CÁSSIA CARDOSO DE OLIVEIRA

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *Drosophila saltans*, RELACIONADAS COM A MORTE CELULAR PROGRAMADA.

unesp

1910001154

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Pós-Graduação em Genética

CÁSSIA CARDOSO DE OLIVEIRA

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *Drosophila saltans*, RELACIONADAS COM A MORTE CELULAR PROGRAMADA.

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Genética.

São José do Rio Preto - SP

2003

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Pós-Graduação em Genética

CÁSSIA CARDOSO DE OLIVEIRA

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *Drosophila saltans*, RELACIONADAS COM A MORTE CELULAR PROGRAMADA.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
T. J. 154/03

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

São José do Rio Preto - SP
2003

†575
D48a

20204000

Oliveira, Cássia Cardoso de.
Alterações morfológicas e estruturais nas glândulas salivares de *Drosophila saltans,* relacionadas com a morte celular programada / Cássia Cardoso de Oliveira – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003
140 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Hermione Elly Melara de Campos Bicudo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citogenética. 2. Glândulas salivares. 3. Drosofila *saltans*. 4. Morte celular programada. 5. Cromossomos gigantes. 6. Nucléolo. I. Bicudo, Hermione Elly Melara de Campos. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575

CÁSSIA CARDOSO DE OLIVEIRA

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *Drosophila saltans*, RELACIONADAS COM A MORTE CELULAR PROGRAMADA.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora: .....

2º Examinador: .....

3º Examinador: .....

São José do Rio Preto - SP

___/___/_____

unesp

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), sob a orientação da Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, com auxílio-bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Aos meus pais, Manoel e Delvair, e à minha irmã, Luana, por todo amor e incentivo dedicados à minha formação.

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, por ter despertado em mim o amor pela ciência.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, gostaria de agradecer às pessoas que contribuíram de diferentes formas para a sua realização:

à querida Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, minha orientadora desde a Iniciação Científica, por sua brilhante orientação, confiança, incentivo e apoio durante esses anos que tive o privilégio de trabalhar sob sua orientação,

à Profa. Dra. Maria Tercília V. de A. Oliveira, pelo incentivo, interesse e por aceitar ser membro da banca examinadora,

à Profa. Dra. Lurdes F. de Almeida Toledo, pela disponibilidade em ser membro da banca examinadora,

à Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, pela amizade e incentivo, ajudando-me sempre que precisei,

às Profas. Dras. Marlene K. H. Kobayashi e Lilian Madi-Ravazzi, pela convivência agradável e atenção dispensadas desde a minha graduação,

às Profas. Dras. Cláudia M. Ap. Carareto e Ana Elizabete Silva, responsáveis pela Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética, no período de realização deste trabalho, pela competência, atenção e orientação na parte burocrática,

à Profa. Dra. Nívea D. T. Conforti Froes, pela gentileza em permitir a utilização do microscópio de fluorescência,

ao Prof. Dr. José Osmar Gaspar que possibilitou a realização da parte do trabalho que utilizou a microscopia eletrônica,

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa oferecida, o que permitiu minha dedicação integral ao mestrado,

ao Depto. de Biologia e à direção do IBILCE/UNESP, pela disposição das condições materiais necessárias,

à Sra. Simone Carvalho, funcionária do Depto. de Biologia e à Sra. Rosana M. G. Ferro e ao Sr. Oscar J. Marques, funcionários da Seção de Pós-

Graduação, pelo atendimento atencioso e eficiente,

aos Srs. Paulo Antônio Maziero e Sebastião Dias Barbosa, por prepararem o meio de cultura,

aos funcionários da Biblioteca, especialmente a Sra. Elza M. Sato, pela eficiência e seriedade com que desempenha seu trabalho,

às "meninas" do Laboratório de Vetores, Adriana, Alessandra Augusta, Alessandra Laranja, Marluci, Rita e Ana Paula, pela agradável convivência e companheirismo compartilhados diariamente,

à Luciana, Ana Cláudia, Andréia e Priscila, do Laboratório de Fitovirologia, por me ensinarem a técnica de preparação do material para microscopia eletrônica,

ao Marcio V. B. Dias, pela sua colaboração no presente trabalho,

ao Luís Gustavo, Flávia, Karina e Gisele, pela nossa amizade desde a graduação, e pelos momentos que compartilhamos juntos durante todos esses anos de convivência,

à Cláudia Pacheco e aos demais colegas do curso de Pós-Graduação, por compartilharem os mesmos ideais,

à Vérica, pela nossa amizade sincera, respeito e compreensão,

às minhas amigas de Santa Adélia, Daniela, Pauliane, Graziela, Roberta, Patrícia e Evandra, pela nossa amizade que começou na infância, mas que se estende até os dias de hoje, apesar da distância que nos separa,

a todos os meus familiares, em especial aos meus avós Oeder, Clenilce e Laudelina (*in memoriam*), que mesmo sem entenderem o meu trabalho, sempre me incentivaram e oraram por mim,

aos meus pais, Manoel e Delvair, pelo amor e respeito que nos une,

à minha irmã, Luana, que com seu caráter e constante esforço sempre me motiva a fazer o melhor também,

a Deus, por tudo e por mais esta oportunidade,

Muito Obrigada.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

"A vida, em todas as manifestações, é uma sucessão de testes e exames a que são submetidos os aprendizes da evolução".

Joanna de Ângelis.

"Nascer, morrer, renascer, progredir sempre, tal é a lei".

Allan Kardec.

unesp

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO 01

I.1. GLÂNDULAS SALIVARES DE *DROSOPHILA* 01

I.2. CROMOSSOMOS POLITÊNICOS 05

I.3. PUFES 07

I.4. NUCLÉOLO 10

I.5. MORTE CELULAR PROGRAMADA (MCP) 14

II. OBJETIVOS 21

III. MATERIAL E MÉTODOS 22

III.1. ORGANISMO UTILIZADO E PROCEDÊNCIA 22

III.2. MANUTENÇÃO DAS MOSCAS NO LABORATÓRIO 22

III.3. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DESENVOLVIMENTO 22

III.4. PREPARO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA 26

III.4.1. PREPARAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE LUZ 26

III.4.1.1. Coloração com orceína lacto-acética 27

III.4.1.2. Impregnação pelo nitrato de prata 28

III.4.1.3. Coloração pela Técnica de Feulgen 29

III.4.1.4. Coloração pela Técnica de Bandamento C 30

III.4.1.5. Coloração com alaranjado de acridina (acridine orange) ... 32

III.4.1.6. Análise dos pufes 33

III.4.1.7. Preparações para morfometria das glândulas salivares 00

III.4.2. PREPARAÇÕES PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO 34

III.5. ILUSTRAÇÃO FOTOGRÁFICA 36

IV. RESULTADOS 37

IV.1. ANÁLISE DE ESTRUTURAS CELULARES, NO DESENVOLVIMENTO, EM MICROSCOPIA DE LUZ 37

unesp

IV.1.1. CROMOSSOMOS 37
IV.1.1.1. Características estruturais dos cromossomos em larvas de terceiro estádio tardio 37
IV.1.1.2. Características estruturais dos cromossomos em pupas 38
IV.1.1.3. Padrão de pufes 43
IV.1.1.3.1. Pufes nos cromossomos politênicos de larvas de terceiro estádio tardio 43
IV.1.1.3.2. Pufes nos cromossomos politênicos de pré-pupas 43
IV.1.2. NUCLÉOLO 54
IV.1.2.1. Características do nucléolo em larvas de terceiro estádio tardio 54
IV.1.2.2. Alterações do nucléolo em pupas jovens e pupas médias .. 59
IV.1.3. CROMOCENTRO 65
IV.1.3.1. Características do cromocentro em larvas de terceiro estádio tardio 65
IV.1.3.2. Características do cromocentro em pupas jovens e pupas médias 68
IV.1.4. CITOPLASMA 68
IV.1.4.1. Aspectos do citoplasma das glândulas salivares, no desenvolvimento 68
IV.2. ANÁLISE DE ESTRUTURAS CELULARES, NO DESENVOLVIMENTO, EM MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA 75
IV.2.1. CARACTERÍSTICAS DE ESTRUTURAS CELULARES EM LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO 75
IV.2.2. CARACTERÍSTICAS DE ESTRUTURAS CELULARES EM PUPAS MÉDIAS 81
IV.3. ANÁLISE DAS ESTRUTURAS CELULARES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) 93
IV.3.1. CARACTERÍSTICAS DE ESTRUTURAS CELULARES EM LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO 93

IV.3.2. CARACTERÍSTICAS DE ESTRUTURAS EM PUPAS MÉDIAS 93
IV.4. FREQÜÊNCIA DE OBTENÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES NAS DISSECÇÕES PARA PREPARO DAS LÂMINAS 99
IV.5. MORFOMETRIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES 99

V. DISCUSSÃO 106

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 122

VII. RESUMO 137

VIII. ABSTRACT 139

I. INTRODUÇÃO

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Sendo um inseto holometábolo, a *Drosophila*, no seu desenvolvimento, passa pelas fases de ovo, larva (subdividida em três subfases), pupa e adulto. Sua metamorfose é caracterizada por diversos fenômenos ligados ao desenvolvimento, incluindo a proliferação celular, a remodelação tecidual, a migração celular e a morte celular programada. Entre as estruturas que participam de todos esses fenômenos e desempenham importantes funções nesse organismo estão as glândulas salivares, objeto do presente estudo.

I.1. GLÂNDULAS SALIVARES DE *DROSOPHILA*

As glândulas salivares de *Drosophila* são constituídas por dois tipos celulares principais: células secretoras e células do ducto. As células secretoras são células epiteliais colunares que sintetizam e secretam altos níveis de proteína. As células do ducto são células epiteliais cuboidais que formam tubos simples, conectando os dois lóbulos glandulares. Segundo revisão de Andrew *et al.* (2000) em *Drosophila melanogaster*, as glândulas salivares surgem de duas placas ectodérmicas ventrais, de aproximadamente 100 células cada, localizadas na região posterior da cabeça. Durante os estágios mais precoces de formação das glândulas salivares, as células secretoras, além da mudança da forma, de cuboidais para colunares, sofrem constrições apicais, e iniciam o processo de invaginação. Depois do começo da invaginação, as glândulas salivares desenvolvem-se sem divisões celulares posteriores. Consequentemente, o número de células glandulares é fixado durante o desenvolvimento embrionário. As glândulas salivares, ao longo do desenvolvimento, aumentam em tamanho pelo aumento do volume de células individuais, sendo os maiores órgãos secretores encontrados no

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

embrião e na larva de *Drosophila*.

Concomitante aos movimentos celulares necessários para a formação das glândulas salivares embrionárias, as futuras células secretoras sofrem mudanças fisiológicas requeridas para atingir altos níveis de secreção. Antes da invaginação, genes que codificam componentes da via secretora começam a ser transcritos em níveis muito mais altos nos primórdios das glândulas salivares secretoras, do que em outros tecidos embrionários. Também durante a invaginação, as células secretoras iniciam o processo de replicação do DNA, originando os cromossomos politênicos gigantes, necessários para atender os requerimentos metabólicos dessas células (Andrew *et al.*, 2000).

De acordo com revisão de Berendes & Ashburner (1978), em larvas de primeiro estádio de *D. melanogaster*, quando as glândulas salivares aumentam em tamanho pelo aumento do volume celular, acompanhado por um aumento no diâmetro nuclear e no nível de politenia dos cromossomos, alguns vacúolos pequenos podem ser vistos no citoplasma de algumas das células. Durante o segundo estádio, as glândulas continuam a crescer, de modo que seus lóbulos se estendem até o primeiro segmento abdominal. Nessa fase, o número de vacúolos no citoplasma aumenta e, no seu final, alguns pequenos grânulos também podem ser observados. Ainda, segundo os mesmos autores, no final do segundo estádio, cromossomos politênicos apresentando uma diferenciação transversal de bandas e interbandas podem ser claramente distinguidos. Entretanto, esses cromossomos são ainda muito pequenos para uma análise detalhada da atividade cromossômica, visualizada através dos pufes. Após a

unesp

segunda muda, desenvolve-se uma diferença no volume celular e nuclear entre as células da região posterior ou distal e da anterior ou proximal. Em cada lóbulo glandular, o tamanho aumenta gradualmente da região anterior para a região posterior, provavelmente refletindo a ampliação diferencial no nível de politenia dos cromossomos. Nas larvas de terceiro estádio tardio, o nível de politenia dos cromossomos das células posteriores é aproximadamente o dobro daquele das células anteriores das glândulas.

Antes da formação do pupário, a glândula atinge seu tamanho máximo, bem como o grau máximo de politenia cromossômica na maioria dos núcleos. Em *D. melanogaster*, nessa fase, o nível de politenia dos elementos eucromáticos do conjunto cromossômico varia de 512C a 2.048C, com os níveis mais altos nos núcleos da região posterior. As diferenças nos níveis de politenia entre os núcleos anteriores e posteriores são claramente refletidas no diâmetro dos cromossomos (Rodman, 1967).

Entretanto, o crescimento das células, não é sempre acompanhado pelo crescimento dos núcleos. Na época em que as larvas param de se alimentar, cessa o aumento do diâmetro nuclear nas células posteriores, mas as células continuam a crescer. Os núcleos das células anteriores, porém, continuam a aumentar em tamanho, concomitantemente com o aumento do volume celular até pouco tempo antes da formação do pupário (Bodestein, 1950; Berendes, 1965).

Aproximadamente na metade do terceiro estádio larval, grânulos altamente refratários aparecem no citoplasma das células posteriores das

glândulas, aumentando em direção às células anteriores. Glândulas coradas com o reagente Ácido Periódico de Schiff (PAS), específico para polissacarídeos neutros, revelam uma reação fortemente positiva das células contendo os grânulos. Em adição a um aumento gradual no número de células contendo material PAS-positivo, o número de grânulos corados por célula, aumenta durante o terceiro estádio do desenvolvimento (Berendes, 1965).

Embora o começo da síntese de material PAS-positivo varie com a localização da célula dentro da glândula, todas as células têm o potencial para alcançar o mesmo estado funcional. Isto indica, que todas as células das glândulas salivares são do mesmo tipo funcional, mesmo aquelas células anteriores que, no desenvolvimento normal, não produzem grânulos PAS-positivos. Essas células produziriam tais grânulos, se fosse permitido à glândula continuar a crescer, através da implantação em um hospedeiro adulto (Bodenstein, 1950; Berendes & Holt, 1965).

Durante a maior parte do terceiro estádio, o lume da glândula é destituído de material PAS-positivo. No final do terceiro estádio, pouco antes da formação do pupário, esse material é eliminado das células para o lume. Nesta fase, os grânulos PAS-positivos, que estavam aleatoriamente distribuídos no citoplasma, migram para o ápice e podem coalescer para formar áreas homogêneas. Após a eliminação dos grânulos, muitos vacúolos são visíveis no citoplasma. Esses vacúolos aumentam em número e tamanho até que ocorra a eversão da cabeça. As células localizadas na parte anterior da glândula, que não sintetizaram material PAS-positivo, também desenvolvem vacúolos (Berendes &

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Ashburner, 1978).

Cerca de duas horas depois da eversão da cabeça, as glândulas salivares, em *D. melanogaster*, começam a degenerar. Células individuais, geralmente localizadas na parte posterior da glândula, tornam-se leitosas na aparência. Estas células estão entre as primeiras a mostrar núcleos picnóticos, quebra das membranas nucleares e ruptura das membranas basais que cobrem as células da glândula. Pequenas células, provavelmente fagócitos, podem ocasionalmente ser vistas no citoplasma (Bodstein, 1950).

Depois do início da histólise, as glândulas salivares são completamente desintegradas em poucas horas, podendo haver diferença entre as duas glândulas quanto ao início do processo. Os ductos também desaparecem, juntamente com as células glandulares (Berendes & Ashburner, 1978).

I.2. CROMOSSOMOS POLITÊNICOS

Os cromossomos politênicos são encontrados tanto em organismos unicelulares (por exemplo, dinoflagelados), quanto nos organismos pluricelulares, ocorrendo em animais e plantas. Nos animais, os cromossomos politênicos são encontrados somente em Arthropoda (Classe Insecta, Ordens: Collembola e Diptera). Nas plantas, são encontrados em Angiospermas: monocotiledôneas e dicotiledôneas (Sorsa, 1988).

Nas larvas dos dípteros, os cromossomos politênicos atingem seu maior tamanho nas células das glândulas salivares, mas também, ocorrem em diversos outros tecidos, de várias espécies desses insetos. Estudados inicialmente nas glândulas salivares de *Chironomus* por Balbiani, Korschelt & Carnoy nos

anos de 1880, foram considerados como simples curiosidades citológicas até que foram redescobertos e interpretados por Heitz e Bauer (em *Bibio*) e por Painter (em *Drosophila*), em 1933. Desta época em diante, eles têm sido bastante usados em uma variedade de investigações citogenéticas, que vão desde estudos da evolução de populações naturais à pesquisa bioquímica e molecular da natureza da ação gênica (White, 1977; Fletcher *et al.*, 1995; White *et al.*, 1999; Vaskova *et al.*, 2000; Keegan *et al.*, 2001).

Durante o processo de politenização, os cromossomos homólogos sofrem um emparelhamento e começam a se duplicar sem que as cromátides filhas se separem e sem que haja divisão nuclear ou celular. O processo de politenização faz com que os cromômeros e os cromonemas, dispostos paralelamente, originem um padrão característico de bandas e interbandas (Amabis & Simões, 1981).

Em *Drosophila,* os cromossomos politênicos medem, no total, cerca de 1.800 a 2.000 μm de comprimento, enquanto os cromossomos metafásicos têm cerca de 7,5 μm. Essa diferença de tamanho se deve ao fato de que, nos núcleos politênicos, os cromossomos se encontram praticamente desespiralizados. Cada cromonema se apresenta como um longo fio de DNA e histonas, com espessura de aproximadamente 250 Å, constituindo o nível de organização solenóide. A espaços, mais ou menos regulares, ocorrem pontos de enovelamento que vão constituir os cromômeros. Um esqueleto protéico, como o encontrado nos cromossomos metafásicos, parece não existir nos politênicos (Guerra, 1997).

unesp

Os cromossomos politênicos dos dípteros, como *Drosophila* e *Chironomus*, fornecem aos citogeneticistas um instrumento poderoso para a detecção de rearranjos cromossômicos, tais como inversões, deleções, duplicações e translocações, que podem estar presentes no material selvagem ou ser induzidos nos estoques de laboratório pela irradiação ou por outros métodos (White, 1977).

A maioria das aberrações de *D. melanogaster* é induzida por meio de irradiação com raios X ou γ. Painter (1933) introduziu o uso de rearranjos cromossômicos como uma ferramenta na localização de genes. Praticamente todos os estudos de localização genética, antes da introdução do uso da hibridação *in situ*, eram realizados utilizando rearranjos cromossômicos. Os rearranjos envolvendo genes conhecidos são os mais úteis. Particularmente, os rearranjos pequenos, como por exemplo, as deleções e inversões, que causam alguma mudança na função do gene a ser localizado, são muito informativas (Sorsa, 1988).

Também devido à sua organização estrutural, os cromossomos politênicos permitem que muitos genes, quando ativos, sejam visíveis como grandes pufes, que resultam do acúmulo de RNA e proteínas.

I.3. PUFES

Os conhecimentos que se têm hoje sobre os pufes resultaram da soma dos dados de muitos autores, incluindo desde as observações de Balbiani (1881), em *Chironomus*, e os trabalhos de Heitz & Bauer (1933) em *Bibio*, Metz (1935) em *Sciara*, Bridges (1935) e Bauer (1936) em *Drosophila*, Breuer & Pavan (1955) em *Rhynchosciara*, Beermann (1956) em *Chironomus*, entre outros, até

observações recentes envolvendo técnicas de isolamento e sequenciamento do DNA, dessas regiões, e análises mais sofisticadas de seus produtos protéicos (Ashburner, 1990; Burtis *et al.*, 1990; Huet *et al.*, 1993; Monesi *et al.*, 1995; D'Avino *et al.*, 1995; Keegan *et al.*, 2001).

Em 1955, Breuer & Pavan, trabalhando com o díptero *Rhynchosciara angelae*, descreveram pela primeira vez o fenômeno conhecido como amplificação gênica. Estes pesquisadores verificaram que certas bandas dos cromossomos politênicos das glândulas salivares de larvas, dessa espécie, sofriam um aumento desproporcional da quantidade de DNA pouco antes ou durante a formação de grandes pufes. Estas faixas, após a regressão dos pufes, apresentavam-se proporcionalmente muito mais espessas e coravam-se mais intensamente pelo Feulgen que as bandas vizinhas. Os pufes que se desenvolvem a partir de bandas que sofrem amplificação gênica foram denominados pufes de DNA, por Pavan (1965). Além dos pufes de DNA, são encontrados os pufes de RNA, que correspondem a genes que estão sendo transcritos, sem que haja amplificação gênica (Ashburner & Berendes, 1978).

Desde a década de 1950, sabe-se que o padrão de pufes em tecidos larvais, por exemplo, de *Chironomus*, *Drosophila* e *Rhynchosciara*, muda de maneira regular durante o desenvolvimento (Becker, 1959; Pavan & Basile, 1966). Essas mudanças na atividade dos pufes são controladas pelo mesmo hormônio esteróide que controla o desenvolvimento dos insetos, a ecdisona (Ashburner & Richards, 1976). O aumento da concentração deste hormônio na hemolinfa de larvas de terceiro estádio de *Drosophila* promove o início da

pupação. A ecdisona liga-se covalentemente nos cromossomos politênicos, inibindo ou ativando pufes (Dworniczak *et al.*, 1983). Os pufes tardios podem estar sob o controle de pufes precoces, cujos produtos, em alguns casos, são identificados como proteínas de ligação ao DNA (Ashburner, 1990; Huet *et al.*, 1993; Fletcher *et al.*, 1995).

Ritossa (1962), estudando os efeitos da temperatura sobre o padrão de pufes dos cromossomos politênicos das glândulas salivares de *D. busckii*, descobriu que um novo padrão de pufes surgia, após a exposição das larvas a um choque de temperatura (30°C ou mais), durante 30 minutos. Depois desse estudo de Ritossa, muitos trabalhos foram realizados a respeito da indução de pufes por choques de temperatura (Ashburner & Bonner, 1979; Semeshin *et al.*, 1982; Welck, 1993; Nanya, 1993).

Além do tratamento hormonal e choque de temperatura, a indução de pufes pode ser realizada por certos compostos químicos. Serfling *et al.* (1969) mostraram a indução de um grande número de pufes nos cromossomos politênicos de *Chironomus tentans* com o composto químico oxitetraciclina (OCT). Leenders *et al.* (1973) observaram que a vitamina B_6 e seus derivados são capazes de induzir um pufe em um sítio específico de um cromossomo da glândula salivar de *D. hydei*. Amabis & Janczur (1978) obtiveram a indução de grandes pufes nos cromossomos das glândulas salivares, em larvas de *Trichosia pubescens*, utilizando éter dietílico. Além da estimulação da síntese de RNA, alguns compostos químicos podem inibir a transcrição e, portanto, os pufes. A actinomicina, por exemplo, é um agente inibidor que faz com que os pufes

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

regridam (Beermann, 1966).

Um aspecto importante da síntese que ocorre nos cromossomos é a produção do RNA ribossômico, que gera uma estrutura subnuclear distinta, conhecida como núcleolo.

I.4. NUCLÉOLO

O nucléolo foi uma das primeiras estruturas intracelulares a serem descritas, no começo do século XIX. Em 1934, McClintock fez uma importante descoberta mostrando que o nucléolo se associa a regiões específicas dos cromossomos, que são responsáveis pela sua formação. Essas regiões passaram a ser chamadas de regiões organizadoras nucleolares (RONs). Na década de 1960, a identificação da RON como sendo o sítio do DNA ribossômico (rDNA), comprovou a idéia de que o nucléolo é o local de síntese do RNA ribossômico (rRNA), estabelecendo-o como um elemento geneticamente determinado (Perry, 1962; Birnstiel *et al.*, 1963; Brown & Gurdon, 1964). Posteriormente, descobriu-se que o nucléolo não é apenas o local de síntese do rRNA; nele também ocorre a formação das subunidades ribossômicas (Perry, 1965).

Conforme revisão em Bicudo (1982), a hibridação com rRNA, especialmente na década de 1970, confirmou que as constrições secundárias são sítios de rDNA em muitos organismos. Esta confirmação ocorreu, por exemplo, nos cariótipos de *Xenopus* (Pardue, 1974), *Drosophila* (Schäfer & Kunz, 1975), homem (Henderson *et al.*, 1972; Evans *et al.*, 1974), chimpanzé (Henderson *et al.*, 1974a), rato (Henderson *et al.*, 1974b), *Muntiacus* (Pardue & Hsu, 1975). Porém,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

nem sempre as constrições secundárias observadas nos cromossomos metafásicos constituem organizadores nucleolares inequívocos. Entre os exemplos contidos na literatura, pode-se mencionar o trabalho de Hsu *et al.* (1975), com o mamífero *Cricetulus griseus*, portador de uma única constrição secundária localizada no cromossomo X. Esse mamífero mostrou, em experimentos de hibridação, que seus genes ribossômicos estão localizados nas regiões teloméricas de vários autossomos. A constrição secundária do cromossomo X, porém, apresentou uma marcação tão fraca que os autores admitiram que essa região não constitui uma RON.

Ainda, segundo revisão em Bicudo (1982), na maioria dos mamíferos, as RONs são encontradas nos autossomos. Essa preponderância de sítios rDNA autossômicos, nos mamíferos, foi atribuída a possíveis problemas que poderiam resultar na inativação do cromossomo X, nas fêmeas, se esse cromossomo fosse portador daqueles sítios, corroborando essa idéia o fato de que nos mamíferos em que o organizador nucleolar é ligado ao X, o Y também o apresenta.

Já na maioria das espécies de *Drosophila* estudadas, as RONs localizam-se nos cromossomos sexuais. Em *D. melanogaster*, estão na heterocromatina proximal do cromossomo X e no braço curto do cromossomo Y. *D. simulans*, críptica de *D. melanogaster,* apresenta uma RON na heterocromatina proximal do cromossomo X, mas não há indicação de que contenha RON no cromossomo Y. Em *D. hydei*, há uma RON no braço esquerdo, inteiramente heterocromático, do cromossomo metacêntrico X. Além dessa, outras duas RONs

ocorrem no cromossomo Y que é submetacêntrico: uma no braço curto e outra na parte distal do braço longo. Em espécies do complexo *mulleri* do grupo *repleta*, as RONs localizam-se nos cromossomos X e nos microcromossomos, sendo as RONs destes últimos consideradas secundárias (Bicudo & Richardson, 1977).

Visto ao microscópio eletrônico, o nucléolo mostra quatro componentes: componente granular (CG), centro fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD) e cromatina associada ao nucléolo. Cada nucléolo contém um grupo de partículas precursoras dos ribossomos ativas, em vários estágios de maturação. O CG representa o principal componente do nucléolo de células metabolicamente ativas. Mergulhado nessa massa granular encontra-se o CF, que é circundado por uma camada de fibrilas firmemente empacotadas, que compõem o CFD (Comai, 1999).

Os componentes nucleolares são fundamentalmente os mesmos em diferentes vertebrados, invertebrados e vegetais, mas suas quantidades e distribuição variam consideravelmente em diferentes tipos celulares ou em um mesmo tipo celular, dependendo do estado fisiológico do núcleo. A hipertrofia do nucléolo representa um dos mais consistentes aspectos citológicos das células cancerosas. Portanto, é freqüentemente incluído entre os marcadores para diagnóstico de malignidade (Taboga, 1997; Derenzini *et al.*, 1998; Abdo-Banhos, 2000). Os nucléolos, em células malignas, são normalmente grandes e freqüentemente bastante compactos, ou numerosos. Provavelmente, esse aumento de material nucleolar ocorre porque a rápida proliferação celular necessita de uma demanda mais alta de ribossomos do que as células proliferando normalmente

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

(Comai, 1999; Abdo-Banhos, 2000). A literatura registra outras condições patológicas em que ocorre aumento da área nucleolar (Abdo-Banhos, 1998).

O primeiro produto da transcrição do rDNA é uma longa molécula precursora que é processada através de uma série de formas intermediárias até chegar às formas maduras. O processo de maturação da molécula precursora leva, nos vertebrados, à produção de duas moléculas de alto peso molecular, a 28S e a 18S, cujos comprimentos respectivos, nos mamíferos, são de aproximadamente 5.000 e 2.000 nucleotídeos, e uma pequena molécula, a 5,8S, de 158 nucleotídeos. Em muitos organismos, além das moléculas derivadas do processamento da molécula precursora, os ribossomos contêm RNA 5S, que é codificado por outras regiões cromossômicas que não fazem parte do organizador nucleolar e cuja localização já foi determinada em várias espécies de *Drosophila*, no homem, em *Xenopus laevis*, em *Chironomus thummi* e outros organismos (revisão em Bicudo, 1982).

A biogênese dos ribossomos é provavelmente uma das mais complexas vias da síntese de ribonucleopartículas, envolvendo a complexa maturação do rRNA e uma reunião ordenada de aproximadamente 80 proteínas ribossômicas, nos eucariotos. Além dos componentes encontrados na maturação dos ribossomos, o nucléolo contém muitos outros RNAs e proteínas, a maioria dos quais estão transitoriamente associados com as partículas pré-ribossômicas e parecem estar envolvidos em vários aspectos da biogênese dos ribossomos (Ginisty *et al.*, 1999).



Segundo Pederson (2002), já foram identificadas 271 proteínas nucleolares em humanos. Muitas destas proteínas estão envolvidas na biogênese ribossômica, como a B23 (também conhecida como NO38, numatrina ou nucleofosmina), a nucleolina (inicialmente chamada C23), a fibrilarina, dentre muitas outras (revisão em Olson *et al.*, 2000). Outras, porém, são indicativas das mais diversas funções nucleolares (Stegh *et al.*, 1998).

Conforme mostram trabalhos mais recentes, além da transcrição do rDNA e da biogênese dos ribossomos, o nucléolo desempenha outras funções celulares importantes, entre elas o controle do ciclo celular na mitose e na meiose e a atuação na regulação gênica, evidenciando que o nucléolo funciona como um sítio privilegiado para o recrutamento e exclusão de complexos reguladores. Entre as funções nucleolares adicionais incluem-se ainda o processamento do RNA transportador (tRNA) e talvez da RNA telomerase e ainda atuação no envelhecimento celular e na morte celular programada (revisão em Garcia & Pillus, 1999).

