crowd control. **Science**, v. 281, p. 1298-1299, August, 1998.

JIANG, C. et al. A Steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. **Molecular Cell**, v. 5, p. 445-455, 2000.

JIANG, C.; BAEHRECKE, E.H.; THUMMEL, C.S. Steroid regulated cell death during *Drosophila* metamorphosis. **Development**, v. 124, p. 4673-4683, 1997.

JOCHOVÁ, J.; ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R.A. Rearrangement of the tubulin and actin cytoskeleton during programmed cell death in *Drosophila* salivary glands. **Cell Death and Differentiation**, v. 4, p. 140-149, 1997.

JONES, H.E.; BOWEN, I.D. Acid phosphatase activity in the larval salivary glands of developing *Drosophila melanogaster*. **Cell Biology International**, v. 17, n. 3, p. 305-315, 1993.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

LEE, C.; BAEHRECKE, E.H. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. **Development**, v. 128, p. 1443-1455, 2001.

LEVY, M.; BAUTZ, A.M. Degeneration of larval salivary glands during metamorphosis of the blow fly, *Calliphora erythrocephala* Meigen (Diptera: Calliphoridae). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.**, v. 14, n. 5, p. 281-290, 1985.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z.F. Programmed cell death: new thoughts and relevance to ageing. **J. Gerontol. Biol. Sc.**, v. 45, p. 135-140, 1990.

LU, E.; WOLFE, J. Lysosomal enzymes in the macronucleus of *Tetrahymena* during its apoptosis-like degradation. **Cell Death Differentiation**, v. 8, p. 289-297, 2001.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, p. 796-800, 2000.

MEIER, P.; EVAN, G. Dying like flies. **Cell**, v. 95 p. 295-298, 1998.

MITCHELL, H.K.; TRACY, U.W.; LIPPS, L.S. The prepupal salivary gland of *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genetic.**, v. 15, p. 563-573, 1977.



MPOKE, S.S.; WOLFE, J. Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: application to macronuclear elimination in *Tetrahymena*. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 45, p. 675-683, 1997.

MORAES, R.L.M.S.; BOWEN, I.D. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L). **Cell Biology International**, v. 25, n. 10, p. 737-743, 2000.

OBERHAMMER, F. et al. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. **Journal of Cell Science**, v. 104, p. 317-326, 1993.

OLIVEIRA, C.C. **Alterações morfológicas e estruturais nas glândulas salivares de *Drosophila saltans*, relacionadas com a morte celular programada.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

PASTEUR, N.; KASTRITSIS, C.D. Developmental studies in *Drosophila*. I. Acid phosphatases, esterases, and other proteins in organs and whole-fly homogenates during development of *Drosophila pseudobscura*. **Developmental Biology**, v. 25, p. 525-536, 1971.

ROBERTSON, C.W. The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. **J. Morphol.**, v. 59, p. 361-399, 1936.

SAUNDERS, J.D. Death in embionic systems. **Science**, v.154, p. 604-611, 1966.

SCHIN, K.; LAUFER, H. Studies of programmed salivary gland regression during larval-pupal transformation in *Chironomus thummi*. **Experimental Cell Research**, v. 82, p. 335-340, 1973.

SCHWARTZ, L.M. The role of cell death genes during development. **Bioessays**, v. 13, n. 8, p. 389-395, 1990.



SMITH, A.V.; ORR-WEAVER, T.L. The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis: the transition to polyteny. **Development**, v. 112, p. 997-1008, 1991.

THOMPOULOS, G.N. et al. Structural and histochemical studies of Golgi complex differentiation in salivary gland cells during *Drosophila* development. **Journal of Cell Science**, v. 102, p. 169-184, 1992.

VAN DE WALL, C. et al. Sequence of reactivation of ribonucleic acid synthesis during early germination of the maize embryo. **Plant Physiol.**, v. 157, p. 632-639, 1976.

VON GAUDECKER, B.; SCHMALE, E.M. Substrate-histochemical investigation and ultrahistochemical demonstrations of acid phosphatase in larval and prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Cell Tiss. Res.**, v. 155, p. 75-89, 1974.

WALBOT, V. RNA metabolism during embryo development and germination of *Phaseolus*. **Dev. Biol.**, v. 26, p. 369-379, 1971.

WASHITANI, J.; SATO, S. On the reliability of the lead salt precipitation method of acid phosphatase localization in plant cells. **Protoplasma**, v. 89, p. 157-170, 1976.

WHITE, K. et al. Role of CED-4 in the activation of CED-3. **Science**, v. 264, p. 677-683, 1994.

WYLLIE, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associate with endogeneous endonuclease activation. **Nature**, v. 284, p. 555-556, 1980.

ZELENIN, A. Fluorescence microscopy of lisossomes and related structures in living cells. **Nature**, v. 212, p. 425-426, 1966.