I.5. Morte Celular Programada (MCP)

A MCP, na literatura freqüentemente denominada apoptose, é um processo pelo qual as células ativadas sofrem um programa de "suicídio" que resulta em morte celular individual. Este é um processo altamente orquestrado, em que as células cometem "suicídio", destruindo-se de uma maneira controlada. Por ser um processo fisiológico normal, ocorre tanto no desenvolvimento embrionário quanto em animais adultos, durante a degradação de tecidos e a resposta imune (Takamizawa *et al.*, 2000).

unesp

O termo apoptose, uma palavra do grego antigo usada para descrever a queda das pétalas das flores ou das folhas das árvores, foi proposto por Kerr *et al.* em 1972. Segundo esses autores, cujo trabalho foi realizado em tecidos de ratos e humanos, as mudanças ultraestruturais que acompanham a apoptose incluem: (a) perda do volume celular, devido à condensação do material citoplasmático e nuclear; (b) separação das células mortas de suas vizinhas e (c) fragmentação da célula em corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos ou pelas células vizinhas. Outro aspecto característico da morte apoptótica, relatado pelos autores, é que apesar destas mudanças citológicas, as organelas permanecem intactas e são freqüentemente identificadas até depois do engolfamento.

Como foi mencionado, a ativação da apoptose ocorre através de um programa intrínseco de suicídio geneticamente controlado, mas também responde a sinais extrínsecos, tais como, radiação ionizante, infecção viral, interações celulares e hormônios. Os sinais extrínsecos podem promover ou suprimir a apoptose (Steller, 1995).

Diferentemente da apoptose, a necrose é uma forma patológica de morte celular, que resulta da exposição a várias injúrias externas, tais como a privação de oxigênio (hipóxia), temperaturas anormais (hipotermia e hipertermia) ou certas toxinas. Quando sofrem injúria celular, a célula e suas organelas incham, ocorre perda da integridade da membrana plasmática, deste modo liberando material citoplasmático, que freqüentemente desencadeia uma resposta inflamatória (Wyllie, 1981; Steller, 1995).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Estudos genéticos no nematóide *Caenorhabditis elegans*, que durante seu desenvolvimento, perde por "suicídio" 131 de suas 1090 células, permitiram a identificação de três genes principais que estão diretamente envolvidos na regulação e execução da morte celular, através de seus produtos: os genes *ced 3*, *ced 4*, e *ced 9*. Os dois primeiros são requeridos para executar a morte celular e o último é antagonista da ação dos dois primeiros (revisão em Meier & Evan, 1998). O gene *ced 3* codifica uma enzima denominada caspase, que cliva proteínas e constitui a chave no processo de "suicídio", enquanto o supressor *ced 9* codifica uma proteína associada à membrana. CED 4, a proteína codificada pelo gene *ced 4*, foi recentemente identificada como uma proteína crítica na ativação da função degradativa da caspase (Chinnaiyan *et al.*, 1997).

Em *D. melanogaster*, foram identificados vários genes envolvidos na MCP (McCall & Steller, 1997). Entre os ativadores da apoptose melhor caracterizados estão *reaper (rpr), head involution defective (hid)* e *grim* (White *et al.*, 1994; Grether *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996). Estes três genes localizam-se na região definida como Df(3L)H99 e apesar de não apresentarem homologia extensa com genes de vertebrados, sua expressão é suficiente para induzir a morte celular em mamíferos, sugerindo que utilizam alvos que são conservados nas células dos vertebrados (McCarthy & Dixit, 1998; Wang *et al.*, 1999). Em *Drosophila*, a deleção de *rpr, hid* e *grim* bloqueia a apoptose e a superexpressão de qualquer um deles é suficiente para matar células que normalmente viveriam. Embora o conhecimento de como *rpr, grim* e *hid* causam apoptose seja incompleto, sabe-se que a morte celular induzida por cada um dos

unesp

produtos gênicos desses genes é precedida pela ativação das caspases. Na presença da proteína baculovírus p35, um inibidor específico de caspases, a apoptose dirigida por *rpr, grim* e *hid* é bloqueada (White *et al.*, 1994).

As caspases representam os principais efetores da apoptose e por serem altamente conservadas através da evolução, são encontradas desde invertebrados como *C. elegans* e *Drosophila* até humanos (Hengartner, 2000). Em *Drosophila*, sete caspases foram caracterizadas, até o presente momento: DCP-1 (Song *et al.*, 1997), DREDD/DCP-2 (Inohara *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998), drICE (Fraser & Evan, 1997), DRONC (Dorstyn *et al.*, 1999a), DECAY (Dorstyn *et al.*, 1999b), STRICA (Doumanis *et al.*, 2001) e DAMM (Harvey *et al.*, 2001). Essas proteases são sintetizadas como pró-enzimas inativas e, durante a apoptose, são processadas na sua forma ativa por complexas vias de ativação proteolítica (Harvey *et al.*, 2001).

A idéia do envolvimento do nucléolo na MCP decorreu de uma série de trabalhos recentemente publicados. Por exemplo, em um estudo relacionado ao transporte do sinal apoptótico do citoplasma para o núcleo, foi verificado que a proteína DEDD, durante a apoptose mediada pelo receptor de membrana CD95 (também denominado Fas ou APO-1), transloca-se do citoplasma para o núcleo por processo dependente da caspase. No interior do núcleo, a proteína DEDD move-se para o nucléolo, onde interrompe a transcrição do rDNA dependente da polimerase I. Assim, os resultados sugeriram que DEDD é o alvo final de uma cadeia de eventos pela qual o sinal apoptótico, induzido pelo CD95 ativado, é transferido para o nucléolo onde desliga as atividades

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

biossintéticas (Stegh *et al.*, 1998).

Tem havido um progresso considerável no conhecimento da regulação gênica da MCP das glândulas salivares de *Drosophila*. Segundo Farkas & Mechler (2000a), a desintegração dessas glândulas é uma resposta apoptótica conduzida pela ecdisona, requerendo a presença da proteína p127, codificada pelo gene *l(2)gl* [gene *lethal (2) giant larvae*]. Larvas deficientes desse gene, expostas à ecdisona, resultaram em um padrão de pufação cromossômica característico da fase de formação da pupa, mas incapaz de induzir as mudanças morfológicas que precedem a morte celular, tais como a vacuolização citoplasmática e a liberação de componentes citoplasmáticos para o lume da glândula. Estudos preliminares, realizados pelos mesmos autores mostraram que a regulação do tempo de histólise das glândulas salivares apresenta dose-resposta ao gene *l(2)gl*. A expressão reduzida de p127, atrasa a histólise enquanto a superexpressão acelera consideravelmente esse processo. Foi demonstrado também o envolvimento do fator de transcrição BRC-Z1. A histólise das glândulas salivares não ocorre em pupas que apresentam mutação no gene responsável por esse fator.

Farkas & Mechler (2000b) examinaram a distribuição do fator de transcrição, BRC–Z1, nas glândulas salivares e verificaram que o mesmo permanece no citoplasma e não aparece no núcleo, nas pupas mutadas, sustentando a idéia de que a proteína p127 funciona em estágios precoces da via apoptótica. Foi observado também por esses autores que um outro gene, *Enhancer of broad*, afeta o gene *zipper*, o qual codifica a cadeia pesada da miosina II. Para verificar se esse gene está envolvido na apoptose das glândulas salivares, foi

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

estudado o efeito de superexpressão da miosina II, tendo-se verificado que produz um acúmulo citoplasmático de BRC-Z1 e bloqueia a histólise da glândula salivar. Finalmente, a superexpressão de BRC-Z1 na época da formação da pupa acelera o processo de apoptose das glândulas salivares, mas é inoperante na ausência da ecdisona. Esses dados indicam, segundo os autores, que as proteínas citoesqueléticas podem regular a obtenção, pelo núcleo, dos fatores de transcrição que são requeridos na via apoptótica desencadeada pela ecdisona levando à histólise das glândulas salivares.

Um estudo importante sobre a MCP em *Drosophila* foi apresentado por Lee e Baehrecke (2001). Baseados em revisão da literatura esses autores diferenciaram e definiram três tipos de MCP. O primeiro tipo, conhecido como apoptose, como já foi descrito anteriormente, é encontrado 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 associadas ou tecidos inteiros são destruídos. Estas células contêm vacúolos autofágicos no citoplasma que funcionam na degradação dos componentes celulares. O terceiro tipo, conhecido como morte celular não lisossômica, é a menos comum e é caracterizada por inchamento de cavidades com bordos membranosos, seguido por degeneração, sem atividade lisossômica.

Os autores consideram que nas glândulas salivares de *Drosophila* o fenômeno de MCP preenche a definição da autofagia. Entretanto, segundo os mesmos autores, embora essas células mostrem características da

unesp

autofagia, a literatura recente sugere que a MCP desencadeada pelos hormônios esteróides nas glândulas salivares de *Drosophila* utiliza genes, como as caspases, que são parte conservada da via apoptótica.

Na verdade, segundo esses autores, a dinâmica dos vacúolos na morte celular indica que as glândulas salivares sofrem autofagia e a presença de marcadores de apoptose sugere semelhanças entre os dois processos.

unesp

II. OBJETIVOS

Tendo em vista a importância que o processo da apoptose apresenta no desenvolvimento e na vida celular, e o conhecimento ainda incompleto dos aspectos que envolvem a MCP das glândulas salivares de *Drosophila*, pretendeu-se, no presente trabalho, utilizando *Drosophila saltans*, estudar o seguinte:

1. As alterações morfológicas apresentadas, principalmente, pelos cromossomos politênicos e nucléolos nas glândulas salivares, durante o desenvolvimento, entre larva de terceiro estádio e pupa média, fase em que ocorre a histólise das mesmas;

2. Analisar as alterações do padrão de pufes no mesmo período do desenvolvimento;

3. Utilizar a morfometria para verificar possíveis alterações de tamanho das glândulas salivares no período.

unesp

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. ORGANISMO UTILIZADO E PROCEDÊNCIA

O presente estudo foi realizado em *Drosophila saltans* (grupo *saltans*, subgrupo *saltans*), utilizando a linhagem 180.40, procedente de San José – Costa Rica.

III.2. MANUTENÇÃO DAS MOSCAS NO LABORATÓRIO

As moscas foram mantidas em garrafas com capacidade de um quarto de litro, contendo meio de fubá, dentro de uma câmara de temperatura constante a 20°C ± 1. As moscas foram transferidas para meio novo a cada sete dias, aproximadamente.

Em *Drosophila*, um aspecto que é crítico para a obtenção de bons preparados de cromossomos politênicos de glândulas salivares, diz respeito ao estado nutricional dos indivíduos que serão utilizados. Para isso, é fundamental que o material a ser estudado seja proveniente de culturas com pouca densidade de larvas, e que elas tenham sido alimentadas com uma solução de levedura (fermento Fleischmann). Este cuidado propicia uma maximização do ciclo de politenia, por super estimulação da função das glândulas salivares, desde os estádios mais precoces.

O fermento é dissolvido em água destilada e algumas gotas são pingadas nas garrafas que já contêm larvas no primeiro estádio do desenvolvimento, uma vez ao dia, por três dias consecutivos.

III.3. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DESENVOLVIMENTO

No presente trabalho foram analisadas estruturas celulares em diferentes fases do desenvolvimento. Para melhor caracterizar essas fases e tentar

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

uma melhor padronização das mesmas, procedeu-se a um estudo do tempo de desenvolvimento de *D. saltans*.

Fêmeas e machos virgens foram coletados de garrafas do estoque três vezes ao dia, durante dois dias, e permaneceram em vidros separados por cinco dias (tempo de amadurecimento sexual). No sexto dia, fêmeas e machos foram transferidos para um mesmo vidro, onde ficaram por 24 horas, para que ocorresse a cópula. Após esse período, os indivíduos foram transferidos para duas caixas de população: 88 fêmeas e 64 machos (caixa 1) e 110 fêmeas e 161 machos (caixa 2).

Foram utilizadas caixas de população de acrílico com 16x16 cm na base, por 19 cm de altura. A caixa possui três aberturas, cada uma com 6 cm de diâmetro. Nas duas aberturas inferiores foram acopladas placas de Petri contendo meio de fubá, que foram utilizadas para coleta dos ovos. A outra abertura fica localizada em uma das paredes e foi fechada com um chumaço de algodão, servindo para ventilar. A cada 24 horas, as placas com meio foram substituídas por outras placas. Logo após eclodirem, as larvas de primeiro estádio (L_1) foram transferidas para tubos (10 cm de altura e 3,5 cm diâmetro) contendo meio de fubá. Foram preparados e analisados 18 tubos, cada um contendo 15 larvas. As caixas de população, placas e tubos foram mantidos em câmara de temperatura constante a 20°C ± 1°C.

A análise dos tubos foi feita três vezes ao dia (8:00, 13:00 e 18:00 horas). Foi acompanhado o desenvolvimento de um total de 270 indivíduos e obtidos os tempos mínimo e máximo de permanência em cada fase. Os tempos

foram computados a partir da oviposição.

Em média, as larvas L_1 eclodem a partir de 46 horas após a oviposição e os adultos emergem a partir de 18 dias. Os dados encontram-se na Tabela 1. Esses dados, mais os aspectos morfológicos permitiram caracterizar as diferentes fases do desenvolvimento, como segue:

1) Larvas de terceiro estádio inicial (L_3i): são larvas grandes e móveis que ainda se alimentam. Tempo de desenvolvimento até atingir essa fase: entre 166 horas (mínimo) e 289 horas (máximo), com valores médios de 186 e 262 horas, respectivamente;
2) Larvas de 3º estádio tardio (L_3T): são larvas praticamente imóveis ou pouco móveis que já pararam de se alimentar e ainda não possuem os espiráculos anteriores evertidos. Tempo de desenvolvimento até atingir essa fase: entre 213 horas (mínimo) e 289 horas (máximo), com valores médios de 236 e 264 horas, respectivamente;
3) Puparium (PU): ainda não apresentam envoltório duro, mas já possuem os espiráculos anteriores evertidos. Tempo de desenvolvimento: duração aproximada de uma hora, após a fase anterior;
4) Pré-pupas (PP): apresentam envoltório duro, mas ainda sem pigmentação. A transparência do envoltório permite a visualização dos órgãos, o que confere ainda uma coloração esbranquiçada a esses indivíduos. Tempo de desenvolvimento: uma hora após a fase puparium;
5) Pupas jovens (PJ): apresentam envoltório duro, coloração amarelada, olho ainda sem pigmentação e cabeça ainda não evertida. Tempo de

Tabela 1. Tempos mínimo e máximo de desenvolvimento, em horas, de *D. saltans*, linhagem 180.40, para larva de terceiro estádio inicial até a emergência dos imagos. Foi acompanhado o desenvolvimento de 270 indivíduos. L_3i = larva de terceiro estádio inicial; L_3T = larva de terceiro estádio tardio; PJ = pupa jovem; PM = pupa média e PV = pupa velha. Câmara de temperatura constante a 20°C ± 1°C.

	Fases do Desenvolvimento										
	L_3i		**L_3T**		**PJ**		**PM**		**PV**		**Adultos**
Tubo	min.	max.	min.	max.	min.	max.	min.	max.	min.	max.	a partir de
1	205	254	239	264	254	286	278	430	375	478	446
2	206	259	254	259	254	278	278	454	375	474	446
3	205	264	254	264	259	310	278	450	375	494	446
4	191	259	238	263	263	330	278	379	374	446	427
5	205	263	238	263	253	302	278	379	383	469	446
6	205	263	238	263	253	310	278	335	374	430	446
7	189	247	237	247	237	289	262	410	358	477	430
8	186	242	218	247	238	294	262	358	358	413	430
9	166	262	237	262	237	291	262	413	366	501	429
10	193	246	237	246	237	269	266	389	381	452	452
11	166	266	262	269	262	313	286	433	385	524	433
12	188	289	237	289	242	309	262	433	361	486	429
13	166	266	237	262	262	433	267	405	362	500	429
14	188	246	213	269	237	315	262	389	362	477	429
15	166	269	221	269	242	293	262	433	366	477	429
16	166	269	221	269	242	293	266	429	381	480	429
17	193	269	237	269	242	318	262	389	365	477	429
18	166	269	236	269	242	313	261	405	365	461	428
Média	**186**	**261**	**236**	**264**	**248**	**308**	**269**	**406**	**370**	**473**	**435**

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

desenvolvimento desde ovo: entre 237 horas (mínimo) e 433 horas (máximo), com valores médios de 248 e 308 horas, respectivamente;

6) Pupas médias (PM): Olhos ainda não pigmentados. A cabeça já foi evertida, estando a região anterior, descolada do pupário. Tempo de desenvolvimento desde ovo: entre 261 horas (mínimo) e 454 horas (máximo), com valores médios de 269 e 406 horas, respectivamente;
7) Pupas velhas (PV): correspondem à fase anterior à emergência do adulto, já sendo possível observar os olhos pigmentados, a presença das asas e patas. Tempo de desenvolvimento: entre 361 horas (mínimo) e 524 horas (máximo), com valores médios de 370 e 473 horas, respectivamente.

III.4. PREPARO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA

No presente trabalho, foram analisadas preparações de glândulas salivares, em microscopia de luz, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão.

III.4.1. PREPARAÇÕES PARA MICROSCOPIA DE LUZ

As lâminas para análise em microscopia de luz foram preparadas por esmagamento e coradas com nitrato de prata, orceína lacto-acética, reativo de Schiff (Feulgen), Bandamento C e alaranjado de acridina.

Para a obtenção das glândulas salivares realizou-se a dissecção da larva ou pupa em solução fisiológica de Demerec (Demerec & Kaufmann, 1945), para prevenir a degeneração dos tecidos. Com o auxílio de dois estiletes e sob o microscópio estereoscópico, a metade anterior do corpo da larva foi comprimida com um dos estiletes e a região da cabeça foi puxada com o outro,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

expondo as glândulas salivares. No caso da pupa, primeiro retirou-se o envoltório anterior. As glândulas salivares foram limpas com o auxílio dos estiletes, sendo retirado todo o tecido gorduroso que as envolvia.

Após a dissecção, as glândulas salivares foram transferidas para uma lâmina contendo uma gota de ácido acético a 45%, onde permaneceram durante um minuto. Em seguida, o material foi coberto com lamínula e esmagado sob pressão. As lâminas foram imersas no nitrogênio líquido durante dez segundos, sendo as lamínulas retiradas com o auxílio de uma gilete. As lâminas foram colocadas para secar à temperatura ambiente e guardadas no congelador para posterior coloração. Utilizou-se este procedimento para as lâminas que seriam coradas com nitrato de prata, Reativo de Schiff, Bandamento C e alaranjado de acridina. No caso da coloração com orceína lacto-acética, logo após a dissecção, as glândulas salivares foram transferidas para uma lâmina e submetidas à técnica de coloração (ver item III.4.1.1.).

No caso do estudo de pufes, como ocorre uma variação no grau de politenia entre as células da glândula salivar, com o objetivo de reduzir essa variação, foi utilizada somente a metade distal das glândulas salivares, que é onde são encontrados os cromossomos mais politenizados.

III.4.1.1. Coloração com orceína lacto-acética

Após a dissecção, as glândulas salivares foram transferidas para uma lâmina contendo uma gota de orceína lacto-acética a 2%, onde permaneceram durante oito minutos. Em seguida, a orceína foi retirada com o auxílio de papel absorvente e pingou-se, sobre o material, ácido láctico a 50%,

deixando transcorrer dez minutos. O material foi então coberto com lamínula, realizando-se o esmagamento. Após o esmagamento, a lâmina foi lutada com esmalte incolor. A orceína lacto-acética cora DNA e proteínas, tornando possível o estudo da cromatina.

Preparo da solução:

a) Solução de Orceína lacto-acética a 2%

- 2 g de orceína
- 42,5 mL de ácido acético
- 42,5 mL de ácido láctico
- 15 mL de água destilada

Aquecer o ácido láctico e o ácido acético em banho-maria (60 a 80°C). Acrescentar a orceína. Após esfriar, acrescentar a água destilada. Filtrar após 24 horas e guardar em frasco escuro.

III.4.1.2. Impregnação pelo nitrato de prata

A impregnação das lâminas foi realizada seguindo a técnica de Howell & Black (1980), que utiliza duas soluções: uma solução coloidal reveladora (solução A) e uma solução de nitrato de prata a 50% (solução B). As lâminas foram colocadas em câmaras úmidas, e sobre cada uma foi pingada uma gota da solução A e duas gotas da solução B. As lâminas foram cobertas com lamínulas e colocadas na estufa a 70°C durante oito minutos sendo em seguida lavadas em água destilada, para retirar a lamínula e o excesso do corante. As lâminas foram deixadas secando à temperatura ambiente (24 horas), e montadas com verniz cristal. A técnica de impregnação com o nitrato de prata marca o

material nucleolar, em glândulas salivares de *Drosophila*.

Preparo das soluções:

a) Solução A – Solução Coloidal Reveladora

- Dissolver 1 g de gelatina em 50 mL de água destilada e acrescentar 0,5 mL de ácido fórmico. Essa solução deve ser preparada com aquecimento.

b) Solução B – Solução de Nitrato de Prata a 50%

- Dissolver 1 g de nitrato de prata em 2 mL de água destilada. Preparar a solução em frasco escuro, que deve ser envolvido em papel alumínio.

III.4.1.3. Coloração pela Técnica de Feulgen

As lâminas foram submetidas à Reação de Feulgen, utilizando-se a técnica de Kirschbaum (1973), que consiste, basicamente, no seguinte: o material foi hidrolisado em ácido clorídrico1 N durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Logo após, as lâminas foram lavadas por três vezes em água destilada. Fez-se o tratamento com o Reativo de Schiff por 50 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Transcorrido o tempo, foram dados três banhos nas lâminas (20 segundos cada) em água sulfurosa e em seguida em água destilada. Desidratação em álcool a 70% e 95%, e secagem à temperatura ambiente. Depois de secas, as lâminas foram montadas com verniz cristal. A coloração com Feulgen é específica para DNA.

Preparo das soluções:

a) Reativo de Schiff

- Dissolver 1 g de fuscina básica em 100 mL de água destilada fervendo;
- Deixar esfriar até 60°C e então acrescentar 4 g de metabissulfito de sódio ou

potássio. Acrescentar 20 mL de ácido clorídrico 1 N e agitar;

- Deixar em repouso por 24 horas no escuro (envolvido em papel alumínio), na geladeira;
- No dia seguinte, acrescentar 0,5 g de carvão ativo e agitar. Filtrar e guardar na geladeira em frasco escuro.

Se o filtrado não estiver totalmente transparente, acrescentar mais 0,5 g de carvão ativo, filtrando novamente após 24 horas.

b) Água sulfurosa

- 10 mL de ácido clorídrico 1 N;
- 10 mL de bissulfito de sódio a 10%;
- Água destilada até completar 200 mL.

A água sulfurosa deve ser preparada na hora de usar.

III.4.1.4. Coloração por Bandamento C

A coloração por Bandamento C foi realizada segundo a técnica de Sumner, 1972. Foram utilizadas lâminas preparadas com pelo menos quatro dias de antecedência. A técnica consiste em pingar sobre a lâmina três a quatro gotas de solução de hidróxido de bário a 5%, previamente filtrada. Cobrir a lâmina com lamínula, deixando-a durante seis minutos em banho-maria a 60°C. Decorrido o tempo, a lâmina foi lavada em água destilada gelada contendo 2 mL de ácido acético, para que a lamínula e o excesso de hidróxido de bário fossem retirados. Em seguida, foi dado um banho na lâmina em 2xSSC durante 10 minutos, à temperatura ambiente, e depois durante 1 hora em banho-maria a 60°C. Decorrido o tempo, foram dados dois banhos em álcool a 70%, repetindo-se a

operação com álcool a 95%. Após a desidratação, as lâminas foram deixadas secando à temperatura ambiente. Estando secas, pingou-se sobre cada lâmina Giemsa a 2%, permanecendo a coloração durante vinte minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada em água destilada para que o excesso do corante fosse retirado, sendo deixada secando à temperatura ambiente. Estando seca, a lâmina foi montada com verniz cristal. O bandamento C cora especificamente regiões de heterocromatina.

Preparo das soluções:

a) Solução tampão fosfato (pH 6,8):

⇒ Solução A: - 14,196 g de fosfato de sódio dibásico

- Água destilada até completar 500 mL

⇒ Solução B: - 13,61g de fosfato de potássio monobásico

- Água destilada até completar 500mL

Em 100 mL de água destilada acrescentar 24,5 mL da solução A e 25,5 mL da solução B. O tampão fosfato deve ser preparado na hora de usar.

b) Solução de Bário a 5%

- 3 g de hidróxido de bário
- Água destilada até completar 60 mL

Esta solução deve ser preparada em frasco escuro envolvido em papel alumínio.

c) Solução salina de 2xSSC

- 8,765 g de cloreto de sódio
- 4,41 g de citrato trisódico

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

- Água destilada até completar 500 mL

d) Solução tamponada de Giemsa a 2%

- 1 mL de solução-mãe de Giemsa
- 49 mL de tampão fosfato

e) Solução de Giemsa concentrada (solução mãe)

- 0,5 g de Giemsa
- 33 mL de glicerina

Deixar o Giemsa dissolver na glicerina durante duas horas em banho-maria a 60°C. Após esfriar a solução, adicionar 33 mL de metanol. Colocar em frasco escuro e após sete dias filtrar.

III.4.1.5. Coloração com alaranjado de acridina (acridine orange)

O alaranjado de acridina é um corante metacromático que cora diferencialmente ácidos nucléicos de fita dupla e fita simples. O corante liga-se ao DNA de fita dupla como um monômero, emitindo fluorescência verde sob excitação de 520 nm e se liga no DNA de fita simples ou RNA como um dímero, emitindo fluorescência vermelha sob excitação de 650 nm. O alaranjado de acridina também pode ser usado como um corante vital em células não fixadas. Dependendo do tampão utilizado, para a diluição do corante, e do pH, o alaranjado de acridina cora também os lisossomos (Nicoletti & Mannuci, 2002; Berg, 2002).

A técnica de coloração com alaranjado de acridina foi adaptada para glândulas salivares a partir de Abrams *et al.* (1993).

Realizou-se a coloração pingando-se sobre a lâmina duas gotas

de alaranjado de acridina, permanecendo a coloração durante 15 minutos. Decorrido o tempo, colocou-se a lamínula sobre o material imerso no próprio corante. Todo o procedimento foi realizado no escuro. A análise do material foi realizada logo após a coloração, em microscópio de fluorescência (Axioskop – Zeiss MC 80), utilizando o filtro azul, rosa ou vermelho.

Preparo das soluções:

a) Alaranjado de acridina (Sigma)

- 5 µg/mL de alaranjado de acridina diluído em tampão fosfato

b) Tampão fosfato 0,1 M pH 7,2

- 1,44 g de fosfato de sódio monobásico
- 7,50 g de fosfato de sódio dibásico
- Água destilada até completar 400 mL

III.4.1.6. Análise dos pufes

O padrão de pufes foi analisado nas fases de larva de 3º estádio tardio e pré-pupa. Com o fim de verificar as variações dos tamanhos dos pufes, foram feitas medições de seus diâmetros, nas fases do desenvolvimento acima citadas. Para cada pufe medido foi utilizada uma banda como referência, denominada banda padrão (bp), sendo o diâmetro obtido pela razão diâmetro do pufe dividido pelo diâmetro da bp. A bp sempre se encontra próxima ao pufe para evitar erros decorrentes do fato da espessura ao longo do cromossomo variar. As medições dos pufes e das bp foram realizadas utilizando régua milimétrica.

III.4.1.7. Preparações para morfometria das glândulas salivares

A dissecção dos indivíduos para a retirada das glândulas

salivares foi realizada em solução fisiológica de Demerec (Demerec & Kaufmann, 1945), diretamente na lâmina a ser preparada. Todo o tecido gorduroso que circundava as glândulas foi retirado. O material foi colocado em uma gota de orceína lacto-acética, deixando transcorrer o tempo de trinta segundos (tempos superiores coraram excessivamente as glândulas). Decorrido este tempo, retirou-se a orceína com o auxílio de papel absorvente, de modo que o máximo de corante fosse retirado ao redor das glândulas. Pingou-se verniz cristal para tornar a lâmina permanente. Antes de colocar a lamínula, caquinhos de lamínula foram colocados em torno do material na lâmina, impedindo que a lamínula, ao ser colocada, esmagasse o material.

A medida da área e perímetro das glândulas salivares foi realizada no analisador de imagens, utilizando o programa Global Lab Image – Data Translation. Devido ao tamanho avantajado das glândulas, para a aplicação deste programa, as mesmas foram fotografadas, suas fotos foram montadas, e a montagem resultante foi capturada em escaner.

III.4.2. Preparações para Microscopia Eletrônica de Transmissão

O procedimento para a retirada das glândulas salivares foi o mesmo descrito para a microscopia de luz (item III.4.1.). Foram utilizadas glândulas salivares de larva de 3º estádio tardio e pupa média. Após cada dissecção, o par de glândulas era transferido para um eppendorf contendo 100 µL de tampão cacodilato. Esse tampão foi utilizado para preservar as glândulas até que fosse obtido o número de vinte glândulas para cada estádio.

A fixação das glândulas salivares foi realizada em glutaraldeído

a 3% por duas horas a 4°C. Decorrido o tempo, realizaram-se três lavagens, de vinte minutos cada, em tampão cacodilato a 4°C. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1%, durante uma hora e meia a 4°C. Em seguida, o material foi lavado em água destilada (3 x 30 minutos cada). A desidratação foi feita em uma série crescente em etanol, como descrito a seguir:

Etanol 30% ..... 30 minutos (4°C)

Etanol 50% ..... 30 minutos (Freezer a –20°C)

Etanol 70% ..... 30 minutos (Freezer a –20°C)

Etanol 100% .....30 minutos (Freezer a –20°C)

Etanol 100% .....1 hora (Freezer a –20°C)

Após a desidratação, iniciou-se o processo de infiltração da resina (Spurr), nas glândulas salivares. Deixou-se o material imerso em resina 1:1 etanol 100%, durante 2 horas a –20°C. Em seguida, o material foi colocado na resina pura ficando *overnight* (-20°C). No dia seguinte, o material foi emblocado em resina pura. A polimerização foi feita a 60°C durante 24 horas. As secções ultrafinas (~ 60 nm) foram coletadas em telinhas de cobre e contrastadas com solução aquosa de acetato de uranila a 2% por cinco minutos e citrato de chumbo por dois minutos.

Preparo das soluções:

a) Glutaraldeído a 3%

- O glutaraldeído vem numa concentração de 25%. A diluição até 3% deve ser feita utilizando-se tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2.

Esta droga deve ser preparada na hora de usar.

b) Tetróxido de Ósmio a 1%

- tetróxido de ósmio vem numa concentração de 4%. A diluição até 1% deve ser feita utilizando-se tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2.

III.5. ILUSTRAÇÃO FOTOGRÁFICA

Para a obtenção das fotomicrografias, em microscopia de luz, foi utilizado foto microscópio Zeiss II (Doação FAPESP), e filme Kodak T MAX 100 ASA, branco e preto. Para a obtenção das fotomicrografias em microscopia de fluorescência foi utilizado microscópio Axioskop Zeiss MC 80, do Departamento de Zoologia e Botânica, com lâmpada de 50 Watts e filme Kodak ultra 400 ASA, colorido. Quanto às eletromicrografias, foi utilizado microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906 operando a 80 kV (Doação FAPESP) e filme Kodak 4489 para microscopia eletrônica.

Tanto para a microscopia de luz, quanto para a microscopia eletrônica de transmissão, a ampliação das fotos foi feita em papel fotográfico Kodak Professional, branco e preto (KODABROME IIRC - F3). Na microscopia de fluorescência, os filmes foram revelados e as fotos ampliadas em um estabelecimento comercial, sob supervisão. As fotomicrografias feitas em microscopia de luz foram reveladas e ampliadas no Laboratório Fotográfico do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – UNESP. As elétromicrografias foram reveladas e ampliadas no Laboratório Fotográfico do Centro de Microscopia, do mesmo Instituto. Em ambos os casos, foram seguidas as técnicas de rotina.

unesp

IV. RESULTADOS

IV.1. ANÁLISE DE ESTRUTURAS CELULARES, NO DESENVOLVIMENTO, EM MICROSCOPIA DE LUZ

Neste item, as estruturas celulares analisadas nas glândulas salivares de *D. saltans*, abrangendo cromossomos, nucléolo, cromocentro e aspectos citoplasmáticos, estão descritas como foram observadas em lâminas preparadas por esmagamento e submetidas às técnicas de coloração com orceína lacto-acética, nitrato de prata, reativo de Schiff (Feulgen) e bandamento C.

IV.1.1. CROMOSSOMOS

IV.1.1.1. Características estruturais dos cromossomos em larvas de terceiro estádio tardio

Os cromossomos politênicos são encontrados na fase larval dos dípteros, em vários órgãos, tais como glândulas salivares, túbulos de Malpighi, corpos gordurosos, células nutritivas do ovário e epitélio do intestino. Porém, são usualmente mais estudados em núcleos de glândula salivar, dado o tamanho que atingem nesse órgão e a maior facilidade de seu espalhamento.

A espessura dos cromossomos politênicos aumenta continuamente, por replicação, ao longo do desenvolvimento, atingindo seu tamanho máximo em larvas de terceiro estádio tardio. Os homólogos encontram-se intimamente pareados, dificultando inclusive a identificação dos componentes do par. Os cromossomos apresentam uma diferenciação transversal em bandas e interbandas, ao longo de todo o seu comprimento, exceto nas regiões heterocromáticas centroméricas, onde os filamentos se apresentam com aspecto desorganizado.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Em várias espécies de *Drosophila*, os cromossomos politênicos nas glândulas salivares associam-se pela região centromérica, constituindo o cromocentro. Este é o caso de *D. saltans*, objeto do presente trabalho. Essa espécie apresenta três pares de cromossomos, sendo dois metacêntricos (cromossomos X e II) e um acrocêntrico (cromossomo III) (Figura 1). Nas células das glândulas salivares eles aparecem como cinco braços ligados pelo cromocentro. Sob pressão para preparo das lâminas por esmagamento, os cromossomos X e III se separam do conjunto, e o cromossomo II mantém a maior parte do cromocentro. O cromossomo Y, nessa espécie, por ser inteiramente heterocromático fica incluído no cromocentro, nos machos.

IV.1.1.2. Características estruturais dos cromossomos em pupas

No decorrer do desenvolvimento, os cromossomos politênicos das glândulas salivares sofrem alterações que se tornam mais acentuadas à medida que se aproxima a histólise, na fase da pupa média. Essas alterações foram analisadas em lâminas coradas com orceína lacto-acética, Feulgen e nitrato de prata. Caracterizam-se, às vezes por quebras cromossômicas, mas sempre por alterações no padrão de bandas, que se tornam anastomosadas até perda completa desse padrão (Figuras 2 e 3).

Quando os núcleos não se abrem, cromossomos compactados podem ser vistos entremeados por vesículas, ou emaranhados de fios, ou resquícios do padrão de bandas (Figura 4).

Quando os núcleos se abrem, as vesículas podem ser melhor visualizadas e aparecem muitas vezes integradas nos cromossomos ou em restos

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17



Figura 1. Larva de terceiro estádio tardio. Orceína lacto-acética. Conjunto cromossômico de célula secretora da glândula salivar de *D. saltans*. Os cromossomos encontram-se ligados pelo cromocentro (cr). Os cinco braços cromossômicos são denominados: XL, XR, IIL, IIR e III. 1.850 x.

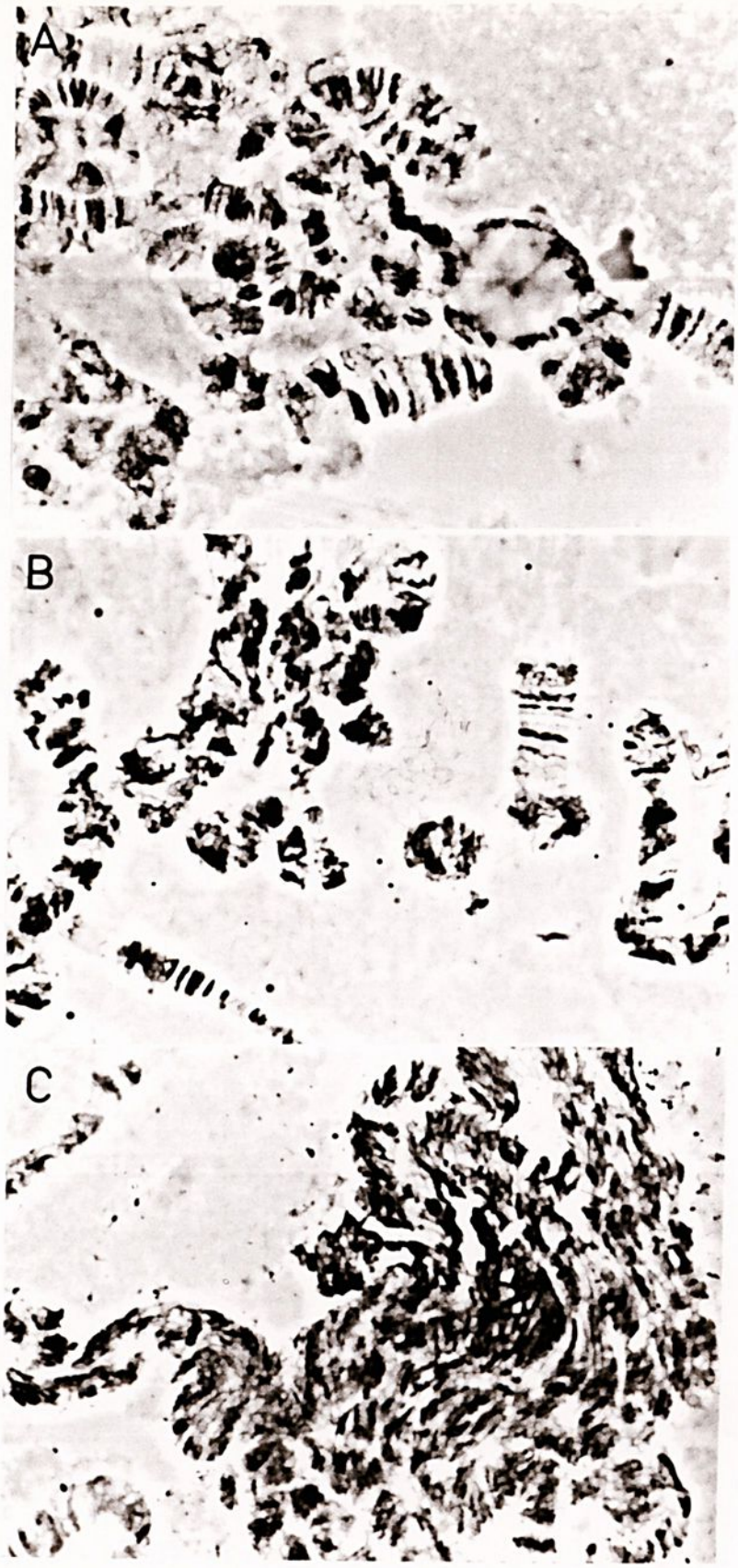


Figura 2 A-C. Pupa média. Orceína lacto-acética. Observar a estrutura alterada dos cromossomos. Em **C**, verifica-se maior grau de alteração. A = 4.375 x; B e C = 4.625 x.

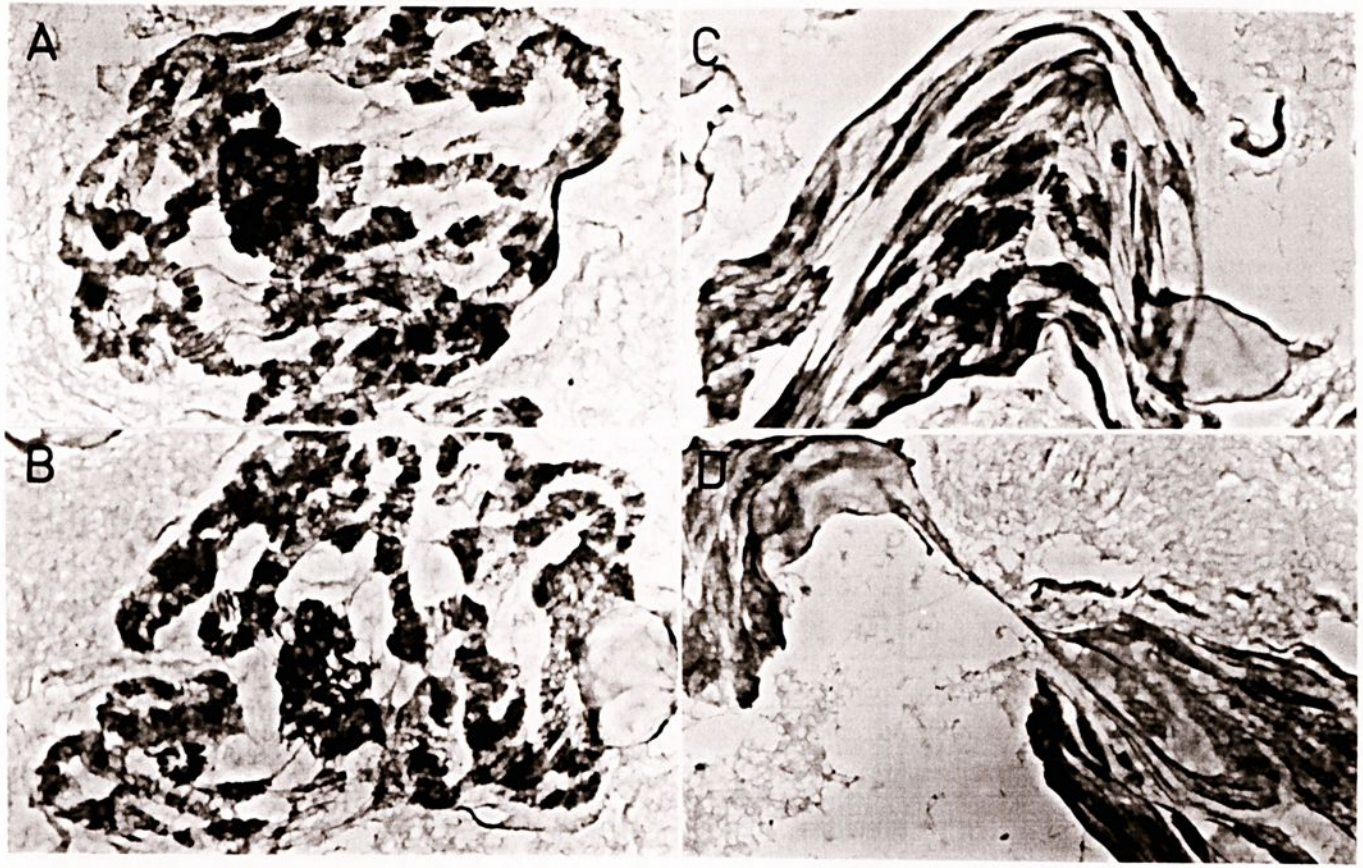


Figura 3 A-D. Pupa média. Orceína lacto-acética. Diferentes graus de alteração da organização estrutural dos cromossomos das glândulas salivares de *D. saltans*. Em **C** e **D**, a organização em bandas que caracteriza os cromossomos politênicos desapareceu completamente, bem como a individualidade dos cromossomos. 3.500 x.

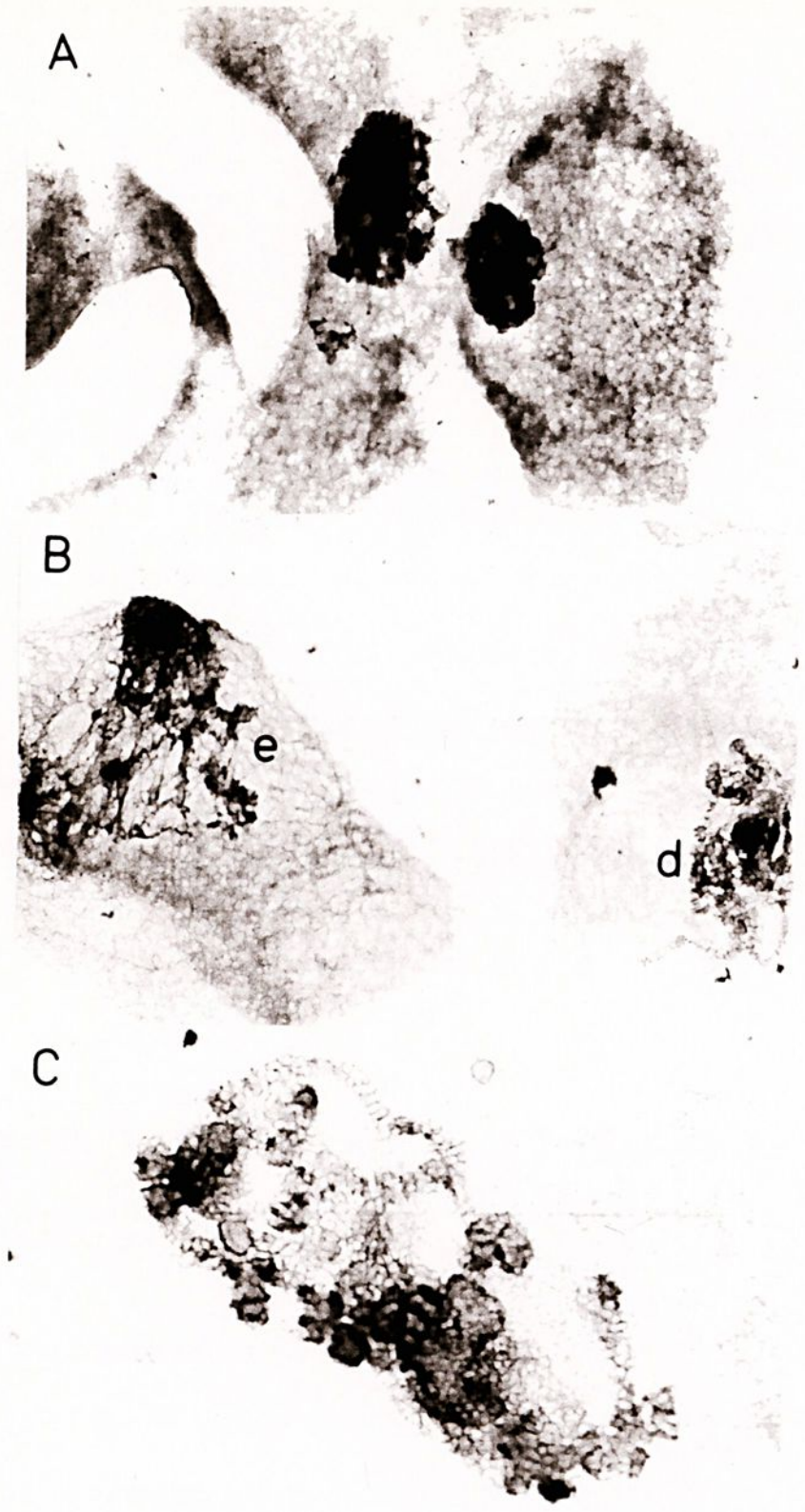


Figura 4 A-C. Pupa média. Nitrato de prata. Em **A**, observar os cromossomos compactados e a presença de vesículas nesses núcleos fechados. Em **B**, cromossomos dissociados e anastomosados (e) ou ainda apresentando algum padrão de bandas em núcleos parcialmente abertos (d). Em **C**, numerosas vesículas são visíveis na massa cromossômica alterada. A e B = 1.750 x; C = 4.375 x.

cromossômicos. Em células bastante alteradas, essas vesículas são muito numerosas e podem estar intercaladas por segmentos cromossômicos compactados (Figuras 4C, 5, 6 e 7). As vesículas são visíveis em lâminas coradas com todas as técnicas utilizadas no presente trabalho.

IV.1.1.3. Padrão de pufes

Os cromossomos politênicos transcrevem seu DNA seguindo um padrão constante para cada tecido, visível através dos pufes. No presente trabalho, a análise dos pufes, nas células das glândulas salivares, restringiu-se às fases de larva de terceiro estádio tardio e pré-pupa. Na fase de pupa média, a grande alteração da estrutura cromossômica dificulta ou mesmo impede a visualização dessas formações. As observações descritas a seguir constam das Figuras 8 a 12.

IV.1.1.3.1. Pufes nos cromossomos politênicos de larvas de terceiro estádio tardio

A análise dos braços cromossômicos na fase de larva de terceiro estádio tardio (L_3T) mostrou a seguinte distribuição de pufes:

- Braço XL: 5 pufes, denominados de XLa a XLe (Figura 8);
- Braço XR: 5 pufes, denominados de XRa a XRe (Figura 9);
- Braço IIL: 5 pufes denominados de IILa a IILe (Figura 10);
- Braço IIR: 3 pufes denominados de IIRa a IIRc (Figura 11);
- Braço III: 5 pufes, denominados de IIIa a IIIe (Figura 12).

IV.1.1.3.2. Pufes nos cromossomos politênicos de pré-pupas

Na fase de pré-pupa (PP) observaram-se modificações no

unesp

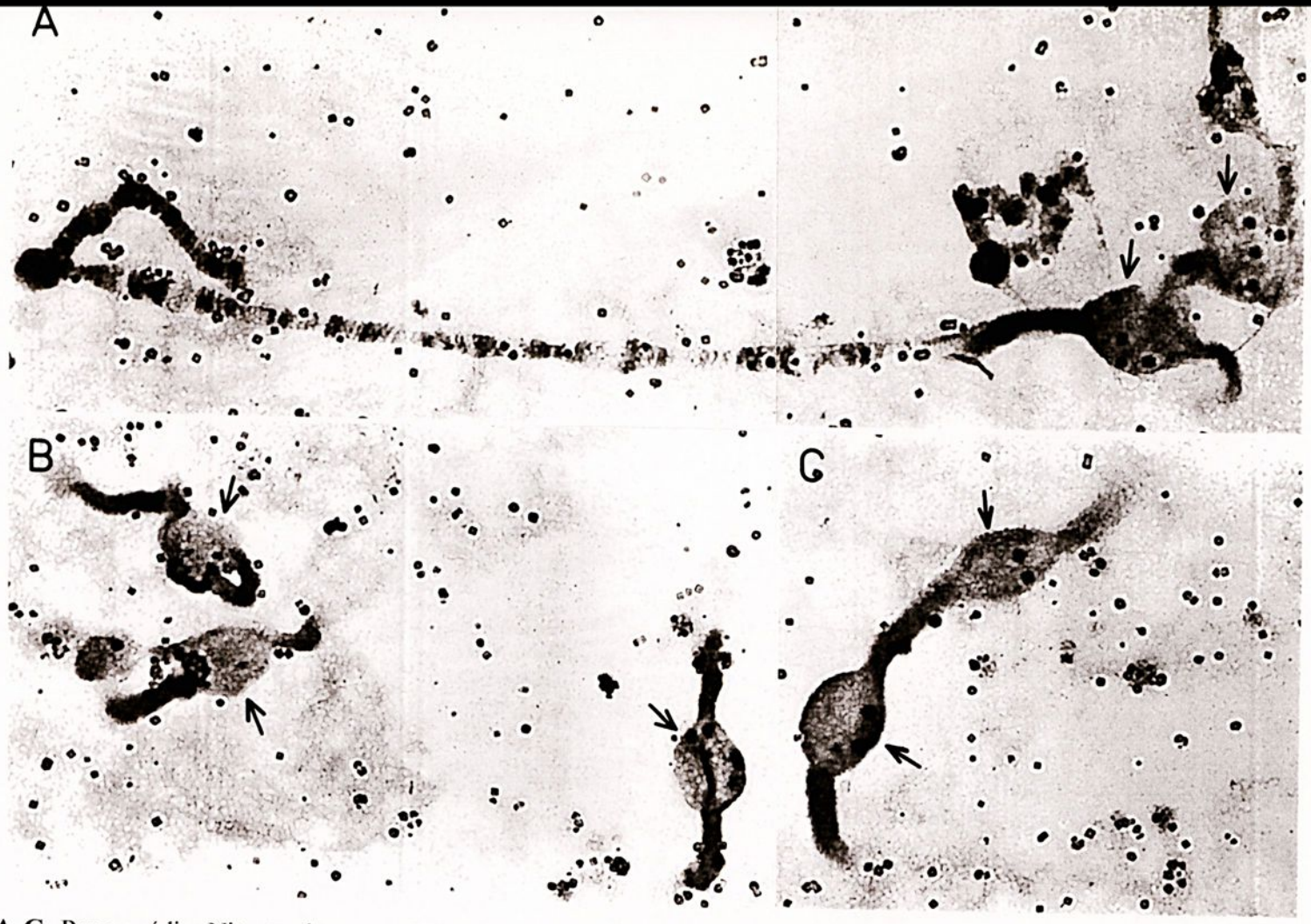


Figura 5 A-C. Pupa média. Nitrato de prata. Vesículas (setas) são visíveis ao longo dos cromossomos, cujos segmentos adjacentes aparecem compactados e bastante corados. A granulação presente nestas fotos é decorrente de artefato de técnica. 4.375 x.

unesp

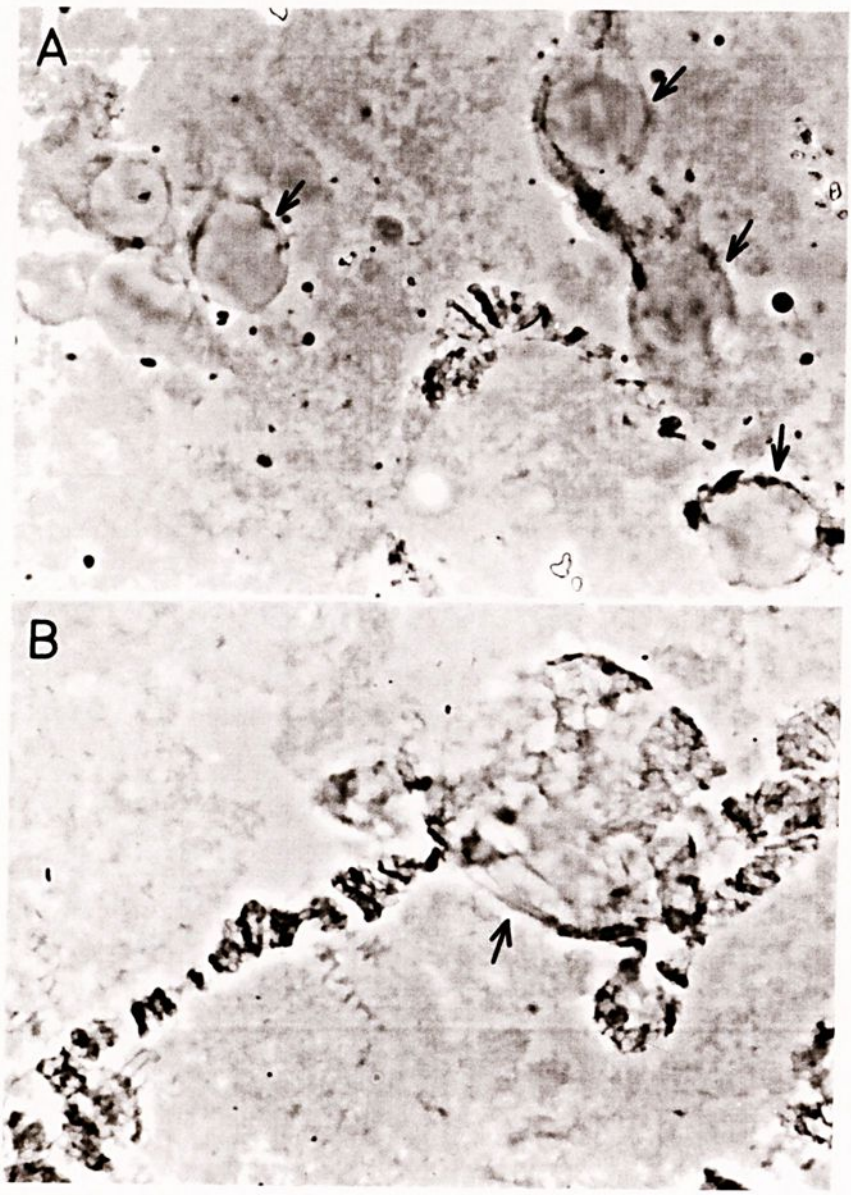


Figura 6 A, B. Pupa média. Orceína lacto-acética. Observação das vesículas (setas) com seu envoltório de material aparentemente cromossômico e alguma diferenciação estrutural no interior. 4.375 x.

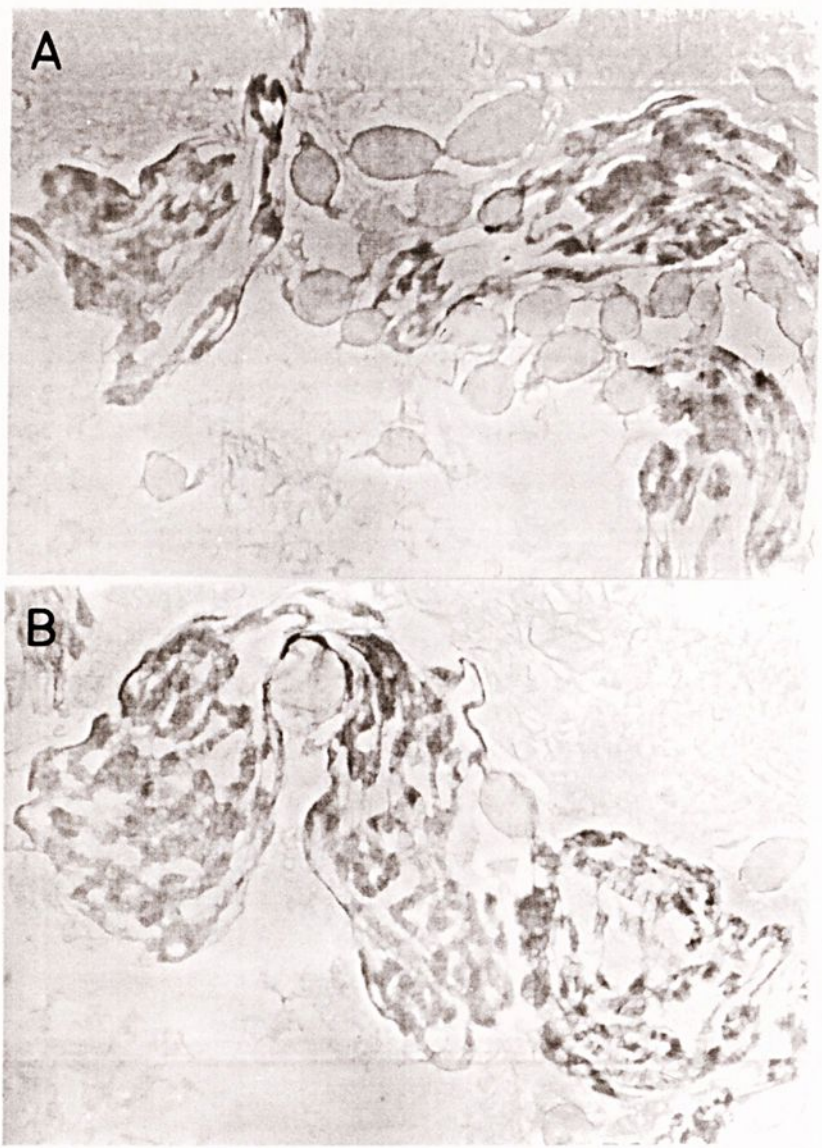


Figura 7 A, B. Pupa média. A coloração com Feulgen marca claramente o envoltório das vesículas e cora, levemente, também seu interior. 1.600 x.