Fonte consultada

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, Agosto de 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520:** informação e documentação: citações em documentações: apresentação. Rio de Janeiro, Agosto de 2002



processo essencial para o desenvolvimento de organismos multicelulares e envolve processos de comunicação celular e sinalização. A morte celular é um processo biológico que ocorre em células e tecidos e é essencial para o desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares. Tal processo tem sido muito estudado quanto à sua natureza e função, sendo considerado um dos principais mecanismos de controle da vida celular. Este estudo teve como objetivo analisar o tipo de MCP que ocorre nas glândulas salivares de *Drosophila melanogaster* e *D. dentissima*, e, em que momento do desenvolvimento larval pupal ocorrem os eventos de MCP e também, estudar o papel das fosfatases ácidas durante o desenvolvimento larval-pupal, principalmente durante a morte celular. Dos resultados obtidos, podemos concluir, de maneira geral, que neste tecido a MCP ocorre por apoptose, no entanto, alguns eventos de autofagia, com papel secundário, podem ocorrer no final da histólise e início da regeneração da glândula, iniciando-se por volta de 22 a 23 horas após a eclosão, e pode durar até 48 horas. A morte celular ocorre em uma fase que ocorre a degeneração completa da glândula e a apoptose não ocorre simultaneamente em todas as células, sendo aparentemente aleatória quanto a região da glândula em que se inicia, mas é observada nas células da borda da glândula a partir de 20 horas após a eclosão. O núcleo celular começa a tornar-se ácido em áreas onde ocorre a apoptose, relacionando-se à morte celular, e a atividade de fosfatases ácidas durante todo o processo estudado, sendo que durante a histólise o núcleo está fortemente marcado, reforçando a hipótese de que a morte celular se torna um compartimento ácido durante este período.

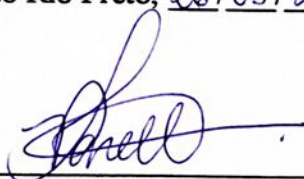
A Morte Celular Programada (MCP) é um evento típico da metamorfose pós-embriônica de insetos holometábolos, e envolve processos de reconstrução radical dos planos corporais, onde tecidos larvais são substituídos por tecidos adultos. Tal evento tem sido muito questionado quanto à sua natureza. Nosso estudo teve como objetivo analisar o tipo de MCP que ocorre nas glândulas salivares de *Drosophila arizonae* e *D. mulleri*, e, em que momento do desenvolvimento larval pupal ocorrem os eventos de MCP, e também, esclarecer o papel das fosfatases ácidas durante o desenvolvimento larval-pupal, principalmente durante a morte celular. Dos resultados obtidos, podemos concluir, de maneira geral, que: neste tecido a MCP ocorre por apoptose, no entanto, alguns eventos de autofagia, com papel secundário, podem ocorrer no final da histólise; o início da degeneração da glândula inicia-se por volta de 22 a 23 horas após a empupação, e pode durar em média de uma a uma hora e meia para que ocorra a degeneração completa da glândula; a apoptose não ocorre simultaneamente em todas as células, sendo aparentemente aleatória quanto à região da glândula em que se inicia, mas é sincrônica nas células deste tecido; a partir de 20 horas após a empupação, o núcleo celular começa a tornar-se ácido, um sinal bioquímico relacionado à morte celular; existe atuação de fosfatases ácidas durante todas as fases estudadas, sendo que durante a histólise, o núcleo está fortemente marcado, reforçando a hipótese de que o núcleo se torna um compartimento ácido durante este período.

Abstract

The Programmed Cell Death (PCD) is a typical event of the metamorphosis post-embryonic of holometabolic insects, and involves processes of radical reconstruction of the body planes, where larval tissues are replaced by adult tissues. Such event has been very questioned in relation to its the nature. Our study had by objective to analyze the kind of PCD that occurs in the salivary glands of *Drosophila arizonae* and *D. mulleri*, and where moment of the larval-pupal development occurs the PCD events, and to clarify the acid phosphatase function during the larval-pupal development, mainly during the cell death. By the results obtained we can conclude, in general way, that: in this tissue the MCP occurs by apoptosis, however, some autophagic events, with a secondary paper, can occurs in the end of the histolysis; the glands starts to degenerate in 22 to 23 hours after the empupation, and the total degeneration occurs during one to one hour and half; apoptosis does not occurs simultaneously in all the cells, being apparently random in relation to region of the gland where if it initiates, but is synchronically in the cells of this tissue; 20 hours after the empupação, the cellular nucleus becomes acidic, a biochemistry signal related to the cell death; there is acid phosphatase actuation during all the studied phases, being that during histólise, the nucleus is strongly marked, strengthening the hypothesis of that the nucleus becomes a acid compartment during this period.



Autorizo a reprodução deste trabalho.
São José do Rio Preto, 26/03/2004.



Patrícia Ianella