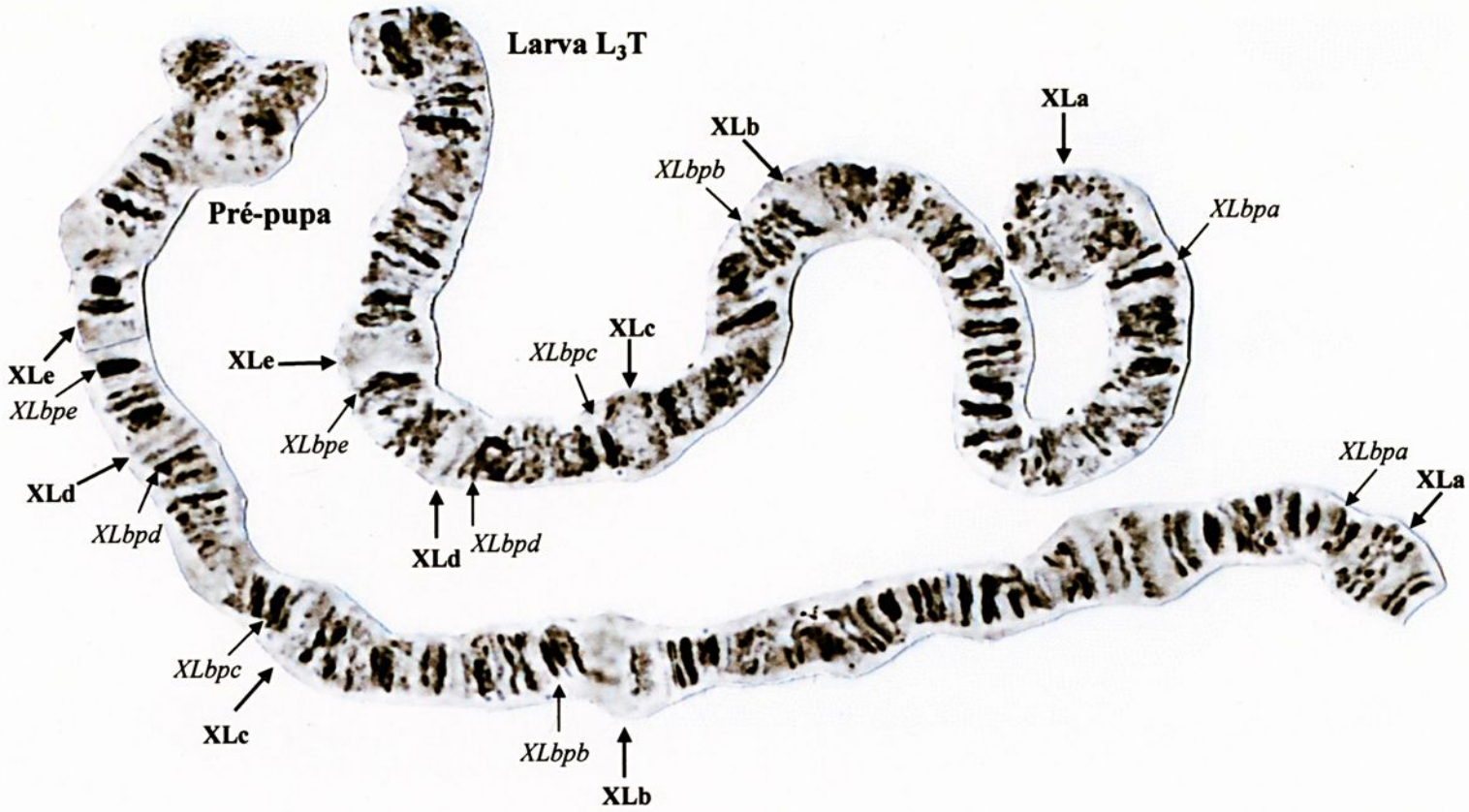


Figura 8. Braço cromossômico XL de larva de terceiro estádio tardio (larva L_3T) e pré-pupa. Observar a presença de cinco pufes em larva L_3T (XLa a XLe) e suas respectivas bandas padrão (*XLbpa* a *XLbpe*). Em pré-pupa, ocorreu a manutenção do pufe XRb, regressão parcial dos pufes XLc e XLe e, reconstituição das bandas do XLa e XLd. Orceína lacto-acética. 4.375 x.

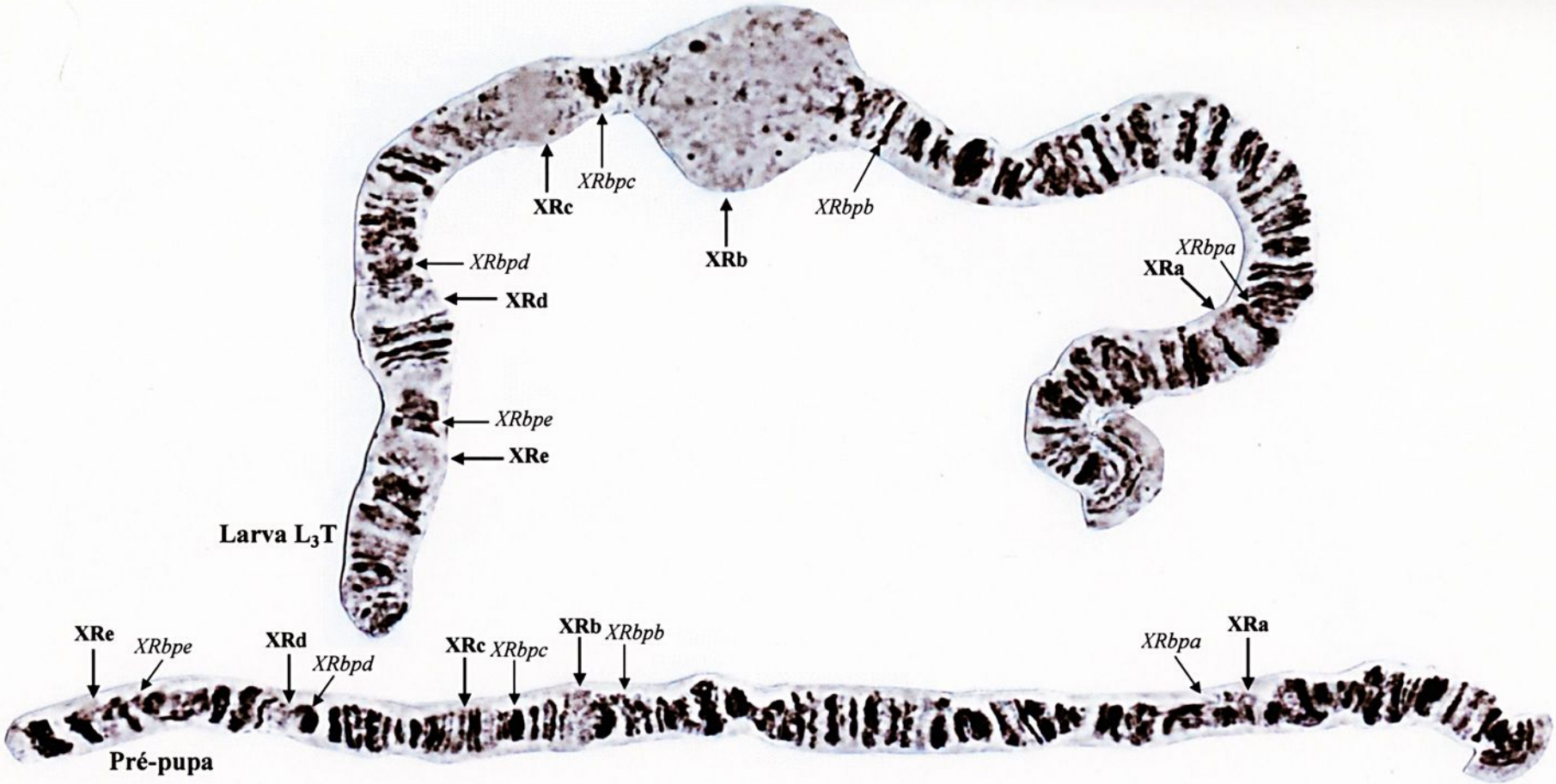


Figura 9. Braço cromossômico XR de larva de terceiro estádio tardio (larva L_3T) e pré-pupa. Observar a presença de cinco pufes em larva L_3T (XRa a XRe) e suas respectivas bandas padrão (*XRbpa* a *XRbpe*). Em pré-pupa, ocorreu a regressão dos cinco pufes observados em larva L_3T. Com exceção do XRb, os outros quatro pufes tiveram as bandas reconstituídas. Orceína lacto-acética. 4.156 x.

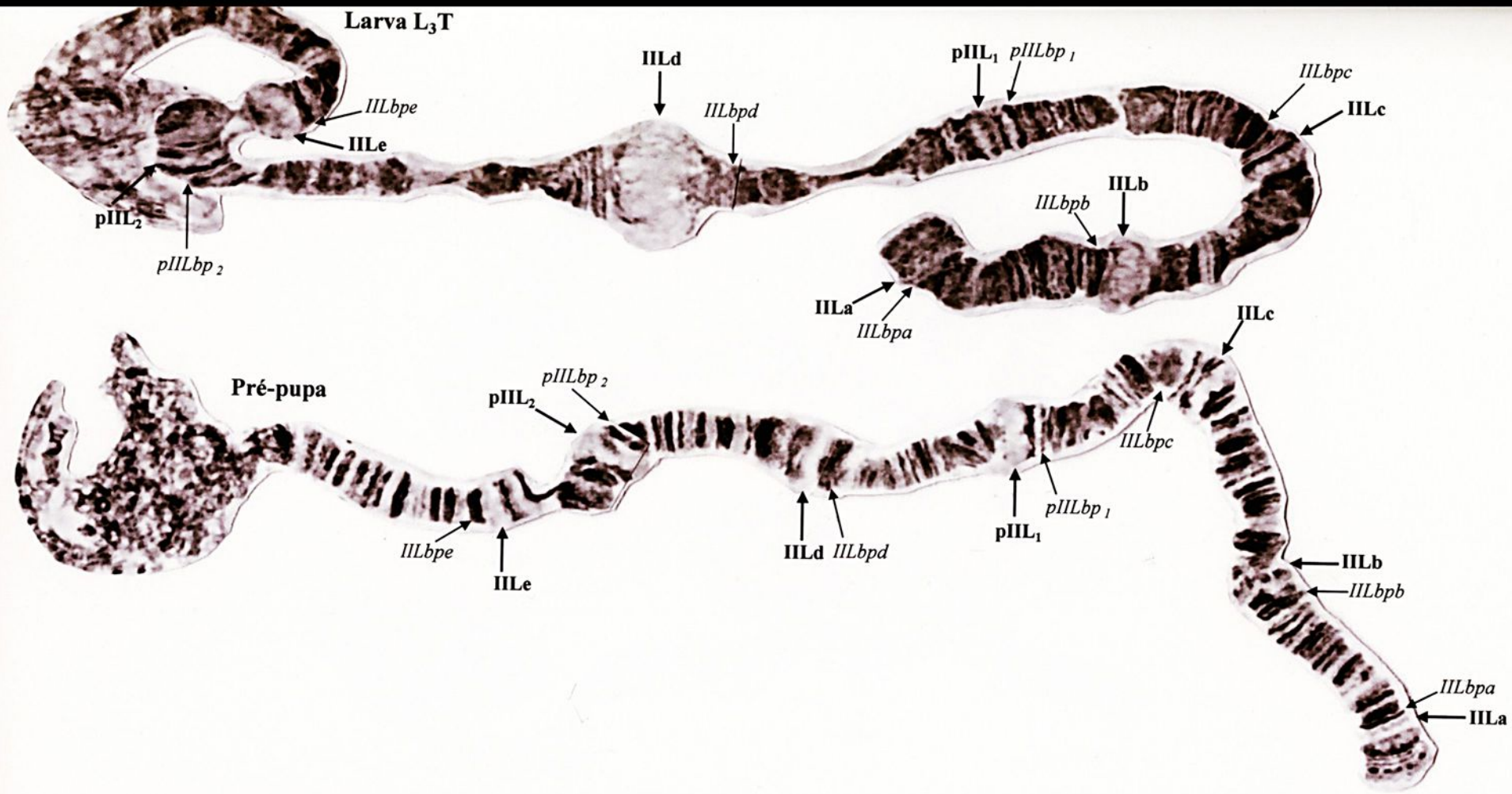


Figura 10. Braço cromossômico IIL de larva de terceiro estádio tardio (larva L_3T) e pré-pupa. Observar a presença de cinco pufes em larva L_3T (IILa a IILe) e suas respectivas bandas padrão (*IILbpa* a *IILbpe*). Em pré-pupa, ocorreu a regressão dos cinco pufes observados em larva L_3T, e dois novos pufes formaram-se: $pIIL_1$ e $pIIL_2$. Orceína lacto-acética. 4.156 x.

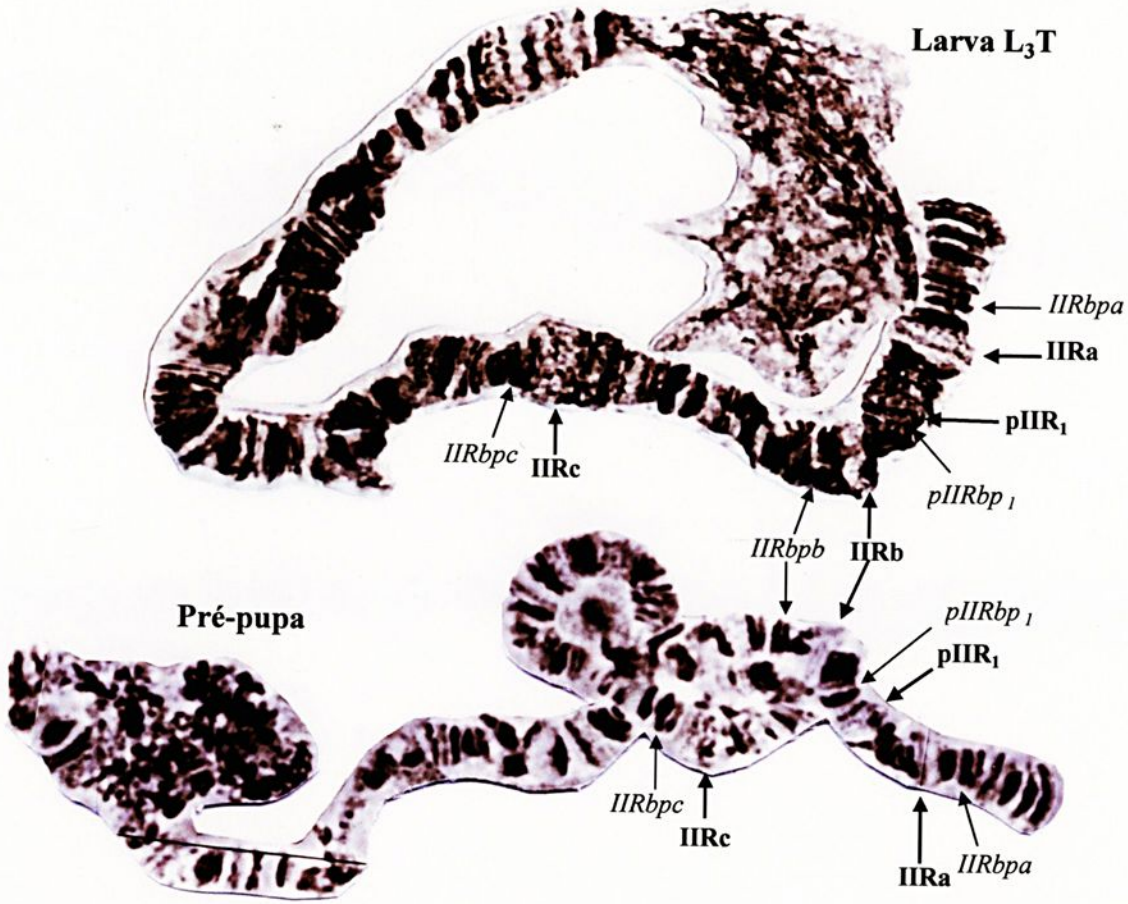


Figura 11. Braço cromossômico IIR de larva de terceiro estádio tardio (larva L_3T) e pré-pupa. Observar a presença de três pufes em larva L_3T (IIRa a IIRc) e suas respectivas bandas padrão (*IIRbpa* a *IIRbpc)*. Em pré-pupa, ocorreu a regressão dos pufes IIRa e IIRc, aumento do pufe IIRb e o aparecimento de um novo pufe nessa fase: $pIIR_1$. Orceína lacto-acética. 4.375 x.

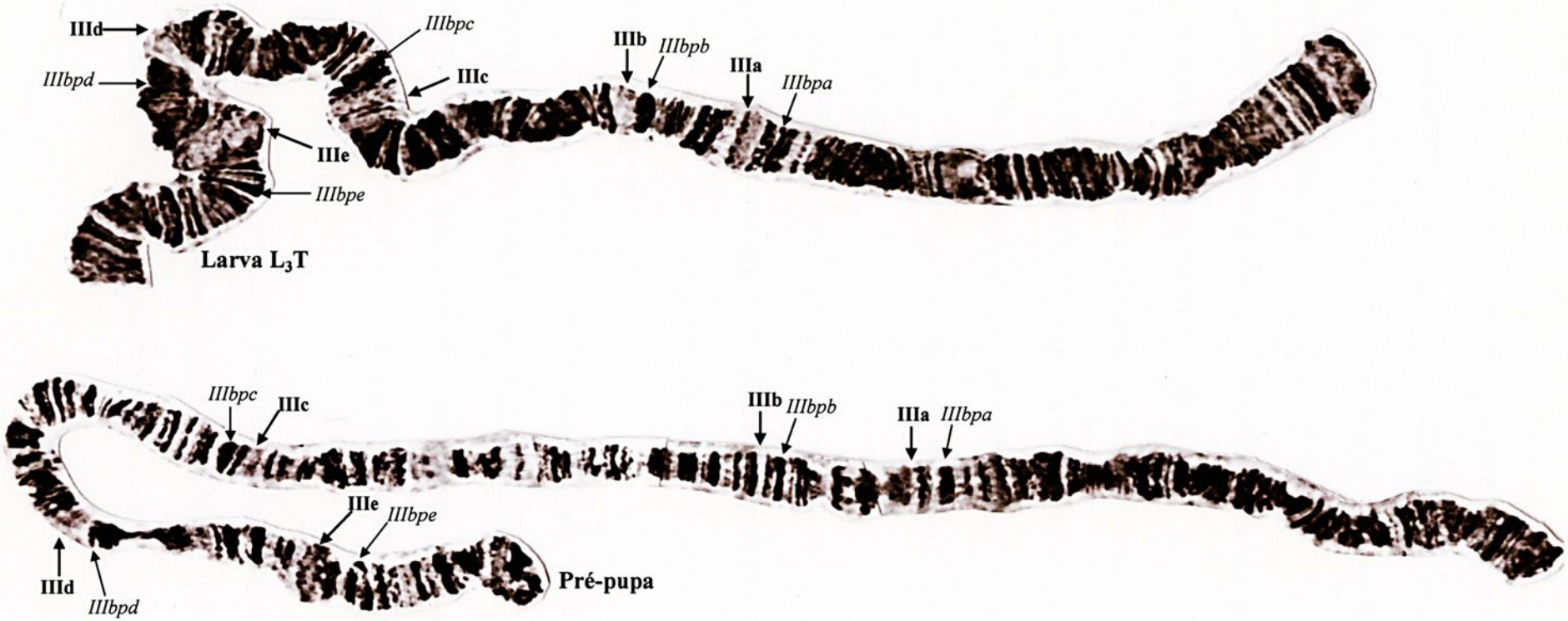


Figura 12. Braço cromossômico III de larva de terceiro estádio tardio (larva L_3T) e pré-pupa. Observar a presença de cinco pufes em larva L_3T (IIIa a IIIe) e suas respectivas bandas padrão (*IIIbpa* a *IIIbpe*). Em pré-pupa, todos os pufes tiveram as bandas reconstituídas. Orceína lacto-acética. 4.156 x.

padrão de pufes, caracterizadas por aparecimento de novos, manutenção dos já existentes com o mesmo diâmetro ou redução do diâmetro (mais freqüentemente) ou ainda reconstituição do padrão de bandas local, significando desaparecimento do pufe. Essas variações são descritas a seguir:

- Braço XL: manutenção do pufe XLb; regressão parcial do XLc e XLe; reconstituição do XLa e XLd (Figura 8);
- Braço XR: regressão dos cinco pufes observados em L_3T, com exceção do XRb, todos reconstituíram suas bandas (Figura 9);
- Braço IIL: regressão dos cinco pufes observados em L_3T, sendo que um (lILb) teve suas bandas reconstituídas. Dois novos pufes formaram-se: $pIIL_1$ e $pIIL_2$ (Figura 10);
- Braço IIR: regressão de dois pufes observados em L_3T e aumento do diâmetro do terceiro (IIRb); aparecimento de um novo pufe: $pIIR_1$ (Figura 11);
- Braço III: os cinco pufes observados em L_3T regrediram, assumindo o aspecto normal das bandas (Figura 12).

A avaliação da alteração dos pufes foi baseada em medidas dos diâmetros dos pufes tomadas em relação ao diâmetro de uma banda próxima, considerada padrão para cada pufe (pufe/banda padrão), nas duas fases do desenvolvimento analisadas. Os dados obtidos constam da Tabela 2 e mostram as variações já descritas.

Um único pufe detectado em L_3T aumentou o diâmetro na fase PP, o IIRb, e três novos pufes surgiram no cromossomo II, sendo dois no braço IIL e um no braço IIR. Dois pufes observados em L_3T destacaram-se pelo enorme

Tabela 2. Medidas do diâmetro dos pufes, tomado em relação a uma banda padrão (bp) para cada pufe, em larvas de terceiro estádio tardio (L_3T) e pré-pupa (PP).

		Relação pufe/bp	
Braço	Pufe	L_3T	PP
XL	XLa	1,88	1,57*
	XLb	1,57	1,57
	XLc	2,00	1,83
	XLd	1,57	1,33*
	XLe	1,62	1,50
XR	XRa	1,43	1,25*
	XRb	4,12	1,42
	XRc	1,86	1,40*
	XRd	2,00	1,00*
	XRe	1,57	1,16*
IIL	IILa	1,62	1,37
	IILb	1,44	1,11*
	IILc	1,83	1,71
	$pIIL_1$	1,12	1,33
	IILd	4,60	1,20
	$pIIL_2$	1,44	1,62
	IILe	1,37	1,33
IIR	IIRa	1,83	1,80
	$pIIR_1$	1,14	1,60
	IIRb	1,37	2,00
	IIRc	1,83	1,50
III	IIIa	1,22	1,00*
	IIIb	1,28	1,00*
	IIIc	1,50	1,00*
	IIId	1,57	1,00*
	IIIe	1,63	1,37*

* Bandas reconstituídas.

diâmetro atingido: XRb e IILd, cujas medidas atingiram valores superiores a quatro.

IV.1.2. NUCLÉOLO

IV.1.2.1. Características do nucléolo em larvas de terceiro estádio tardio

Nesse estádio do desenvolvimento, as células das glândulas salivares de *D. saltans*, mostram um único nucléolo, que se impregna intensamente pelo nitrato de prata e cuja forma é aproximadamente arredondada ou ovalada (Figura 13). Raramente, ocorrem corpúsculos adicionais (Figura 13C).

O nucléolo, impregnado com nitrato de prata e observado em microscopia de luz, em grande aumento, mostra estrutura bastante heterogênea, constituindo-se de massas de grânulos e filamentos, separadas por regiões menos densas, e vacúolos (Figura 14).

Freqüentemente, pode-se ver, no interior do nucléolo, um corpúsculo arredondado que se destaca pela intensidade de impregnação e aparece isolado ou associado a uma rede aparentemente constituída pela cromatina associada ao nucléolo, principalmente visível em lâminas observadas sem contraste de fase (Figura 14C, D).

A técnica de impregnação pelo nitrato de prata não cora especificamente as regiões organizadoras nucleolares (RONs) dos cromossomos mitóticos de *Drosophila*, o que dificulta a identificação das mesmas. Morfologicamente, então, estabelece-se a RON pela associação do nucléolo a regiões cromossômicas (Figuras 15 e 16). No presente trabalho, o nucléolo apresenta associação variável aos cromossomos politênicos, mas,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

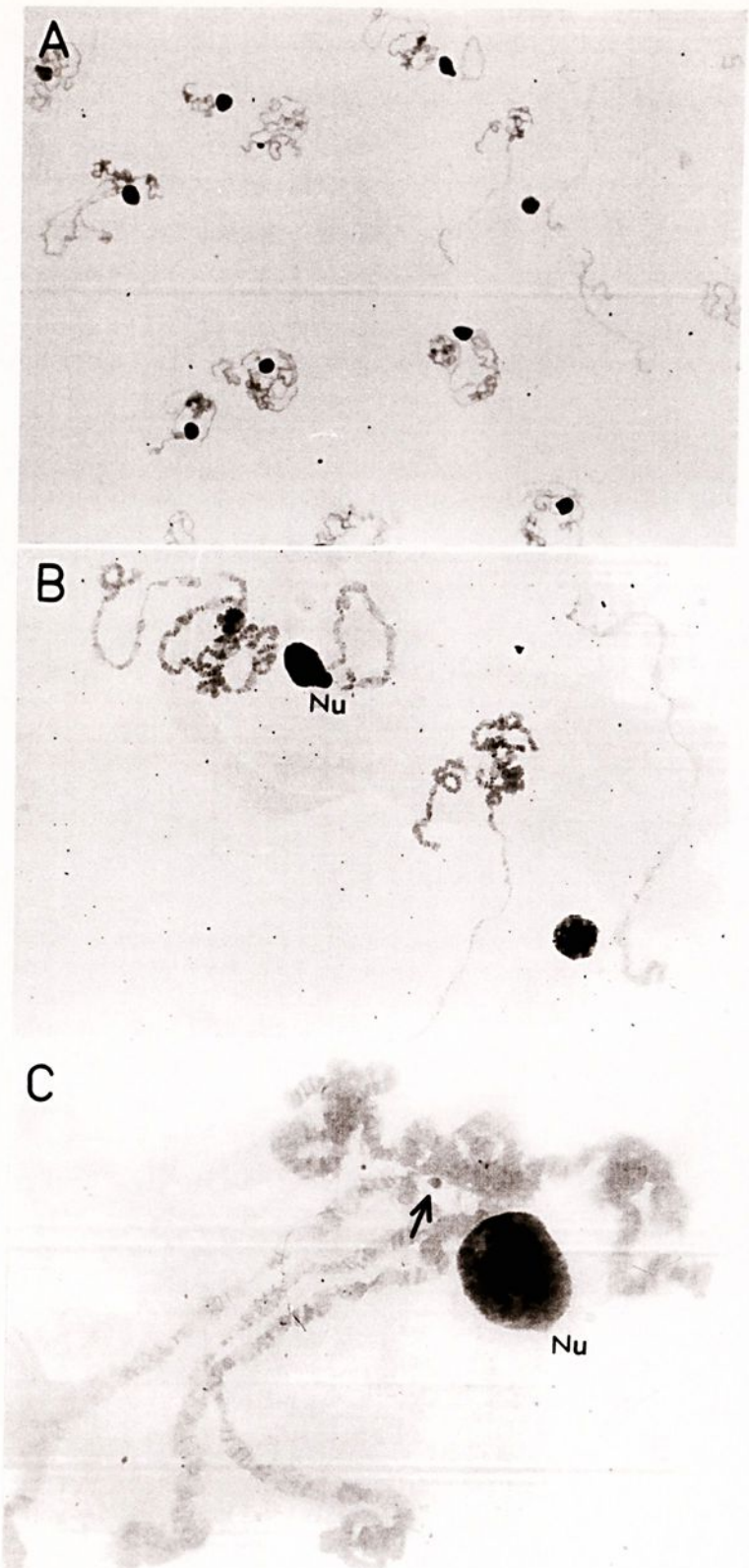


Figura 13 A-C. Larva de terceiro estádio tardio. Nitrato de prata. Em **A**, vários núcleos com os cromossomos e os nucléolos bem delimitados. Neste estádio, cada célula normalmente possui nucléolo único, aproximadamente arredondado ou ovalado. Em **C**, a seta aponta corpúsculo nucleolar adicional. Nu = nucléolo. A = 275,6 x; B = 640 x e C = 1.600 x.

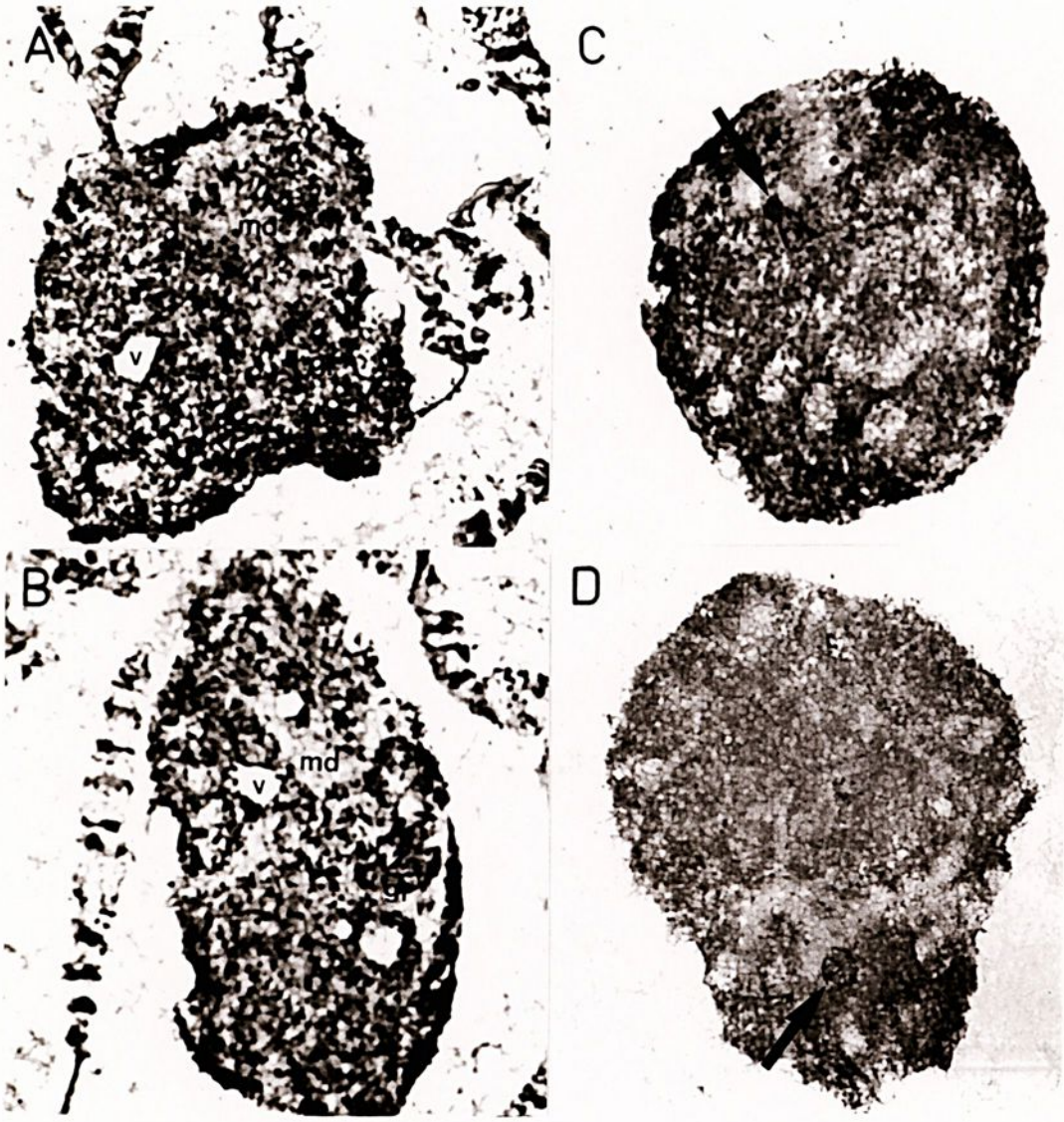


Figura 14 A-D. Larva de terceiro estádio tardio. Nitrato de prata. Observações sobre a estrutura do nucléolo constituída de grânulos e filamentos (gf), regiões menos densas (md) e vacúolos (v). Em **C** e **D**, observa-se um corpúsculo (seta) corado mais fortemente. A-C: contrate de fase; D: iluminação normal. 3.875 x.

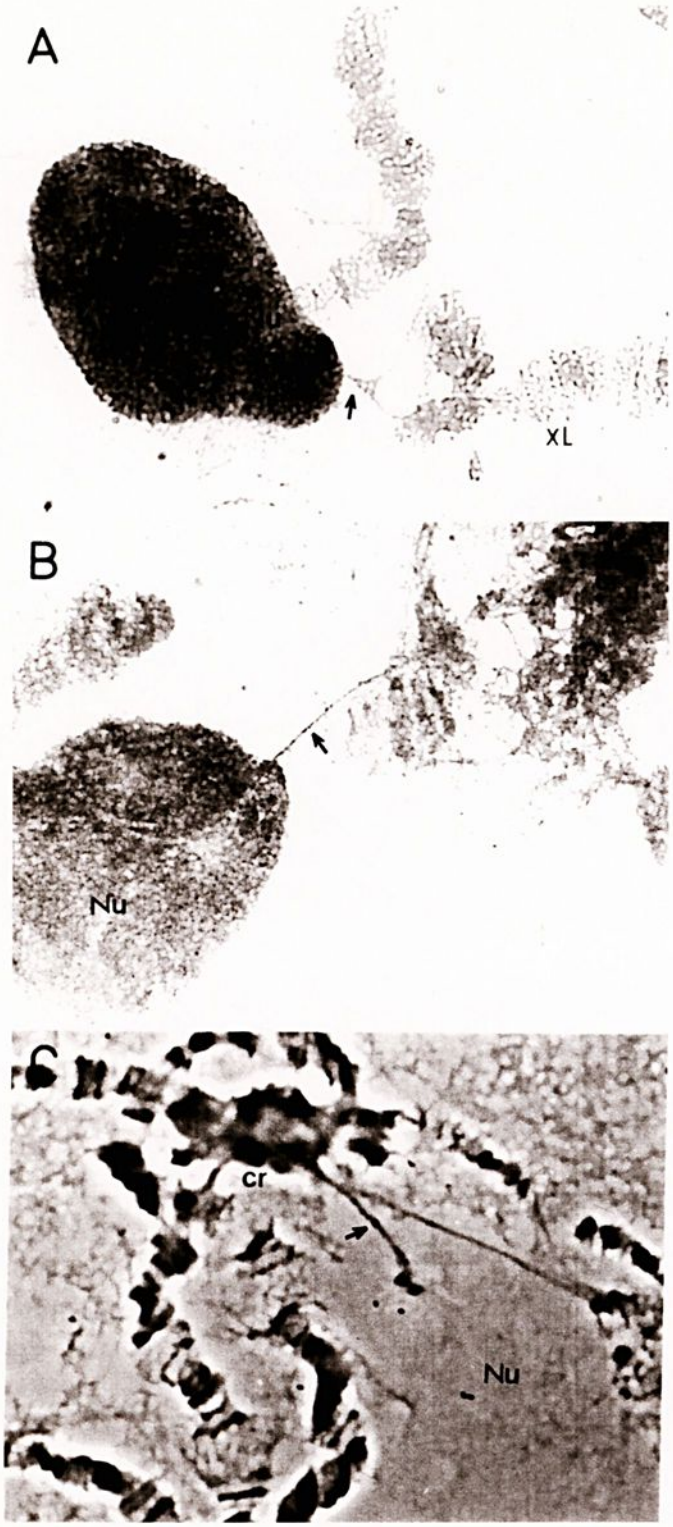


Figura 15 A-C. Larva de terceiro estádio tardio. A e B: Nitrato de prata. C: Feulgen. **A**: associação do nucléolo (Nu) à região proximal do braço XL. **B** e **C**: associação do nucléolo ao cromocentro (cr). Em todas as fotos, o nucléolo se associa aos cromossomos por meio de filamentos cromatínicos, que nele penetram (setas). Nu = nucléolo. A = 4.000 x; B e C = 4.375 x.



Figura 16 A, B. Larva de terceiro estádio tardio. Orceína lacto-acética. Associação do nucléolo à região proximal do braço XL (**A**) ou ao XR (**B**) (setas). Nu = nucléolo, cr = cromocentro. 4.250 x.

predominantemente, observa-se essa associação com a região do cromocentro (Figura 15B, C). E quando, por pressão no preparo da lâmina, o par de cromossomos X se separa dos demais cromossomos, o nucléolo aparece associado à sua região centromérica. Às vezes, esse organóide parece ligar-se à região proximal do braço XL (Figuras 15A e 16A), e outras vezes, à região proximal do braço XR (Figura 16B).

IV.1.2.2. Alterações do nucléolo em pupas jovens e pupas médias

O nucléolo foi analisado também nas fases de pupa jovem e pupa média, em lâminas impregnadas com nitrato de prata. O padrão de impregnação do material nucleolar, nessas fases, altera-se, assumindo aspectos variados (Figuras 17 a 21). Embora em algumas células ainda seja possível ver o nucléolo como uma estrutura delimitada, especialmente quando observado nos menores aumentos (Figura 17A), na maioria, o padrão de impregnação é irregular dentro do nucléolo, o que se torna claro nas observações com aumento usando objetiva de 40x ou mais. O contorno torna-se difuso, aparentando um "espalhamento" do nucléolo e a impregnação não atinge toda a massa aparentemente nucleolar (Figura 17B, C). Essas irregularidades se acentuam com o avanço do desenvolvimento, até a não mais visualização do nucléolo.

Na fase de pupa, mesmo antes da eversão da cabeça (pupa jovem), os núcleos fechados, isto é, não rompidos pelo esmagamento, mostram amplas regiões impregnadas pela prata que, examinadas em maiores detalhes, podem apresentar uma distribuição difusa ou em aspecto de rede, recobrindo

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

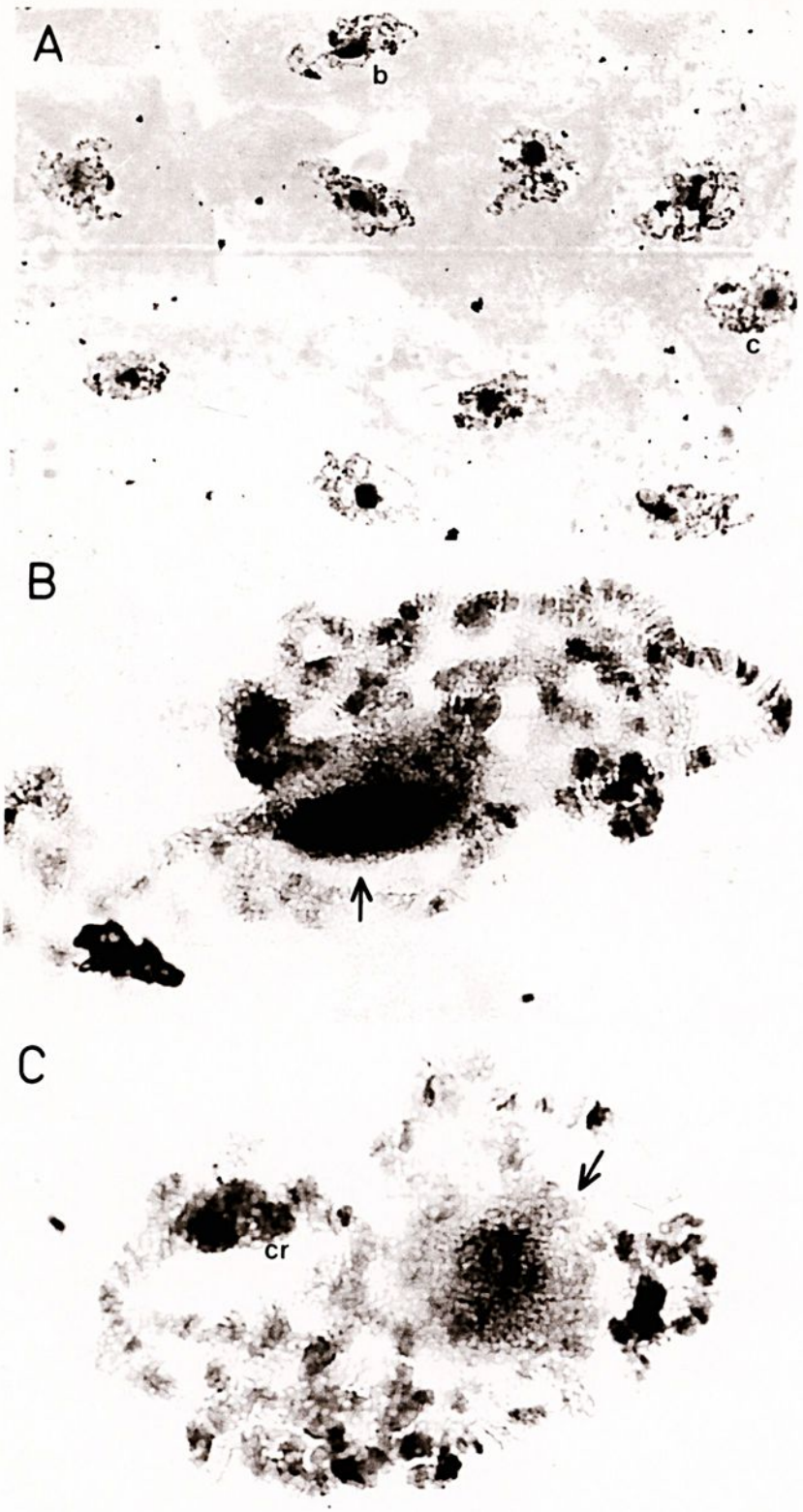


Figura 17 A-C. Pupa jovem. Nitrato de prata. O formato do nucléolo e o padrão de impregnação já se mostram alterados em relação à larva de terceiro estádio tardio. Em **A**, observam-se várias células com nucléolo aparentemente delimitado. Em aumento maior (**B**, **C**), observa-se a impregnação parcial da estrutura nucleolar e seu contorno "difuso" (setas). A = 275,6 x; B e C = 4.375 x.

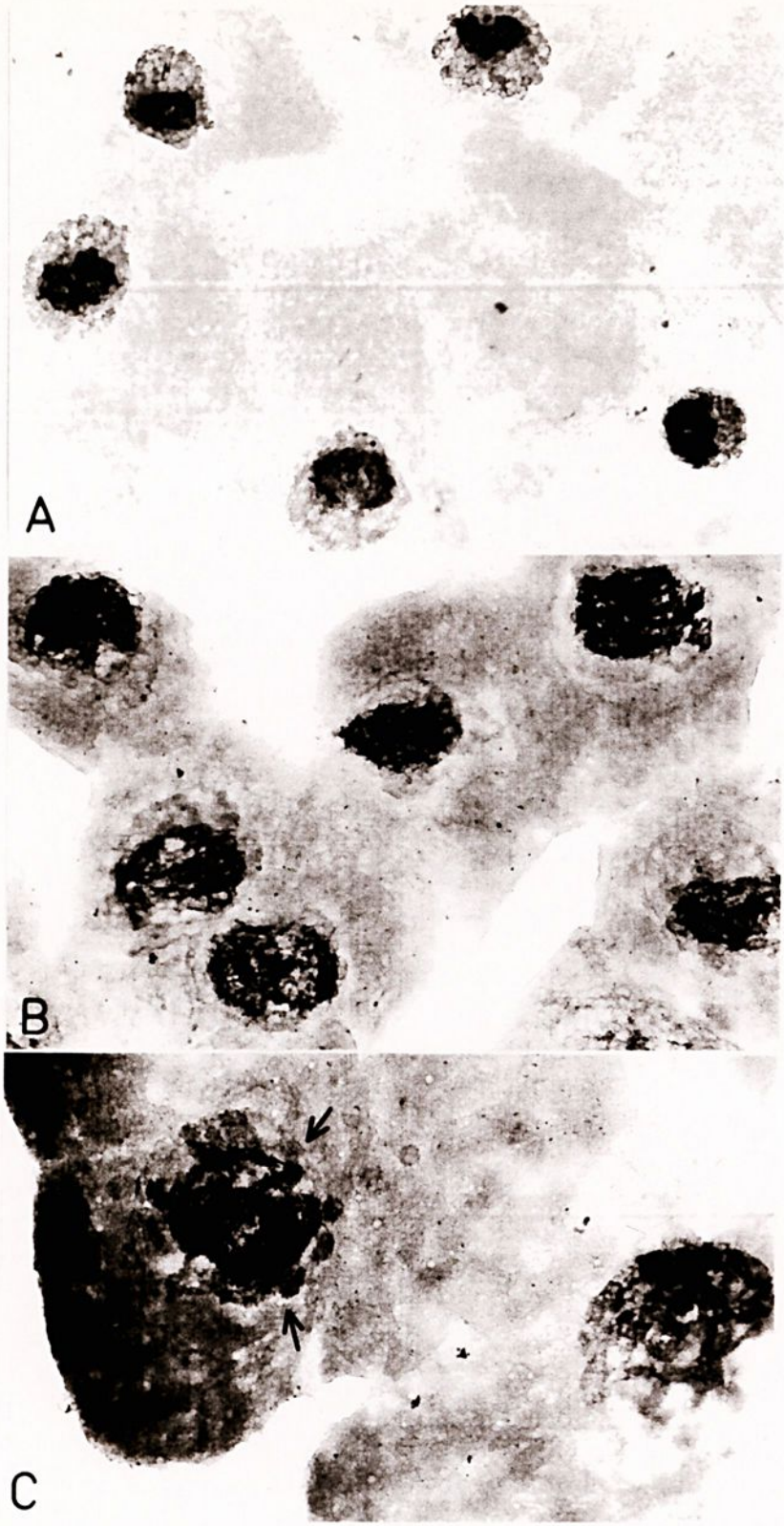


Figura 18 A-C. Pupa jovem. Outros aspectos do padrão de impregnação pelo nitrato de prata. Em **A**, as células apresentam uma ampla região nuclear impregnada. Em **B**, mostrando outras células com aumento maior, essa região apresenta um aspecto em rede sobre grande parte do material nuclear. Em **C**, nota-se a presença de um material diferenciado (talvez regiões cromossômicas) no interior do núcleo (setas), preenchendo o espaço entre o material impregnado e o envoltório nuclear. A = 700 x; B e C = 1.750 x.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

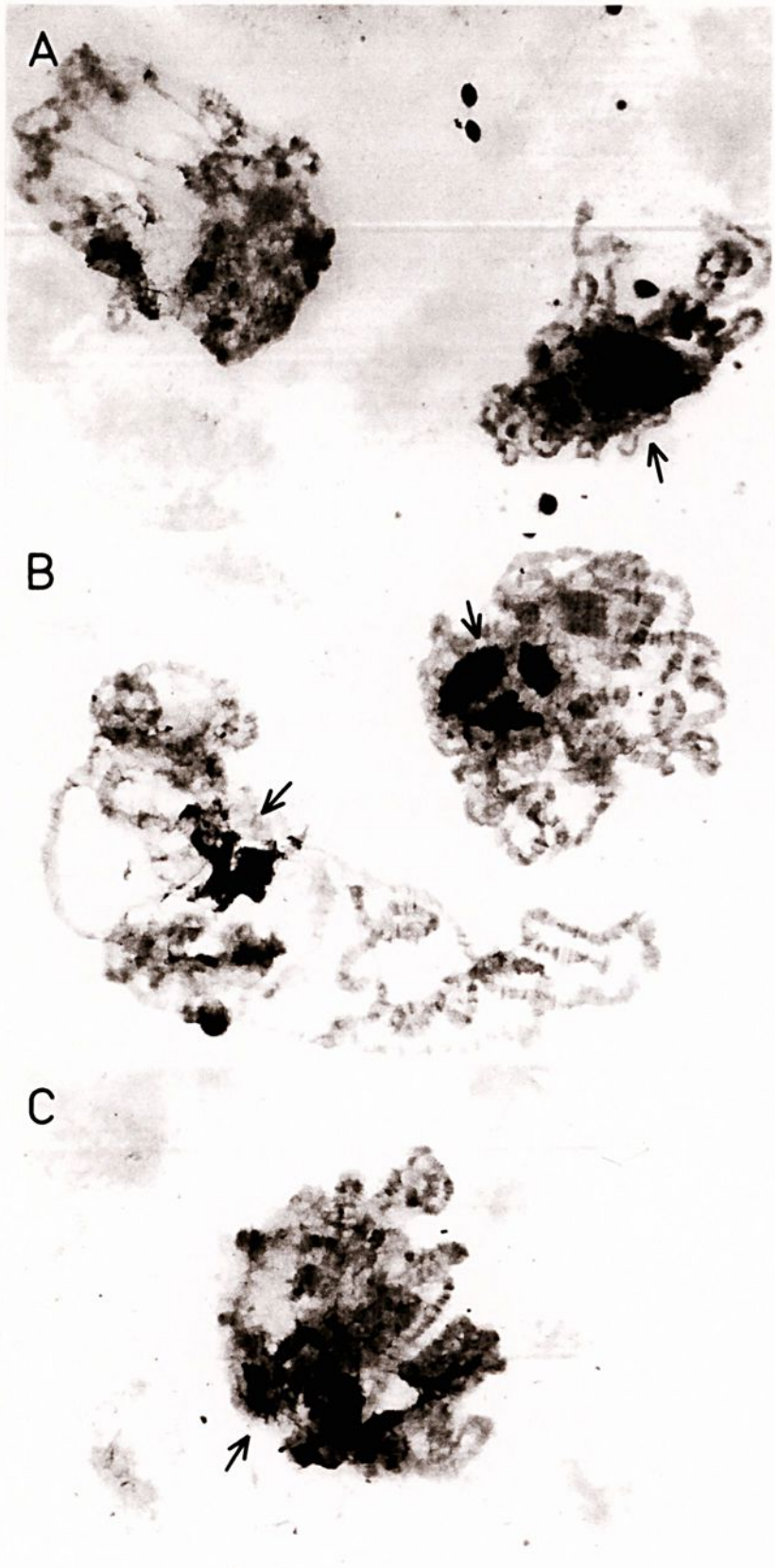


Figura 19 A-C. Pupa jovem. Nitrato de prata. Observar as massas de material nucleolar impregnadas (setas), com distribuição irregular sobre e entre os cromossomos, que também mostram alteração estrutural. 1.700 x.

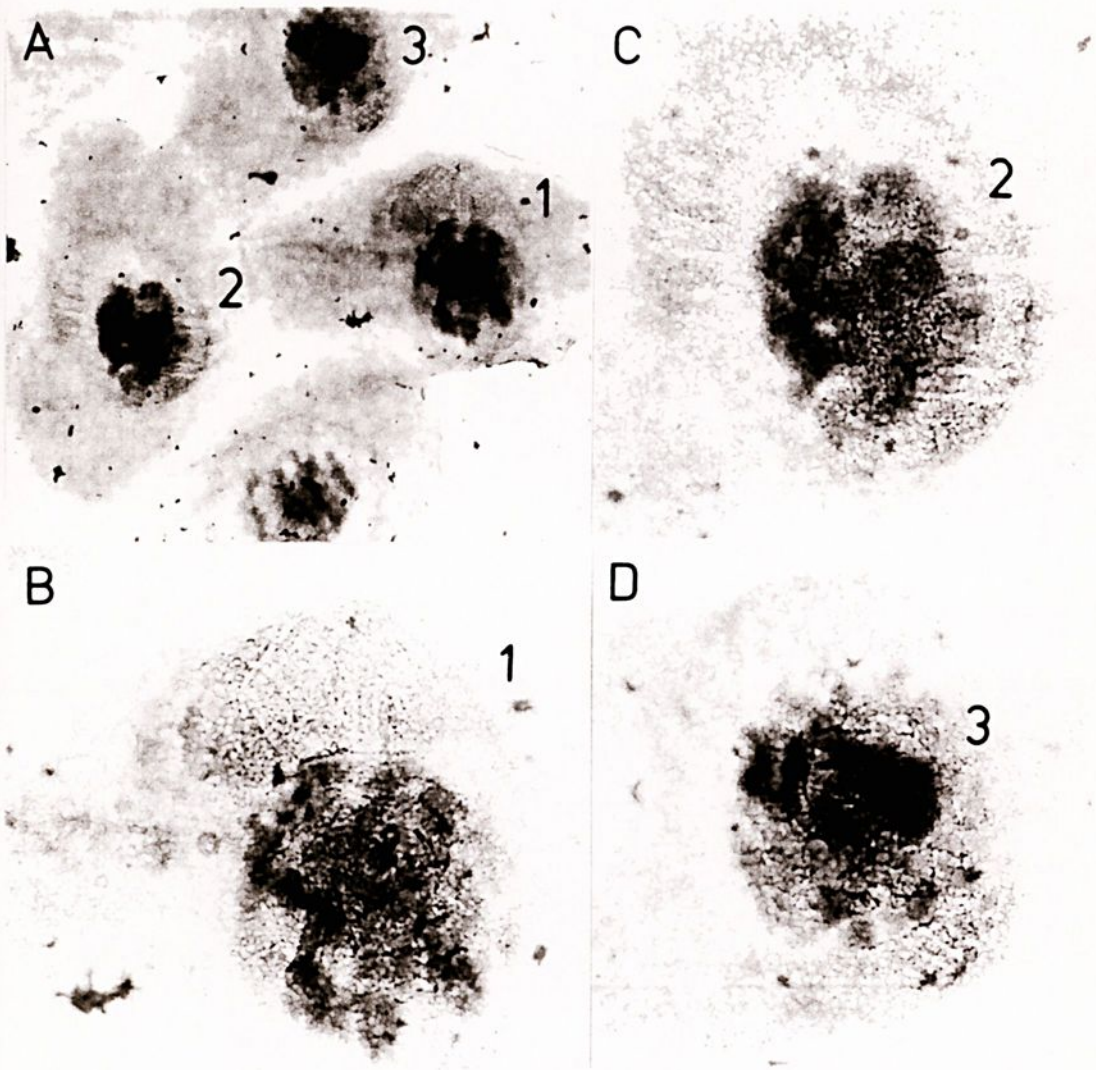


Figura 20 A-D. Pupa jovem. Nitrato de prata. Em **A**, observa-se uma região de estrutura diferenciada no interior do núcleo, no contorno da massa formada pelos cromossomos mais o material nucleolar. Em **B**, **C** e **D**, as mesmas células são vistas em maior aumento, e mostram detalhes do que parecem ser canalículos ou filamentos, formando "riscas" brancas, parcialmente paralelas ou intercruzadas, na periferia do núcleo. Em **C**, **D**, observam-se as vesículas no interior do núcleo. A = 1.600 x; B, C e D = 4.000 x.

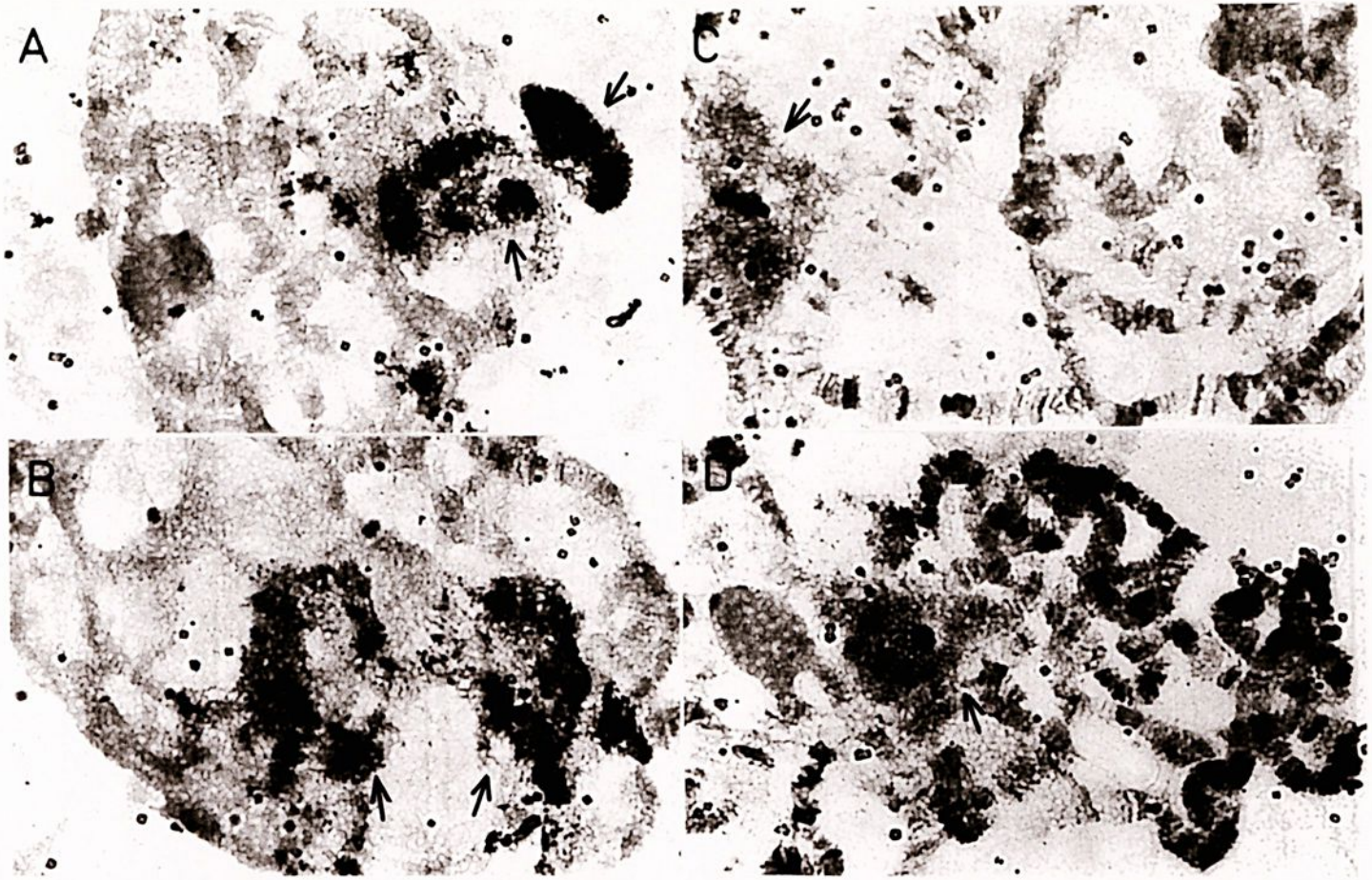


Figura 21 A-D. Pupa média. Nitrato de prata. Verificar as alterações no padrão de coloração do material nucleolar (setas). A granulação presente nestas fotos é decorrente de artefato de técnica. 4.375 x.

grande parte do material cromossômico (Figuras 18 e 19).

À medida que a pupa envelhece, a quantidade de material impregnado torna-se menor e mais difusamente distribuída sobre o conjunto cromossômico que também já está alterado. Em algumas células verificou-se, no interior do núcleo, a presença de uma estrutura organizada, com riscas parcialmente paralelas, localizadas no contorno da massa formada pelos cromossomos e o material impregnado pela prata (Figura 20A-D).

Na fase de pupa média, mais avançada, quando a glândula já está em fase de desaparecimento, geralmente obtém-se apenas fragmentos de glândula, que são analisados. Nesta fase, o material impregnado pela prata mostra-se disperso, completamente diferente da organização descrita para larvas de terceiro estádio tardio, onde o nucléolo é bem delimitado e sua forma é aproximadamente arredondada ou ovalada. Em muitas células, a quantidade de material impregnado é muito pequena, e parece localizar-se sobre bandas dos cromossomos alterados estruturalmente (Figuras 21 e 22).

IV.1.3. CROMOCENTRO

IV.1.3.1. Caraterísticas do cromocentro em larvas de terceiro estádio tardio

A associação das regiões centroméricas dos três pares de cromossomos de *D. saltans* forma o cromocentro, cuja estrutura não mostra a organização em bandas e interbandas, que ocorre ao longo dos cromossomos politênicos. A Figura 23 confirma a natureza heterocromática do cromocentro devido à intensa coloração com a técnica de bandamento C, específica para esse tipo de cromatina. Na coloração com orceína lacto-acética, em larvas de terceiro

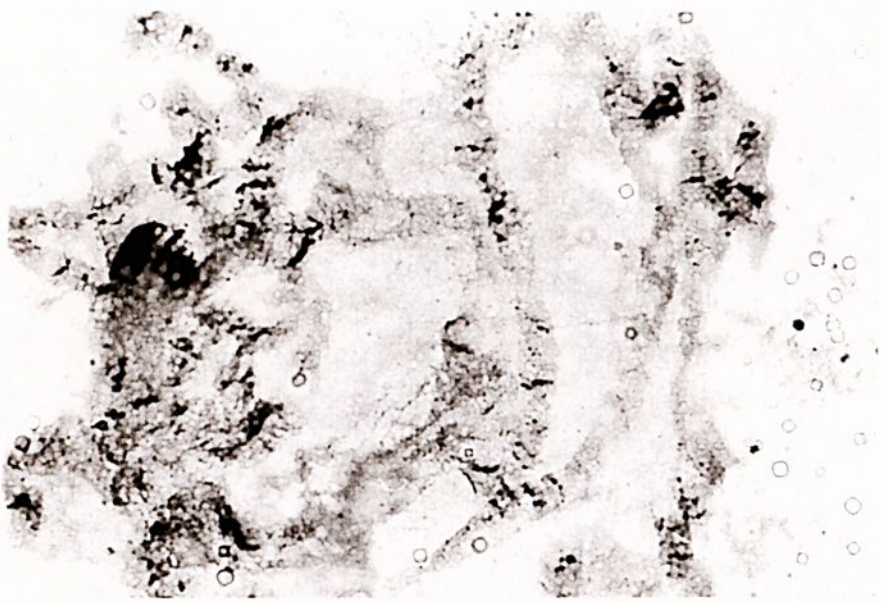


Figura 22. Pupa média. Nitrato de prata. Padrão de impregnação bastante alterado em relação aos estádios anteriores. Marcações esparsas em bandas cromossômicas e outras regiões formadas por cromossomos anastomosados. 4.375 x.

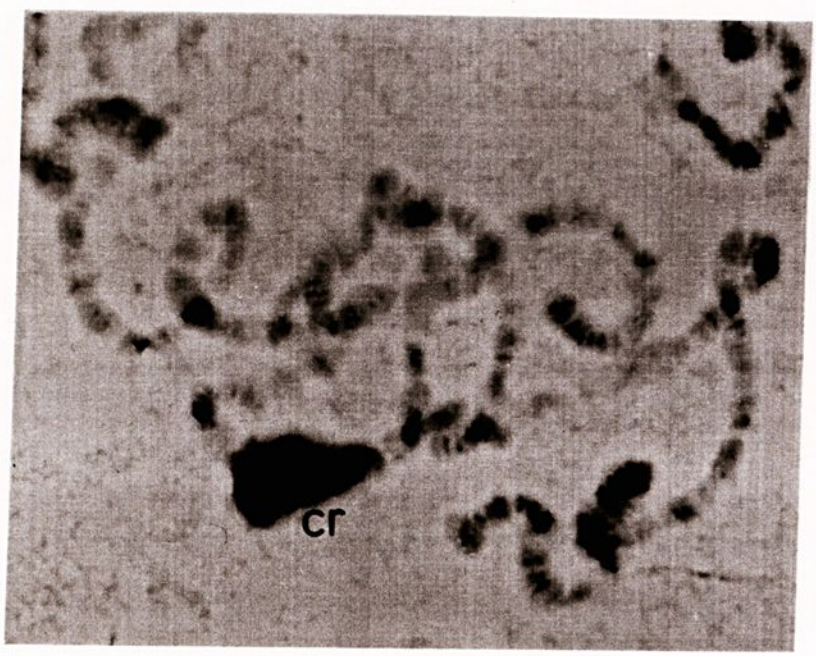


Figura 23. Larva de terceiro estádio tardio. Bandamento C. Observar a região do cromocentro (cr), fortemente marcada, indicando sua constituição heterocromática. 4.325 x.

estádio tardio, o cromocentro aparece intensamente corado, sendo possível observar, freqüentemente, no seu interior, um corpúsculo de tamanho variável e coloração mais intensa (Figura 24A, B e C). Em algumas células observou-se também uma espécie de vacúolo no cromocentro (Figura 24D). O corpúsculo mencionado cora-se também com a técnica de Feulgen, para coloração específica do DNA (Figura 25) e com nitrato de prata (Figura 26).

IV.1.3.2. Caraterísticas do cromocentro em pupas jovens e pupas médias

Em cromocentros analisados em fases mais adiantadas do desenvolvimento, não conseguimos visualizar o corpúsculo diferenciado. A análise do cromocentro em pupas mostra que este se torna aparentemente mais homogêneo, como mostra a Figura 27, em que o material foi submetido à coloração com nitrato de prata.

IV.1.4. CITOPLASMA

IV.1.4.1. Aspectos do citoplasma das glândulas salivares, no desenvolvimento

Em larvas de terceiro estádio tardio, o citoplasma das glândulas salivares, geralmente é pobre de granulações ou outras estruturas, visíveis na microscopia de luz. À medida que o desenvolvimento prossegue, porém, as células passam a apresentar grânulos de natureza e tamanhos variados, que vão se tornando maiores e mais numerosos (Figura 28). Alguns têm o aspecto de vesículas, com conteúdo variado, formado por lâminas paralelas ou grânulos e filamentos sem organização definida (Figura 29).

Vacúolos também estão presentes, em tamanho variável, sugerindo freqüentemente uma união formando vacúolos maiores. Nessas células,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

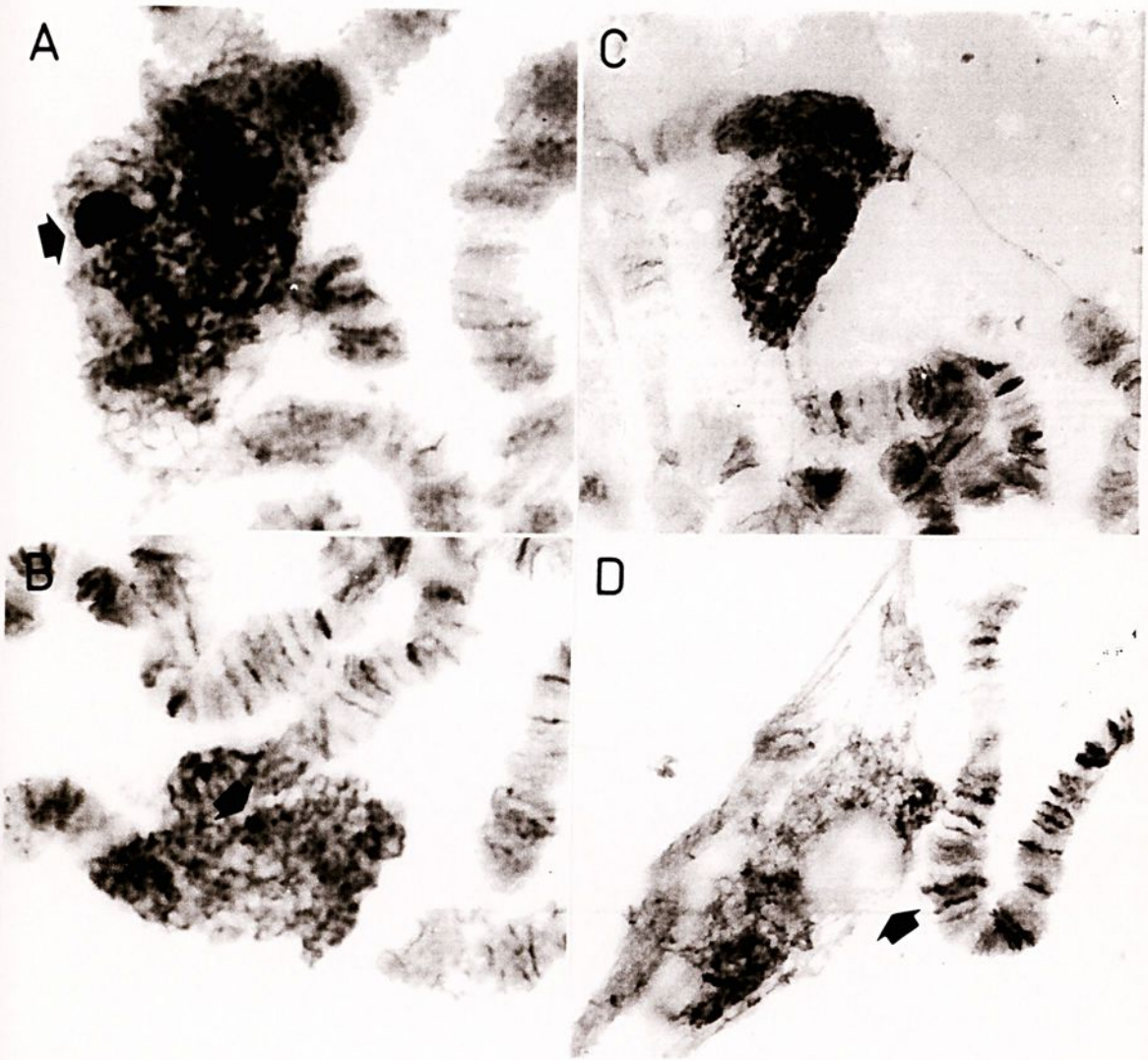


Figura 24 A-D. Larva de terceiro estádio tardio. Orceína lacto-acética. Em **A-C**, observar a presença de um corpúsculo escuro (setas) no interior do cromocentro e em **D** um vacúolo claro (seta). 4.625 x.

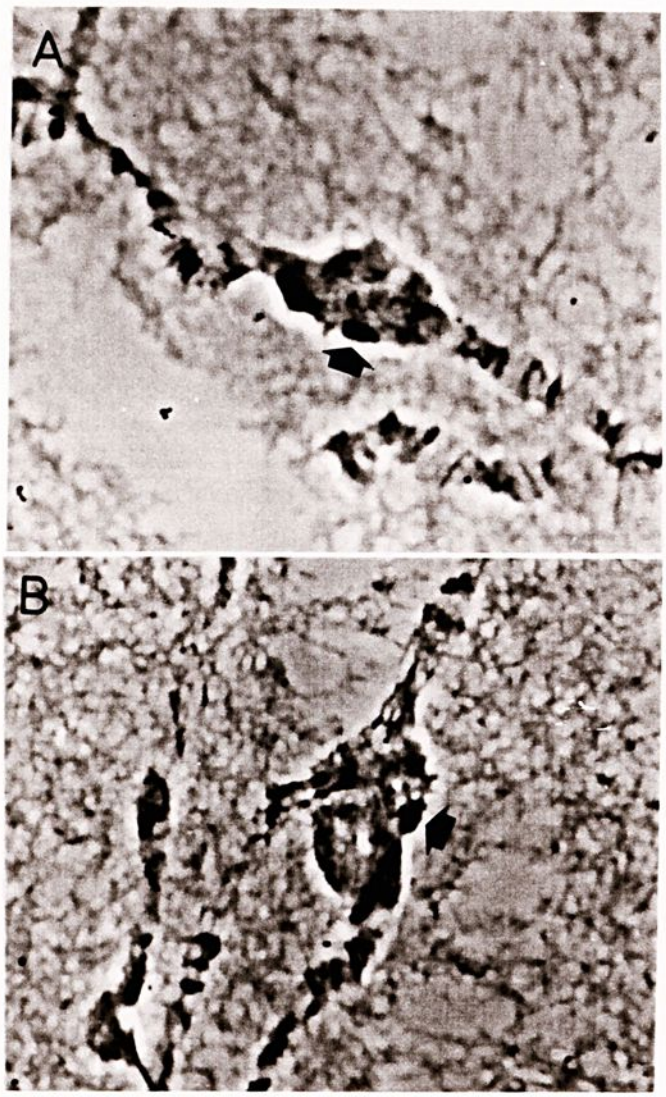


Figura 25 A, B. Larva de terceiro estádio tardio. Feulgen. Observação do cromocentro e de um corpúsculo mais fortemente corado, no seu interior (setas). 4.000 x.

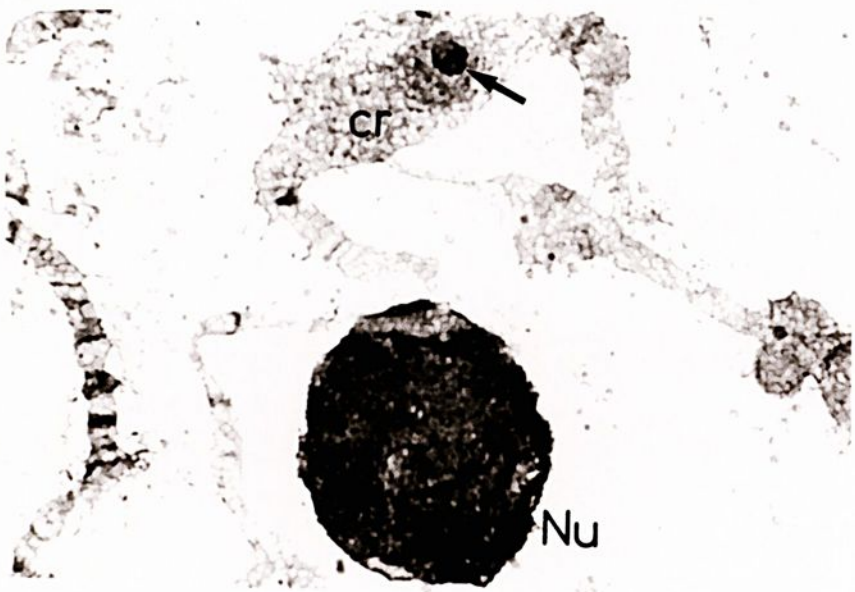


Figura 26. Larva de terceiro estádio tardio. Nitrato de prata. Observar o corpúsculo (seta) fortemente corado no interior do cromocentro (cr). Nu = nucléolo. 4.625 x.

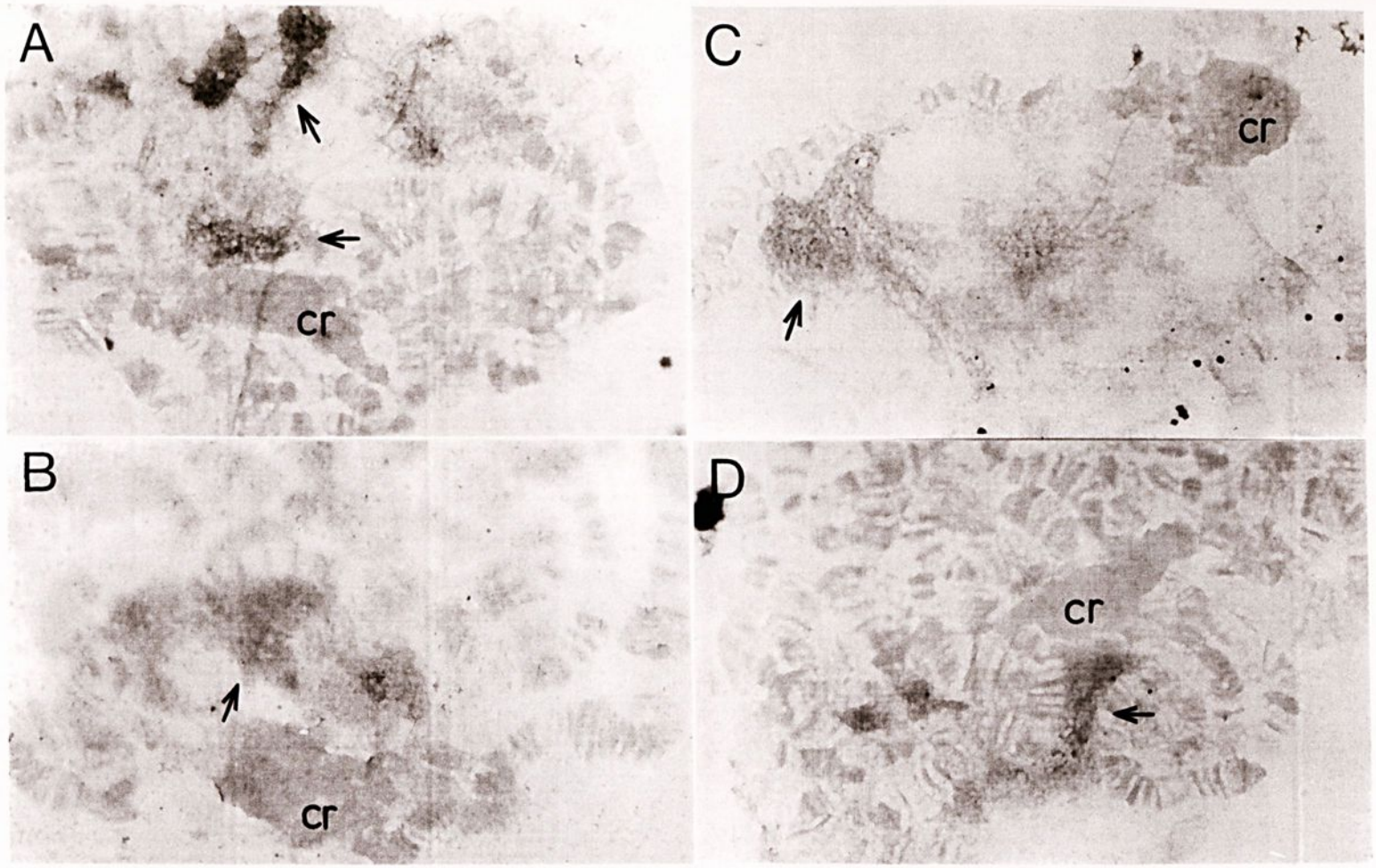


Figura 27 A-D. Pupa média. Nitrato de prata. Observar o cromocentro (cr) de estrutura aparentemente homogênea. O material nucleolar (setas) se destaca pela coloração mais intensa, encontrando-se disperso. 4.625 x.

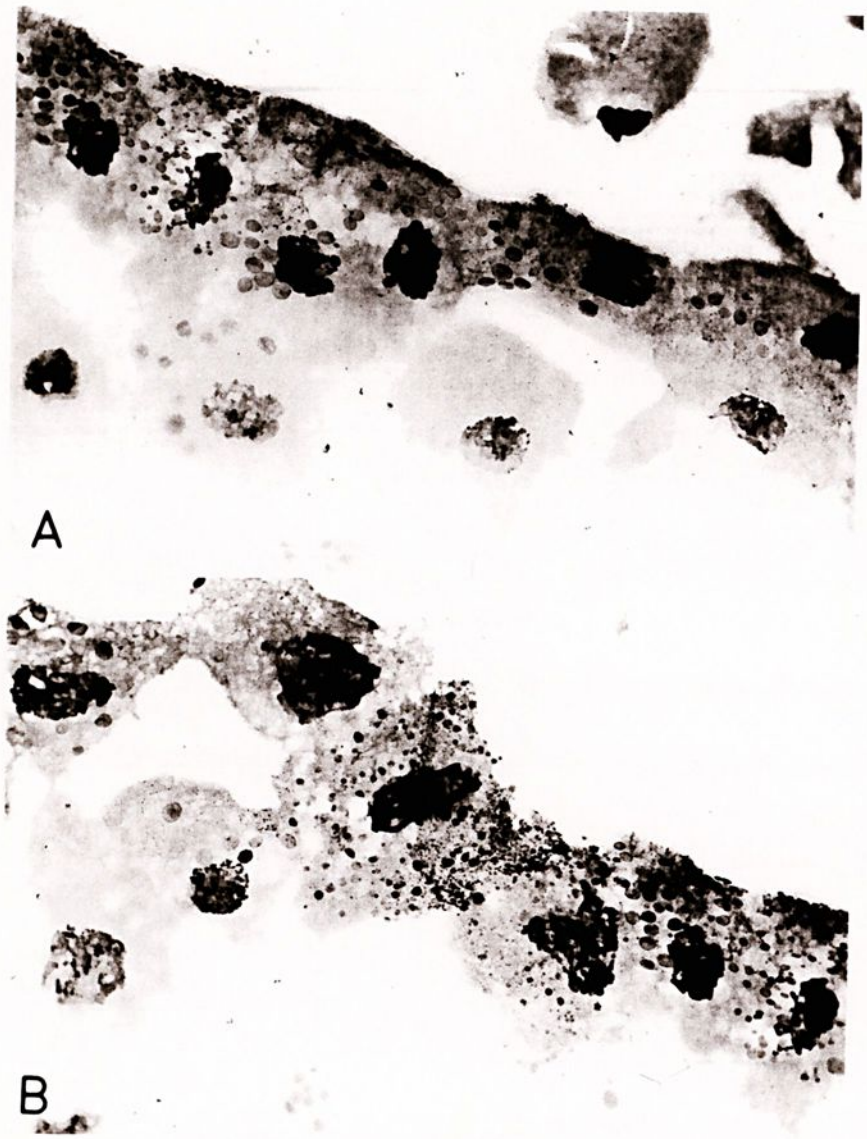


Figura 28 A, B. Pupa jovem. Nitrato de prata. Ver a presença de vesículas e grânulos de tamanhos variáveis preenchendo o citoplasma, especialmente, de células do contorno da glândula. 700 x.

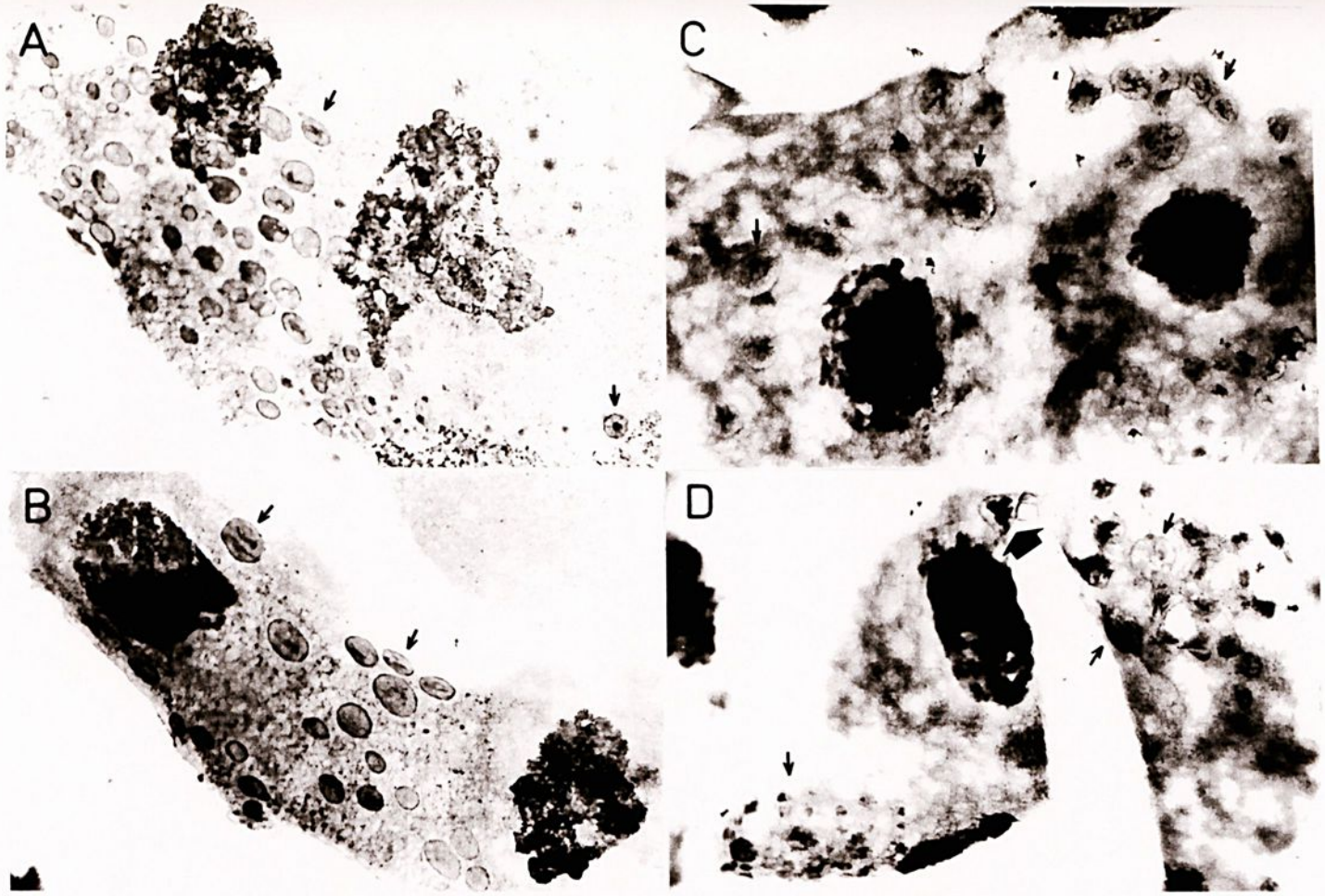


Figura 29 A-D. Pupa jovem. Nitrato de prata. Observação, em maior aumento, das vesículas encontradas nas células das glândulas salivares nesta fase (setas). Verificar a morfologia variada do conteúdo dessas vesículas. As maiores contêm material aparentemente lamelar (**A** e **B**) ou filamentar (**C** e **D**). Em **D**, possível vacúolo autofágico (seta larga). A e B = 1.750 x; C e D =1.600 x.

parte dos vacúolos parece estar no interior do núcleo, em meio à massa de material cromossômico, alterado estruturalmente. Grandes gotas de material sendo eliminado para o interior do lume da glândula também podem ser vistas (Figura 30).

Como mostra a Figura 31, em algumas lâminas impregnadas com nitrato de prata, verificou-se a presença de corpúsculos de tamanhos variáveis, intensamente corados, alguns associados aos cromossomos, que lembram pela sua distribuição e estrutura as vesículas descritas anteriormente, no núcleo e vistas nas Figuras 4 a 7.

IV.2. ANÁLISE DE ESTRUTURAS CELULARES, NO DESENVOLVIMENTO, EM MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

IV.2.1. Características de estruturas celulares em larvas de terceiro estádio

Conforme esperado, em lâminas de larvas de terceiro estádio tardio, às quais foi aplicado o alaranjado de acridina, observam-se cromossomos corados em verde e o nucléolo em alaranjado ou vermelho. Ao longo dos cromossomos podem ser vistas regiões de coloração alaranjada, que constituem regiões de pufes, nas quais o RNA se acumula. A cromatina associada ao nucléolo também é claramente visível, bem como a sua ligação à região do cromocentro, que é visto como uma estrutura às vezes homogênea, outras vezes filamentosa irregular. Também são observáveis filamentos de DNA interligando regiões cromossômicas. O citoplasma aparece, geralmente, desprovido de vacúolos e grânulos (Figuras 32 e 33). Porém, a Figura 34, embora se refira à larva de terceiro estádio tardio, mostra a presença de algumas vesículas coradas em verde

unesp

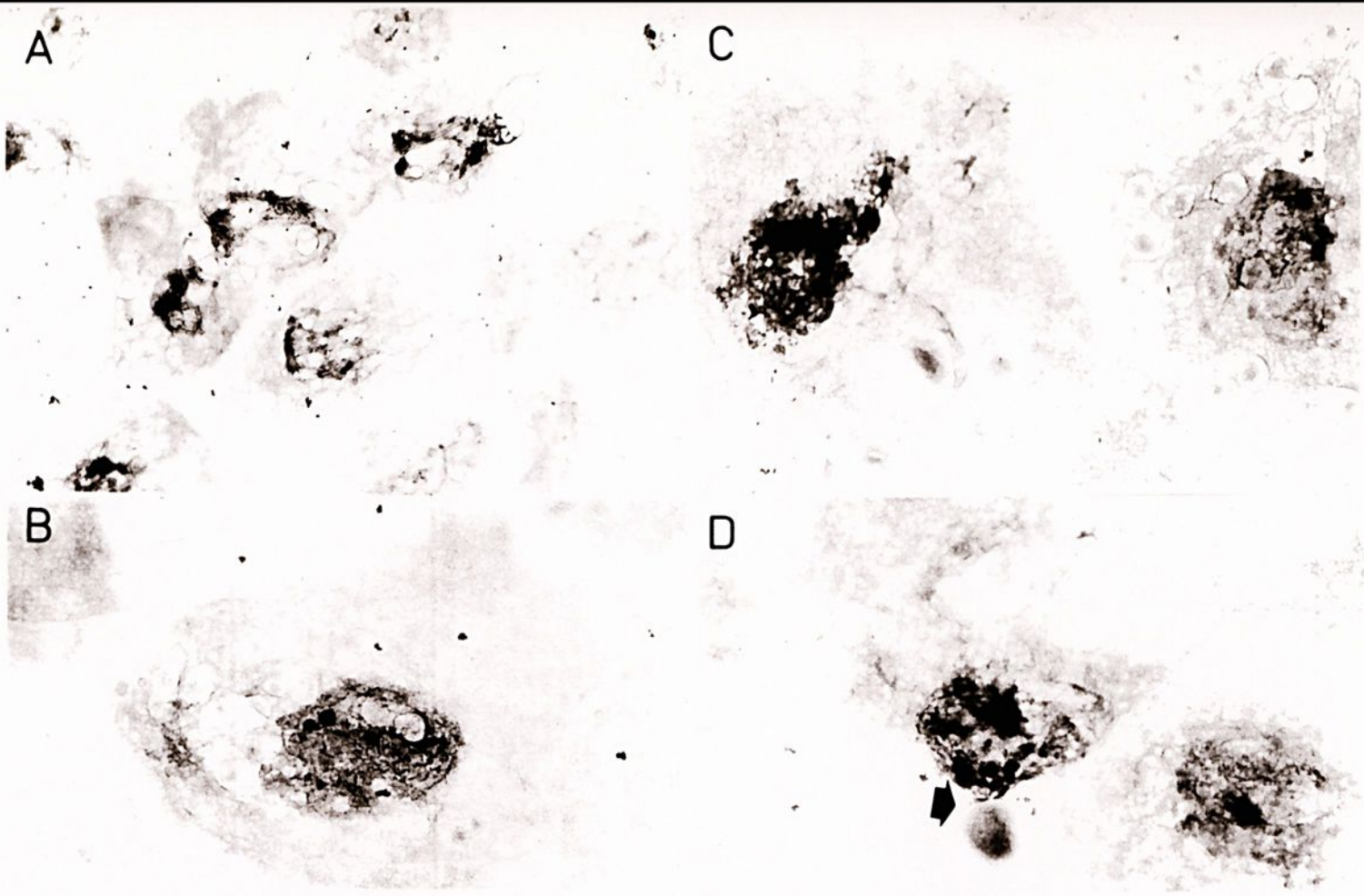


Figura 30 A-D. Pupa jovem. Nitrato de prata. Numerosos vacúolos, de tamanhos variáveis, observados nas células das glândulas salivares nesta fase. Em **D**, gota de material que parece estar sendo eliminado para o lume da glândula (seta). A = 700 x; B, C e D = 1.750 x.

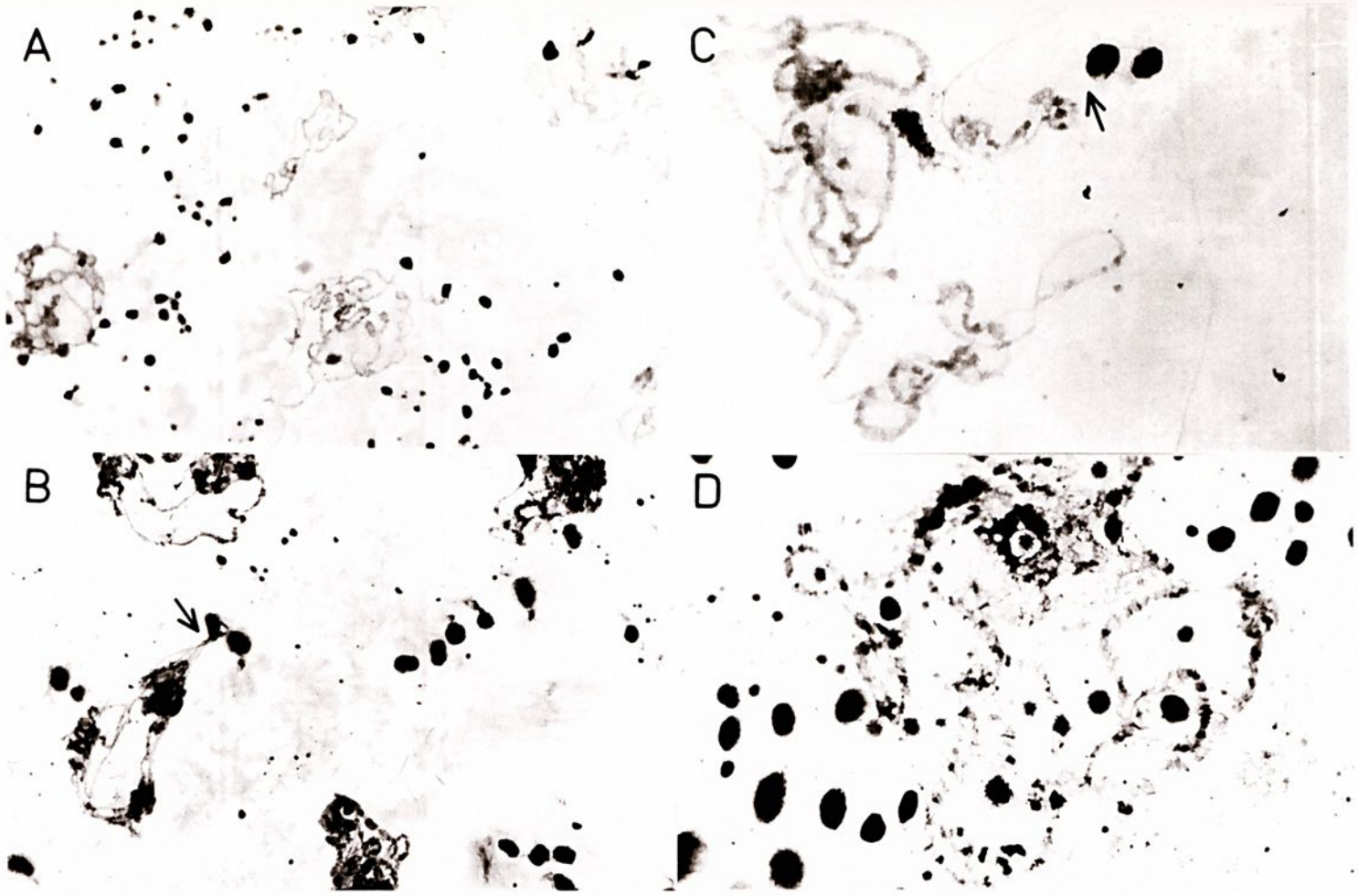


Figura 31 A-D. Pupa jovem (**A-C**) e pupa média (**D**). Nitrato de prata. Corpúsculos intensamente impregnados pela prata, de tamanhos variáveis, alguns aparentando estar associados a filamentos derivados da deterioração estrutural dos cromossomos (setas). Essas formações lembram as vesículas já descritas com outras técnicas de coloração. A e B = 700 x; C e D = 1.750 x.

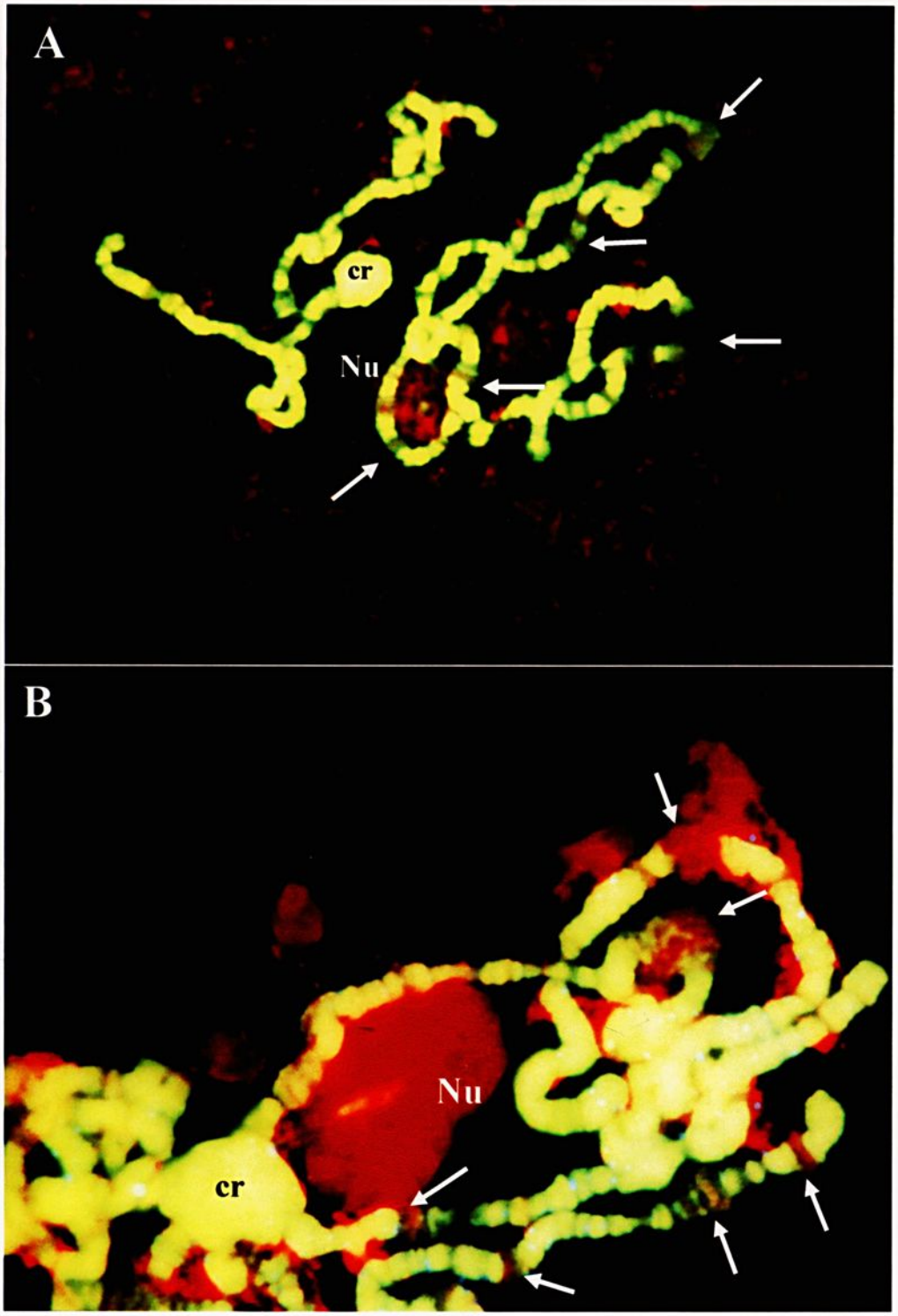


Figura 33 A, B. Larva de terceiro estádio tardio. Alaranjado de acridina. Observar a coloração alaranjada ou avermelhada característica da presença de RNA nos pufes (setas). Nu = nucléolo, cr = cromocentro. Filtro rosa. A = 1.680 x e B = 4.200 x.

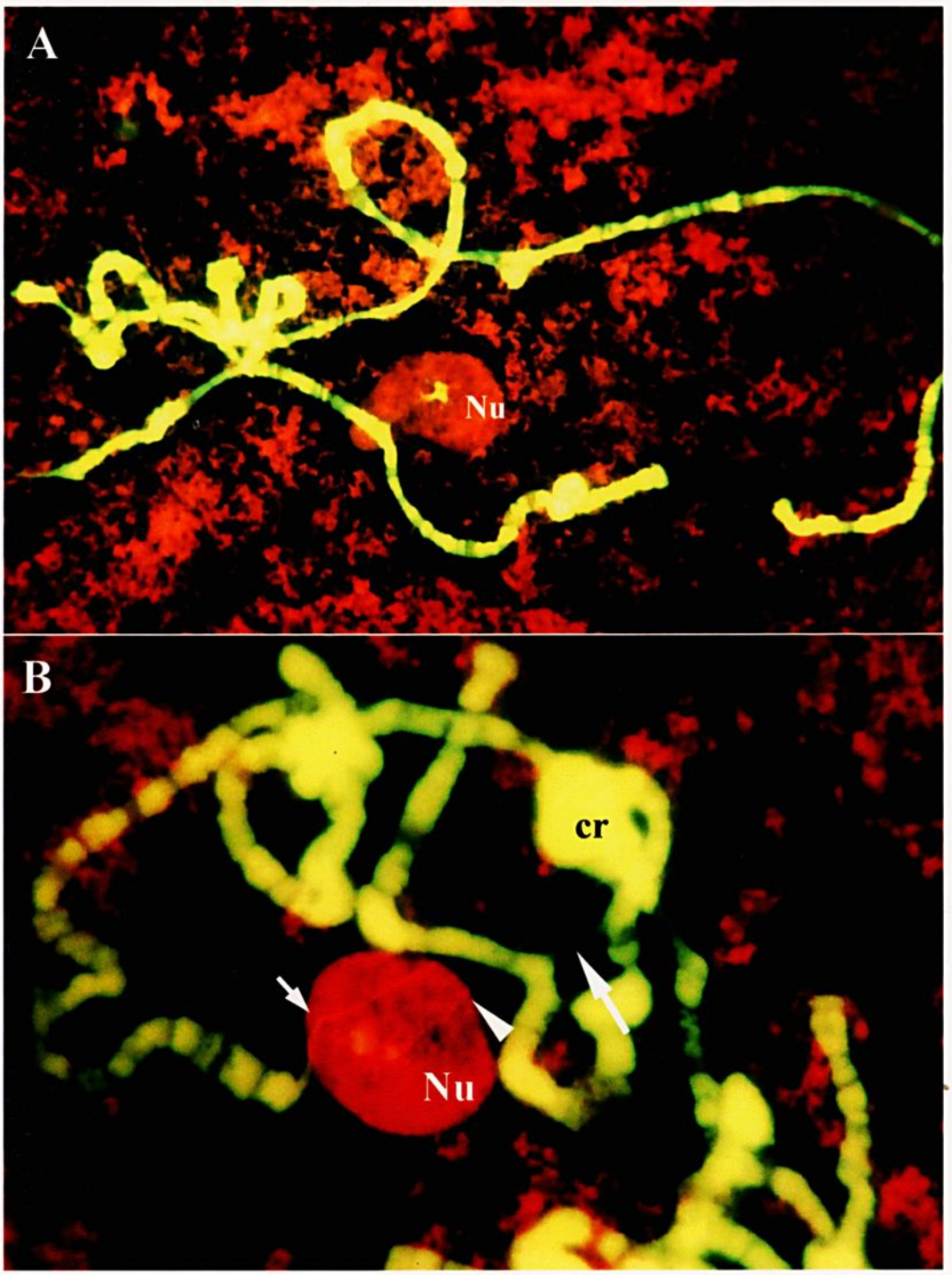


Figura 32 A, B. Larva de terceiro estádio tardio. Alaranjado de acridina. Nucléolo (Nu), cromocentro (cr) e cromossomos. Em **A,** cromossomos e nucléolo. Outra célula, em aumento maior (**B**), mostra ligações entre a cromatina associada ao nucléolo e à região do cromocentro (cabeça de seta); associações de cromossomos com o cromocentro (seta menor) e de cromossomos entre si (seta maior). Observar também a aparente homogeneidade da região do cromocentro. Filtro rosa. A = 1.613 x e B = 4.032 x.

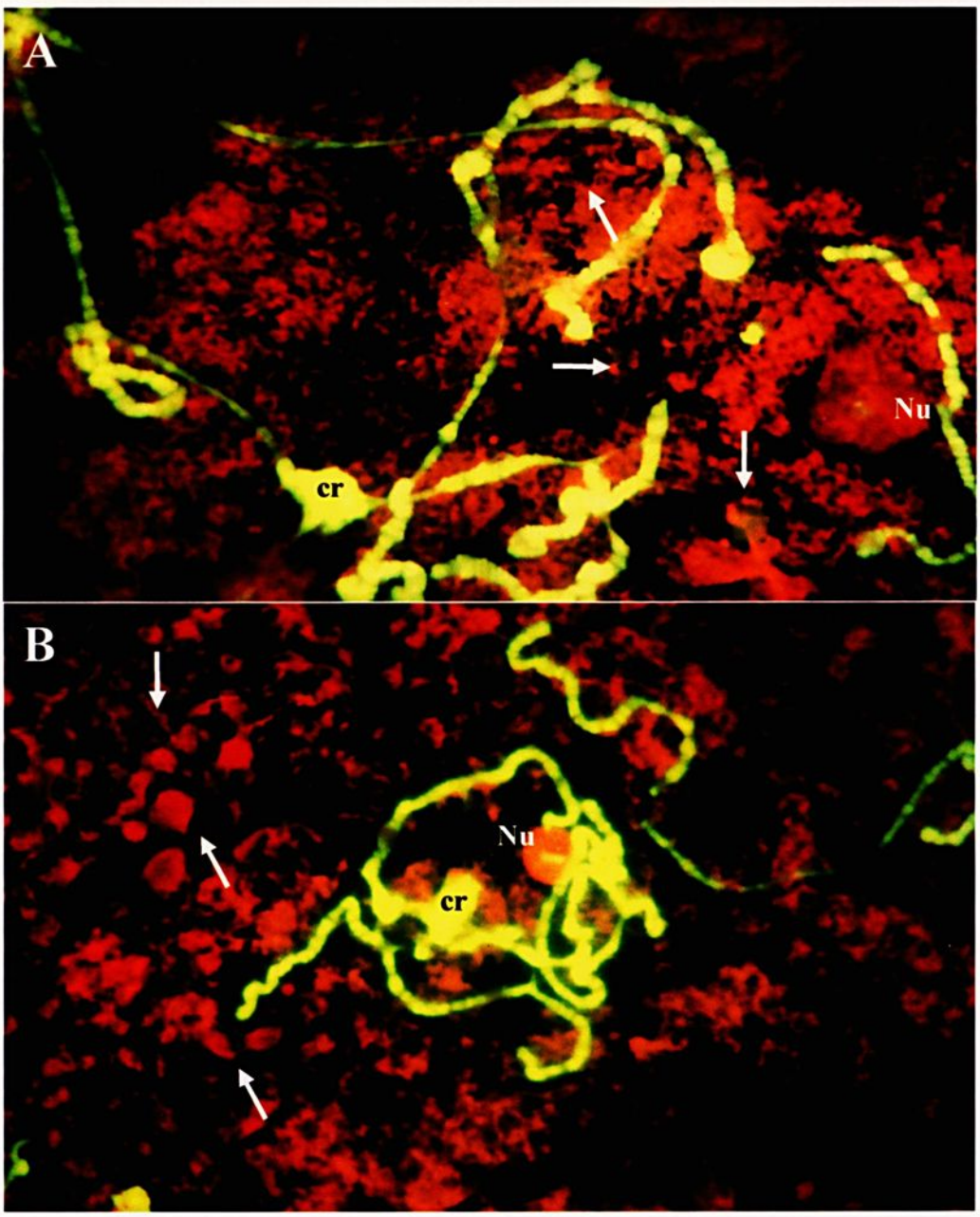


Figura 34 A, B. Larva de terceiro estádio tardio. Alaranjado de acridina. Observar a presença de algumas vesículas coradas em verde (**A**) ou vermelho-alaranjado (**B**), que aparecem em algumas células de larva (setas). Nu = nucléolo, cr = cromocentro. Filtro rosa. 1.512 x.

(Figura 34A) ou irregulares, avermelhadas (Figura 34B).

IV.2.2. Características de estruturas celulares em pupas médias

Nesta fase do desenvolvimento, em que ocorre a histólise das glândulas salivares, o núcleo celular caracteriza-se por grande alteração estrutural dos cromossomos e ausência de um nucléolo diferenciado (Figura 35). O material nucleolar encontra-se disperso em meio ao conjunto cromossômico ou mesmo ausente. A coloração com alaranjado de acridina mantém-se a mesma, isto é, esverdeada para cromossomos e alaranjada para o material nucleolar. O cromocentro, nesta fase, mantém o aspecto observado na fase de larva com a mesma técnica de coloração (Figura 36).

A Figura 37 mostra as vesículas já descritas em lâminas de pupa coradas com nitrato de prata, apresentadas nas Figuras 4 e 5, ou com orceína lacto-acética (Figura 6), ou Feulgen (Figura 7). Aparecem geralmente associadas aos cromossomos e apresentam um envoltório. Nas Figuras 37 e 38, são observadas vesículas de tamanhos variados, coloração verde e envoltório alaranjado. Em 38B, as vesículas aparecem inteiramente alaranjadas. Na Figura 39A são observadas vesículas verdes, de tamanhos variados, associadas ou não ao material cromossômico. Em 39B, o núcleo fechado cora-se em vermelho e, segundo a literatura, essa coloração caracteriza núcleos apoptóticos de pH acídico.

Em pupas médias, as glândulas salivares em fase adiantada de histólise apresentam aspectos estruturais celulares bastante variados. A glândula salivar observada em pequeno aumento apresenta estruturas globulares de tamanho variado e um aspecto geral característico da sua fragilidade nesse período

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

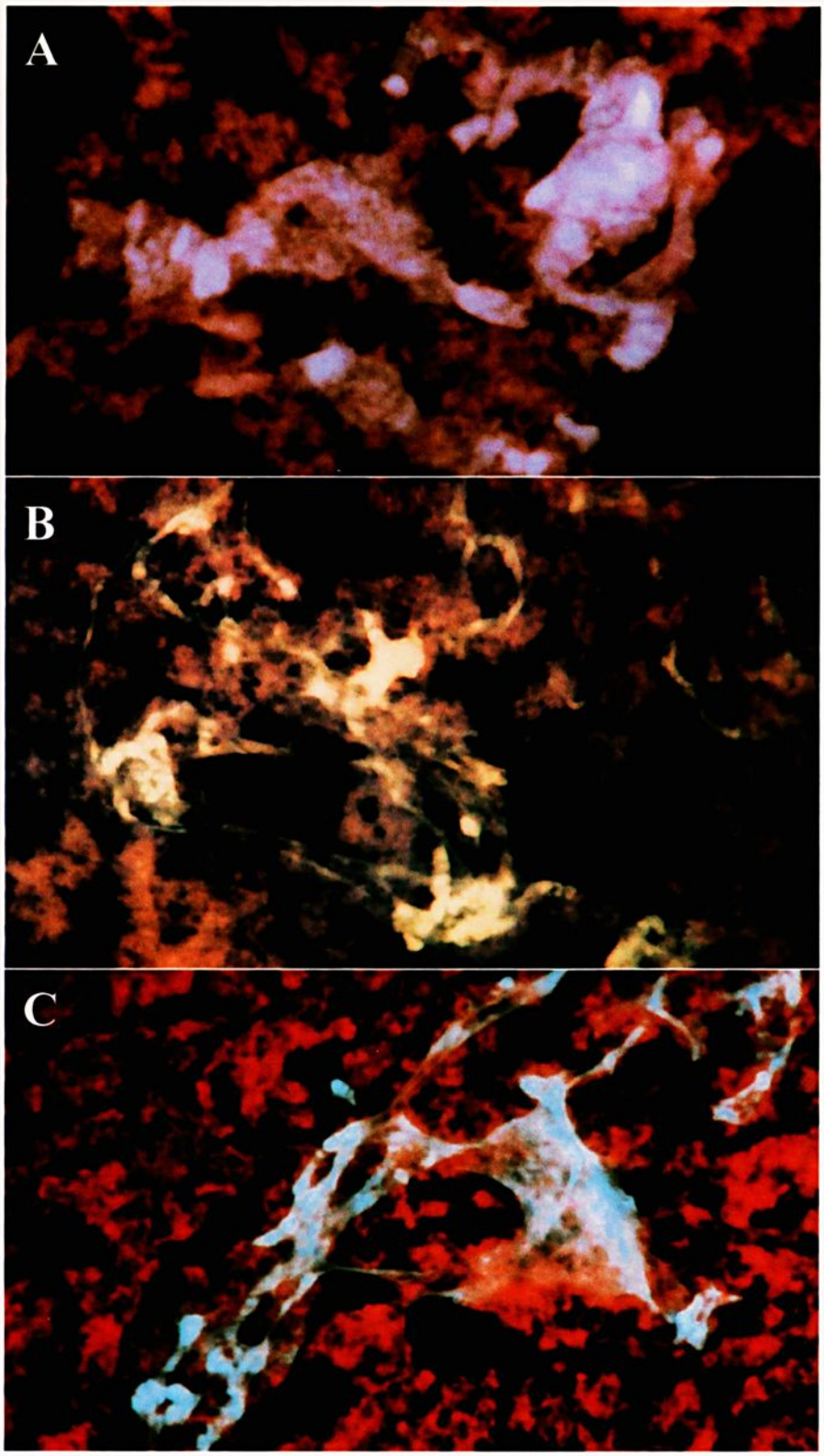


Figura 35 A-C. Pupa média. Alaranjado de acridina. Estados avançados de alteração estrutural dos cromossomos. Observar a ausência de corpúsculo nucleolar diferenciado. A e C = filtro vermelho; B = filtro rosa. A = 4.200 x; B e C = 1.680 x.

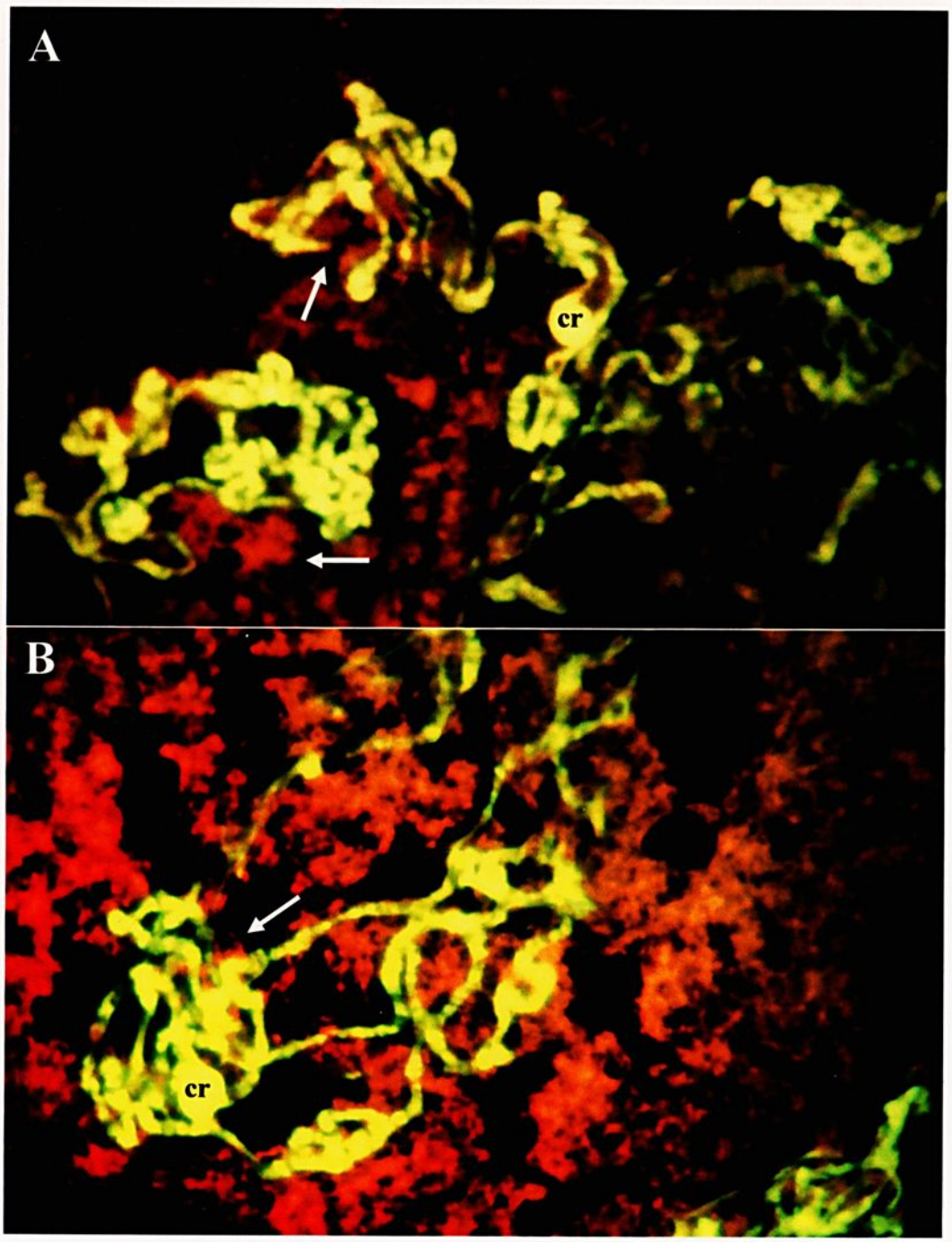


Figura 36 A, B. Pupa média. Alaranjado de acridina. Restos de material nucleolar aparecem associados a cromossomos (setas). cr = cromocentro. Filtro rosa. 1.680 x.

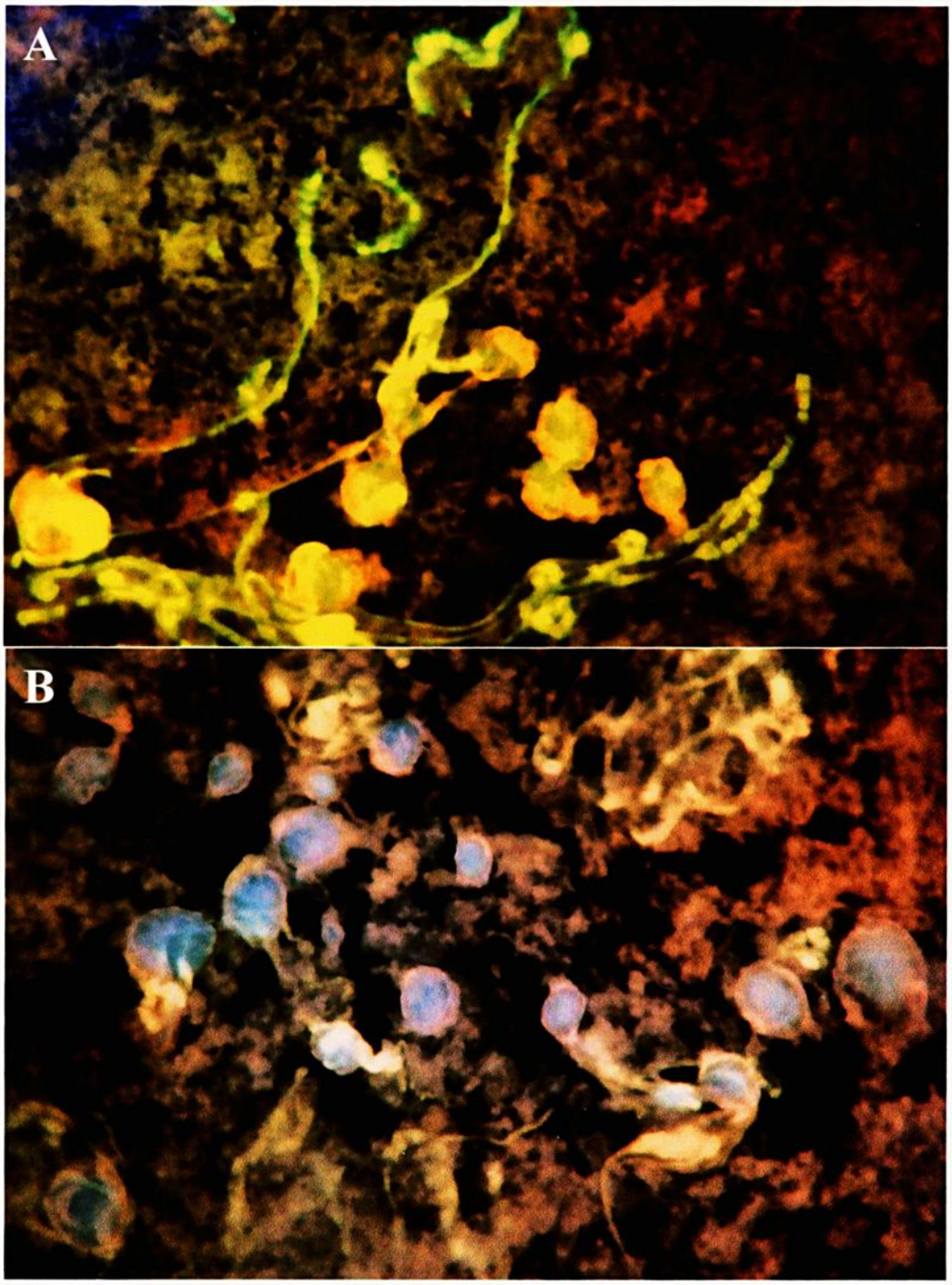


Figura 37 A, B. Pupa média. Alaranjado de acridina. Presença de vesículas de tamanhos variados associados aos cromossomos em diferentes graus de alteração. Em **A**, as vesículas têm conteúdo alaranjado e verde. Em **B**, o conteúdo que aparece azulado, na lâmina era predominantemente verde. Filtro rosa. 1.680 x.

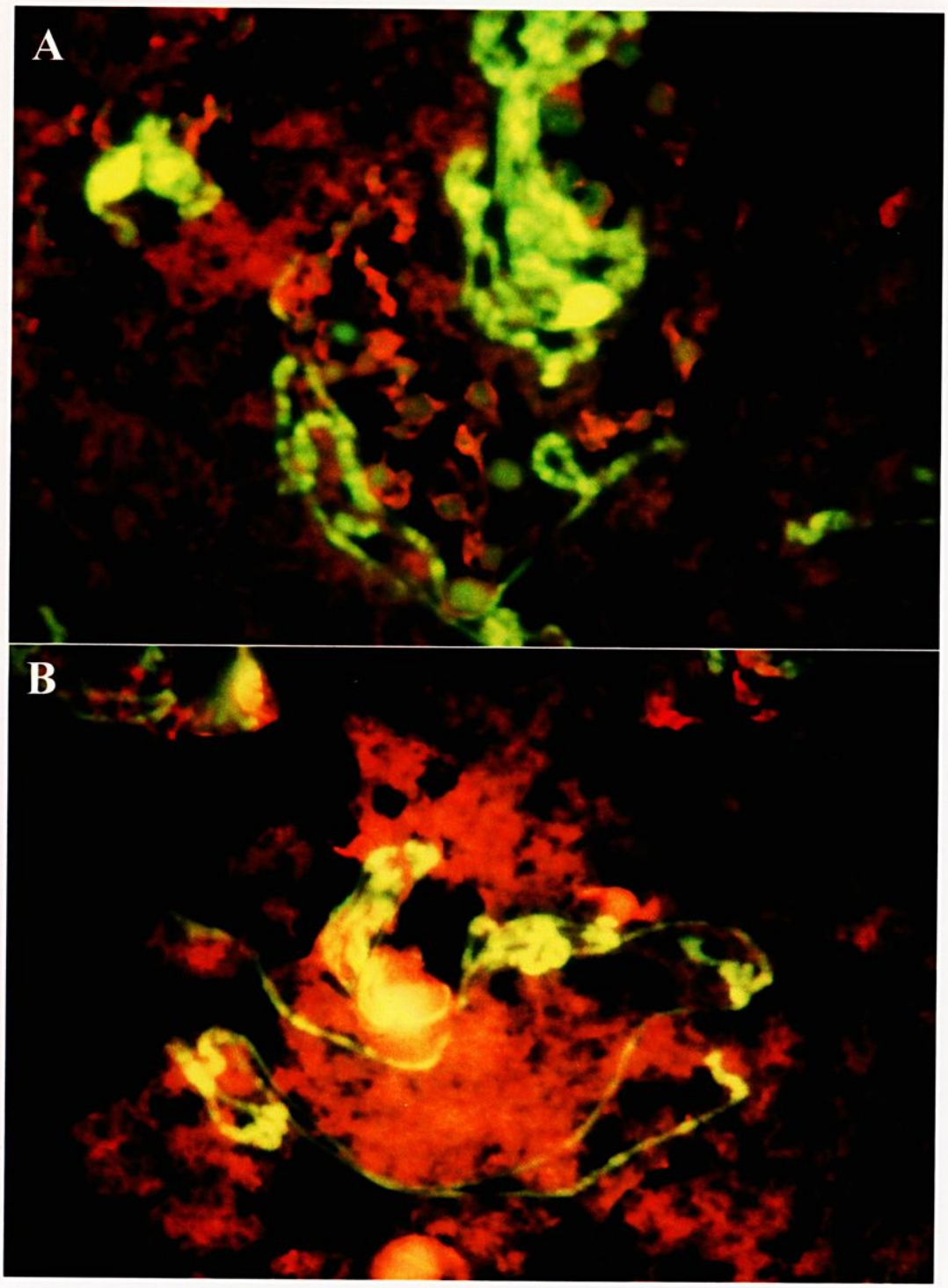


Figura 38 A, B. Pupa média. Alaranjado de acridina. Outros aspectos das vesículas e sua associação com os cromossomos. Em **A**, o conteúdo das vesículas é predominantemente verde e, em **B** alaranjado. Filtro rosa. 1.680 x.

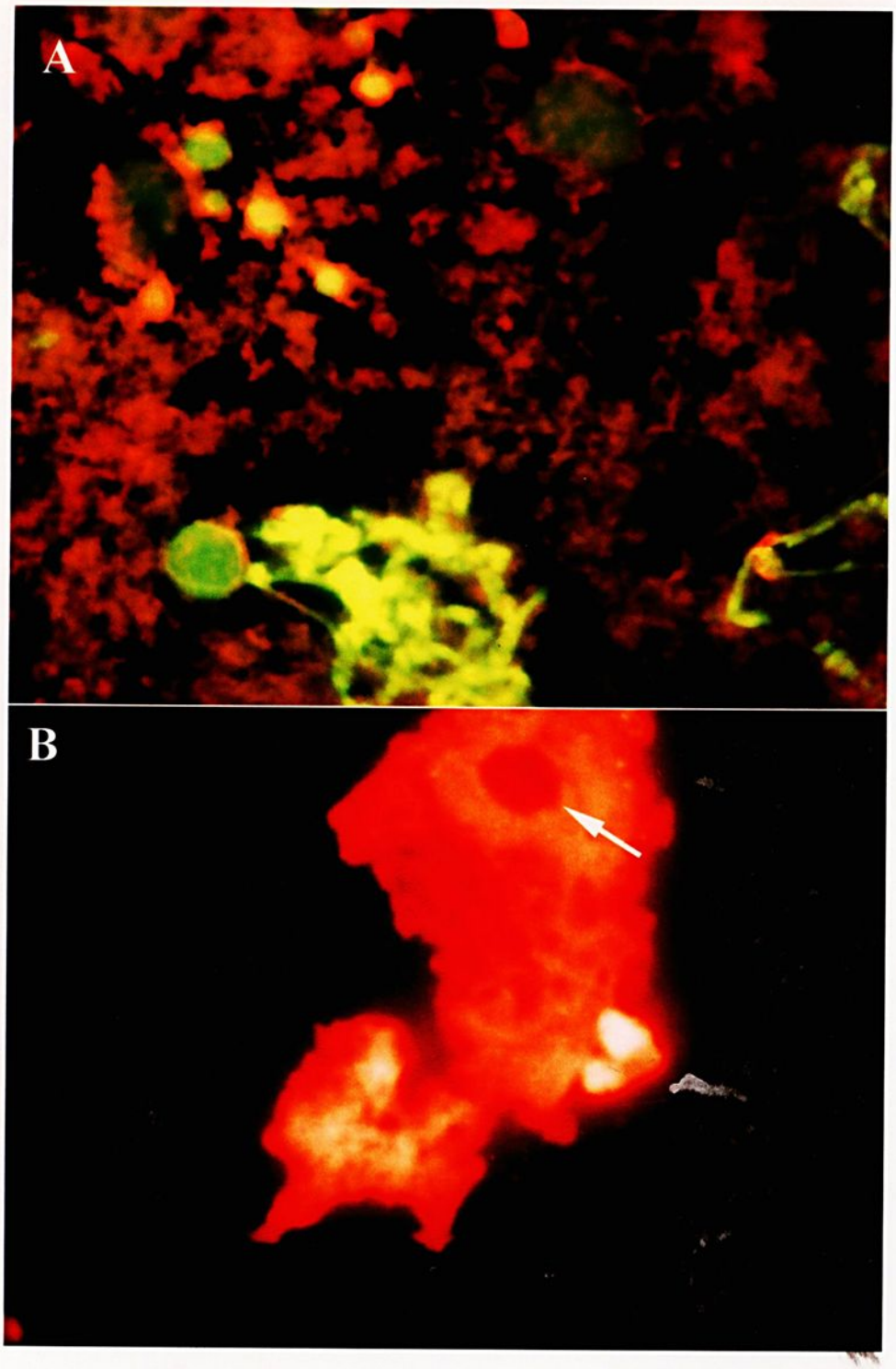


Figura 39 A, B. Pupa média. Alaranjado de acridina. **A:** vesículas coradas em verde, associadas ou não a cromossomos. **B:** Núcleo fechado de glândula salivar (seta) mostrando coloração vermelha. A = filtro rosa; B = filtro vermelho. 1.680 x.

(Figura 40A). A célula toda é muito tênue, especialmente a região do núcleo, que às vezes aparece vazia. Já não se observam diferenciações estruturais como vesículas e vacúolos no citoplasma celular, e restos cromossômicos se reduzem a tênues filamentos ainda esverdeados, presentes no núcleo ou mesmo fora das células. No núcleo, observa-se sempre uma formação globular mais densa, que mostra geralmente a mesma coloração apresentada pelo citoplasma (Figuras 40B-D e 41). Mesmo eliminada do núcleo, isto é, presente nos espaços entre as células, nas lâminas preparadas por esmagamento, essa formação mantém a sua integridade (Figura 41B).

Nem sempre, nas células ainda íntegras, o núcleo mostra uma nítida separação do citoplasma, mas em fases aparentemente ainda mais adiantadas da desintegração, uma estrutura membranosa torna-se aparente, circundando o núcleo, e a formação globular encontra-se freqüentemente associada a ela (Figura 42).

Aspectos da ruptura e desintegração da célula como um todo, podem ser vistos nas Figuras 40 a 44. Em várias lâminas foram observadas formações fusiformes e filamentosas, de diâmetro e comprimento variáveis (Figuras 43 e 44). Entre as delgadas, encontram-se aparentemente restos das membranas celulares (Figura 44 C, D).

Variações na coloração das estruturas celulares, coradas com o alaranjado de acridina, decorreram, em alguns casos, do uso de diferentes filtros, da revelação fotográfica, da cópia digital e da própria variação de tons apresentados pelas estruturas. Nas Figuras do trabalho, há ainda a considerar as

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

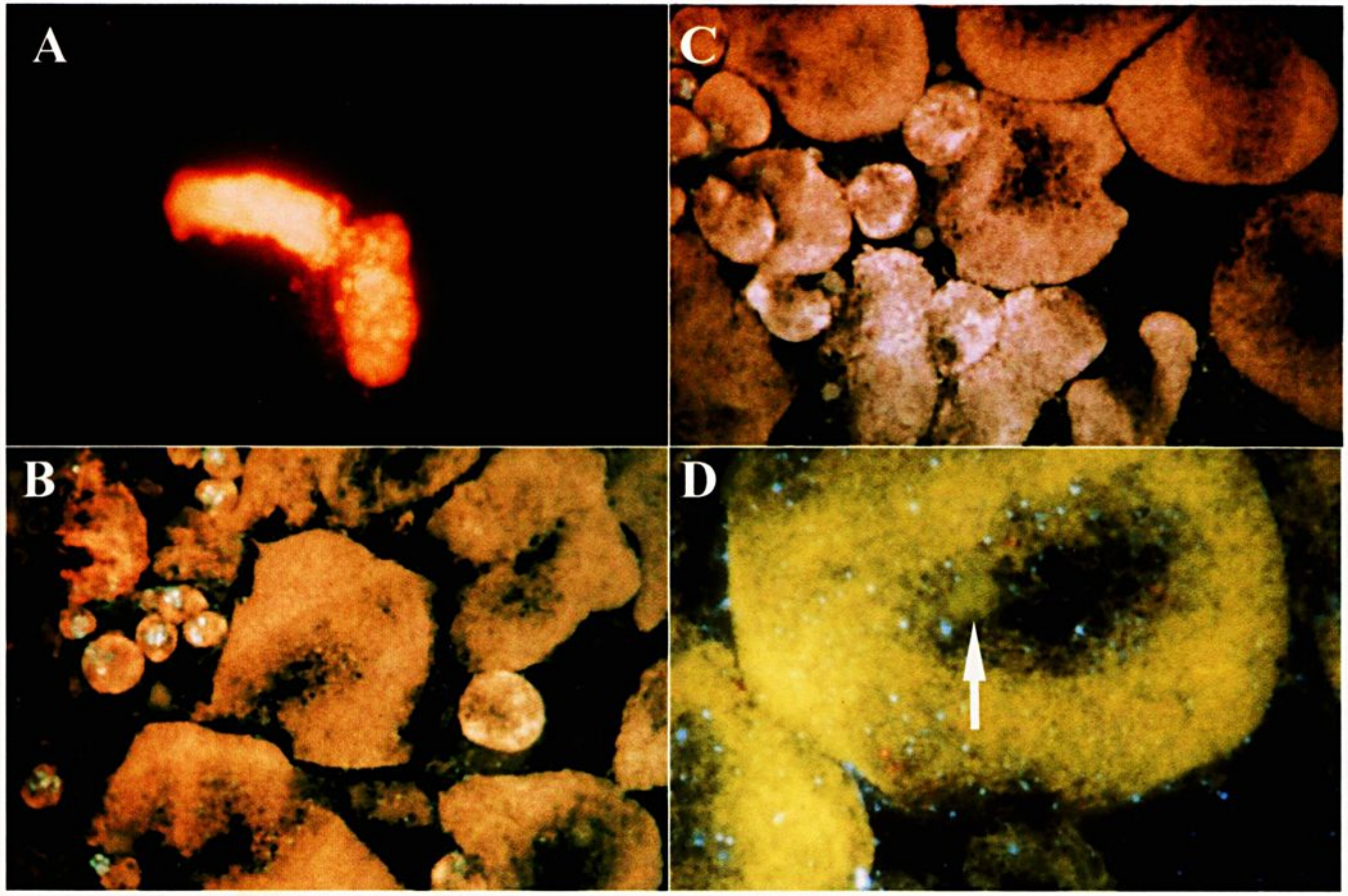


Figura 40 A-D. Pupa média. Alaranjado de acridina. **A:** visão geral da glândula em fase de histólise. **B-D:** células em histólise, mostrando estrutura tênue do núcleo que aparece parcialmente vazio ou preenchido por material filamentar esverdeado. Em **B**, as pequenas células da esquerda tinham seus cromossomos corados em verde na lâmina. Em **D**, observa-se uma estrutura globular, mais homogênea, no interior do núcleo. A-C = filtro azul; D = filtro vermelho. A = 252 x; B e C = 1.008 x e D = 2.520 x.

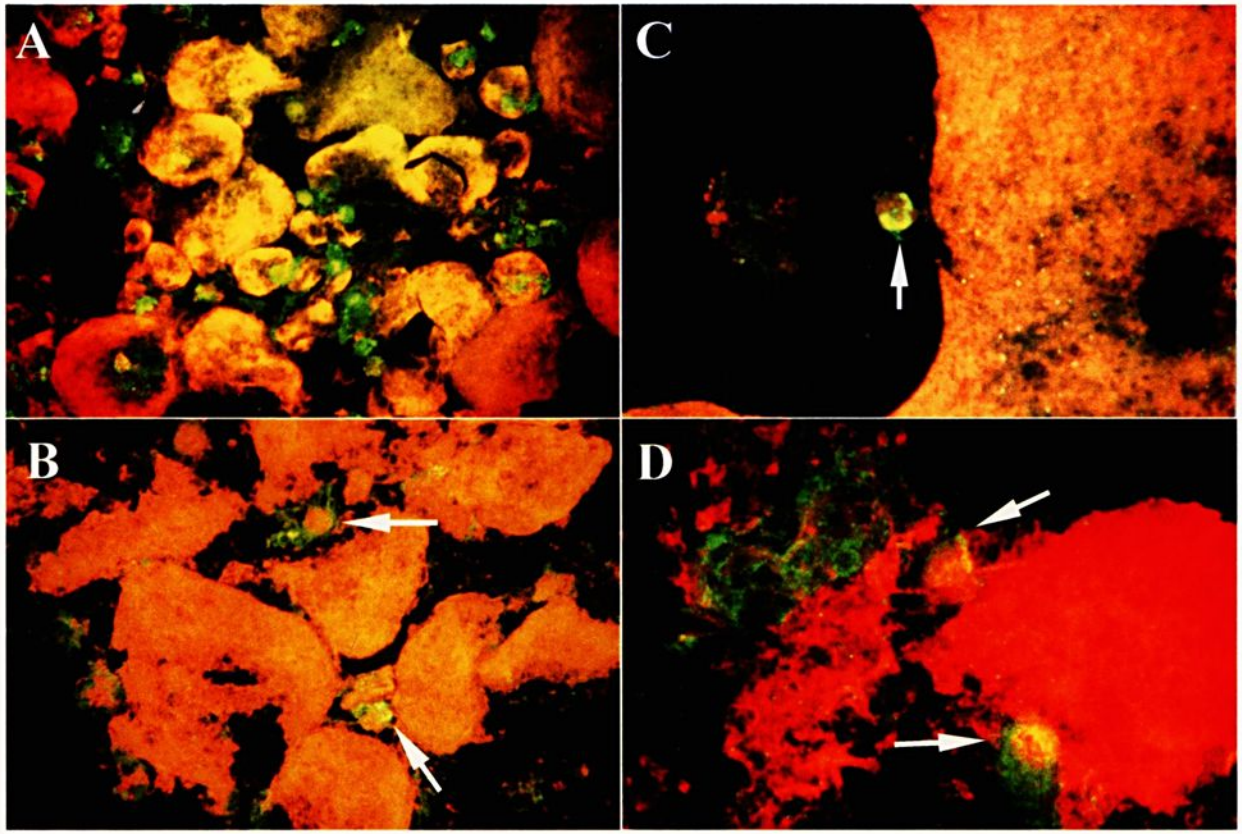


Figura 41 A-D. Pupa média. Alaranjado de acridina. Aspectos da alteração estrutural das células nas glândulas salivares em fase de histólise. **A:** observam-se células de tamanho variado com DNA corado em verde. **B-D:** as estruturas globulares são vistas associadas a restos cromossômicos e celulares (setas). A, C e D = filtro vermelho; B = filtro azul. A, B = 882 x; C, D = 2.205 x.

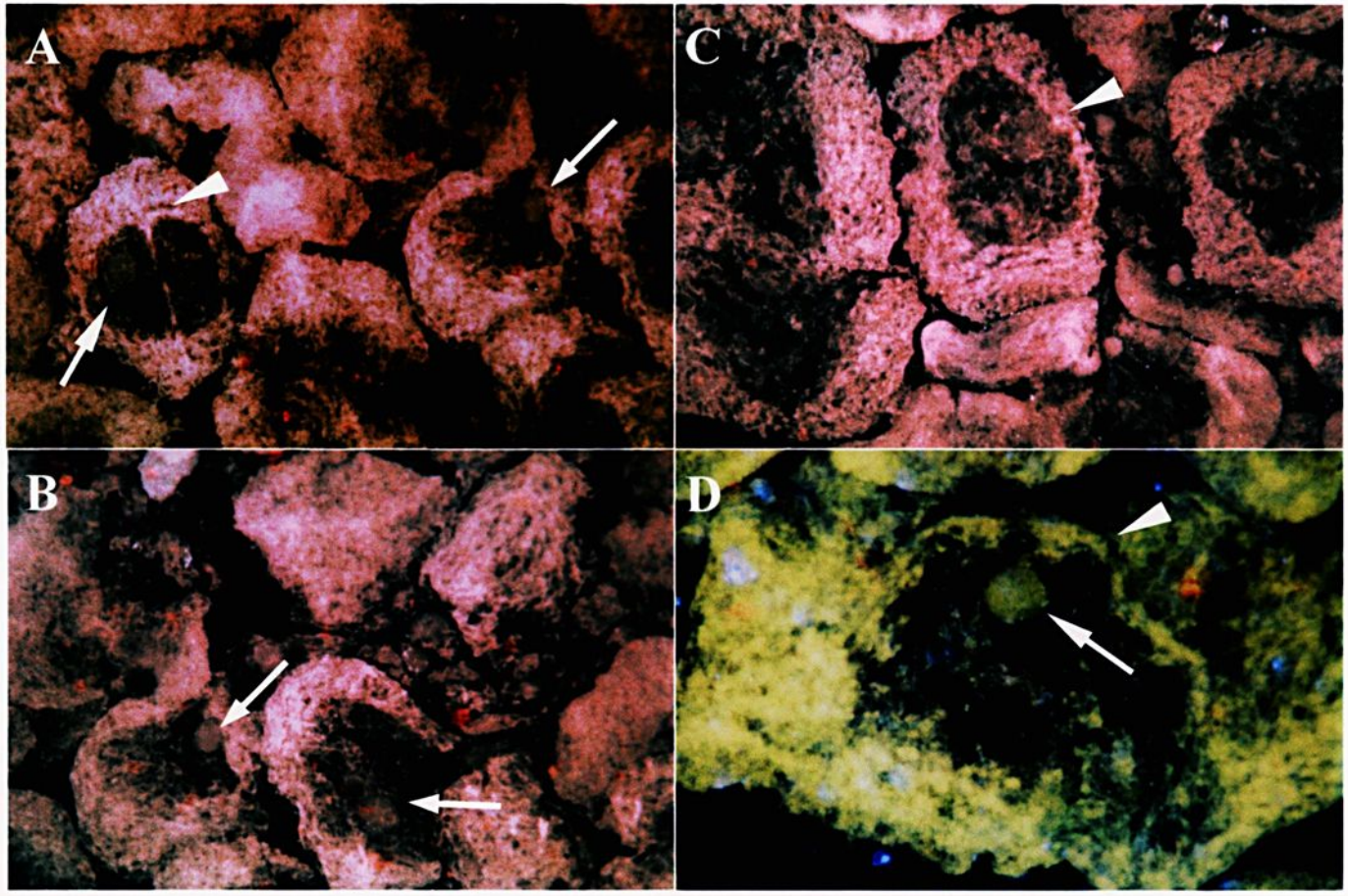


Figura 42 A-D. Pupa média. Alaranjado de acridina. Aspectos variáveis da desintegração celular nas glândulas salivares. Observar a presença constante da estrutura globular, geralmente associada ao limite do núcleo (setas). Observar também que em algumas células forma-se uma estrutura membranosa no limite entre o núcleo e o citoplasma (cabeça de seta). Várias células já se encontram rompidas. A-C = filtro azul, 1.680 x; D = filtro vermelho. 4.200 x.

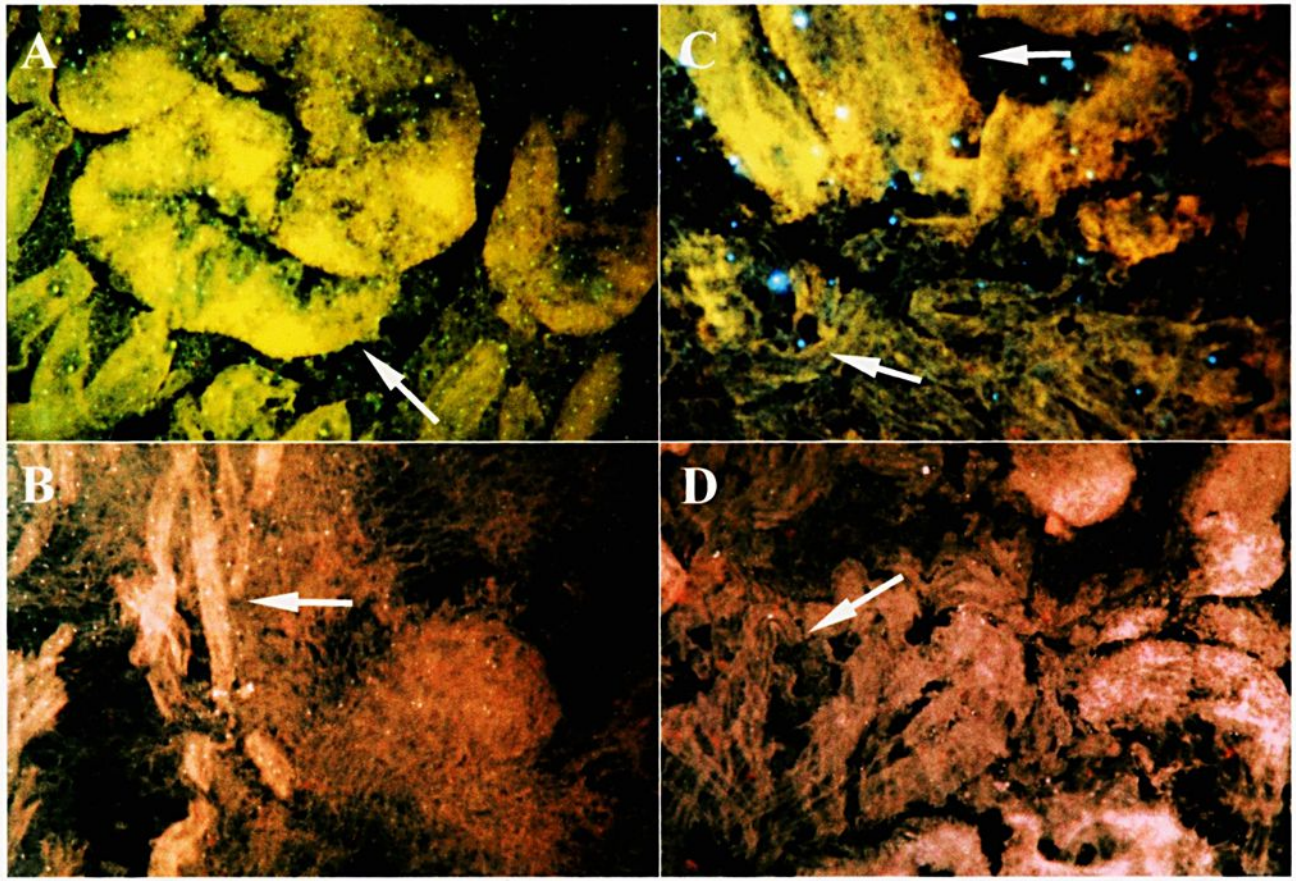


Figura 43 A-D. Pupa média. Alaranjado de acridina. Estágios mais adiantados da degeneração celular nas glândulas salivares. Observam-se estruturas filamentosas ou fusiformes de diâmetro e comprimento variáveis (setas). Essas estruturas parecem derivadas da massa citoplasmática ou das membranas celulares, estando geralmente imersas em um fundo emaranhado constituído de restos celulares. A, C = filtro vermelho; B, D = filtro azul. A, B e D = 974 x; C = 2.436 x.

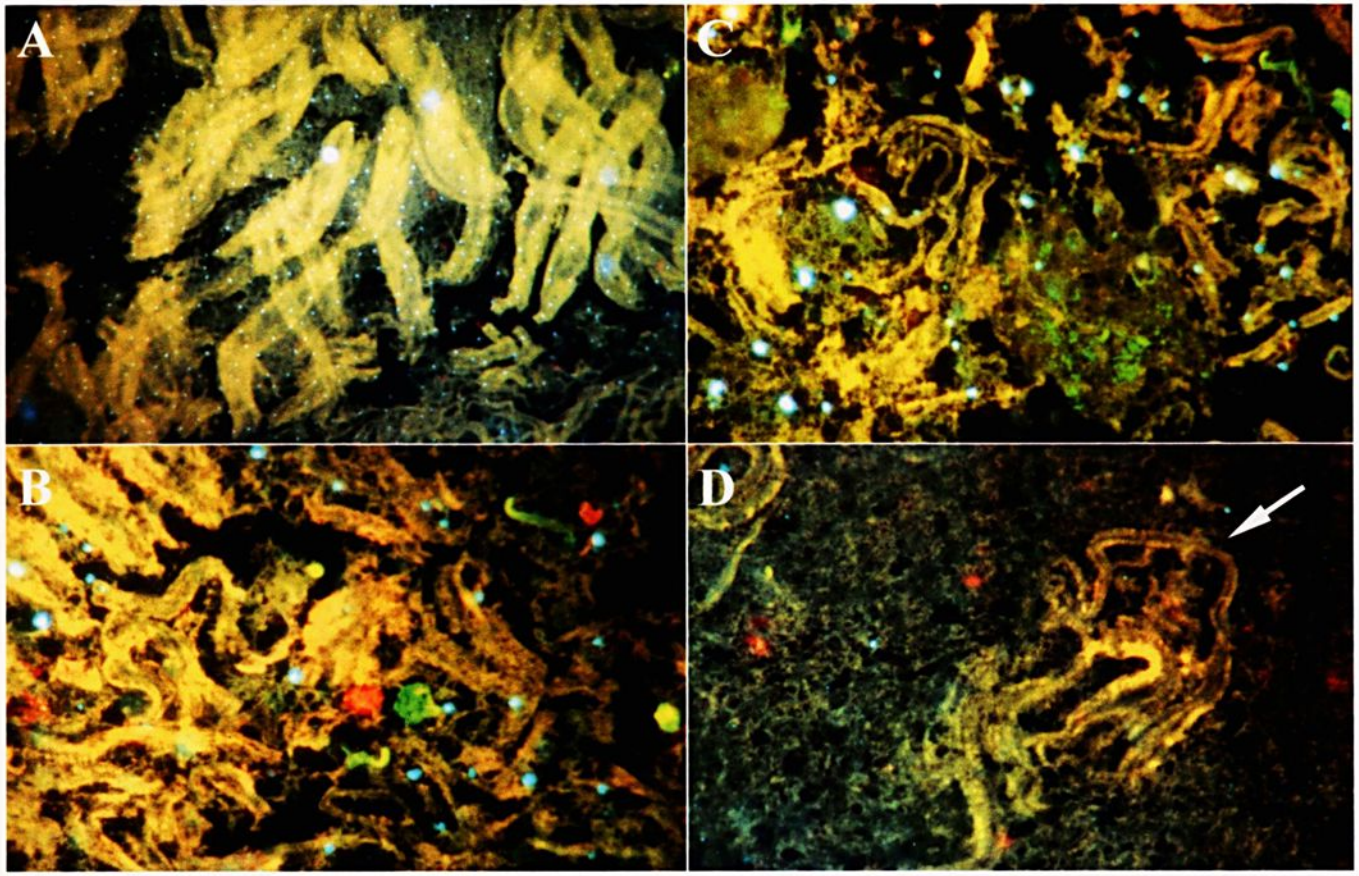


Figura 44 A-D. Pupa média. Alaranjado de acridina. Outros detalhes das estruturas filamentosas aparentemente derivadas das células em degeneração. Em **A**, observam-se essas estruturas com aspecto aproximadamente fusiforme. Em **B**, **C**, os filamentos são de comprimento e diâmetro variáveis. Em **D**, os filamentos longos e delgados mostram uma estrutura dupla (seta), provavelmente derivada das membranas celulares. Filtro vermelho. A = 1.008 x; B-D = 2.520 x.

alterações introduzidas pelo escaner e nova impressão pelo computador.

IV.3. ANÁLISE DE ESTRUTURAS CELULARES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

IV.3.1. Características de estruturas celulares em larvas de terceiro estádio

Na fase de larva de terceiro estádio tardio, as observações ao microscópio eletrônico mostraram, nos cromossomos politênicos, a ultraestrutura normal de bandas e interbandas já analisada por muitos autores nas glândulas salivares de *Drosophila* (Sorsa & Saura, 1980; Semeshin *et al.*, 1985; Lee & Baehrecke, 2001). Essas observações constam da Figura 45A-C.

Os nucléolos também mostraram os componentes normalmente encontrados nesse organóide: uma região granular e uma estrutura fibrilar mais densa. Vacúolos também são observados. A estrutura fibrilar mais densa geralmente corresponde ao DNA ribossômico, que na *Drosophila* fica incluído no nucléolo (Figura 45C-F). Na Figura 45D, F, pode-se observar uma continuidade do material fibrilar denso com material da mesma natureza, situado, fora do nucléolo, possivelmente associado à região organizadora nucleolar (RON), que na espécie analisada se localiza na região centromérica do cromossomo X. Na Figura 45A vê-se grande quantidade de grânulos, vesículas e vacúolos, de tamanhos variados e aspectos diferentes, presentes no citoplasma.

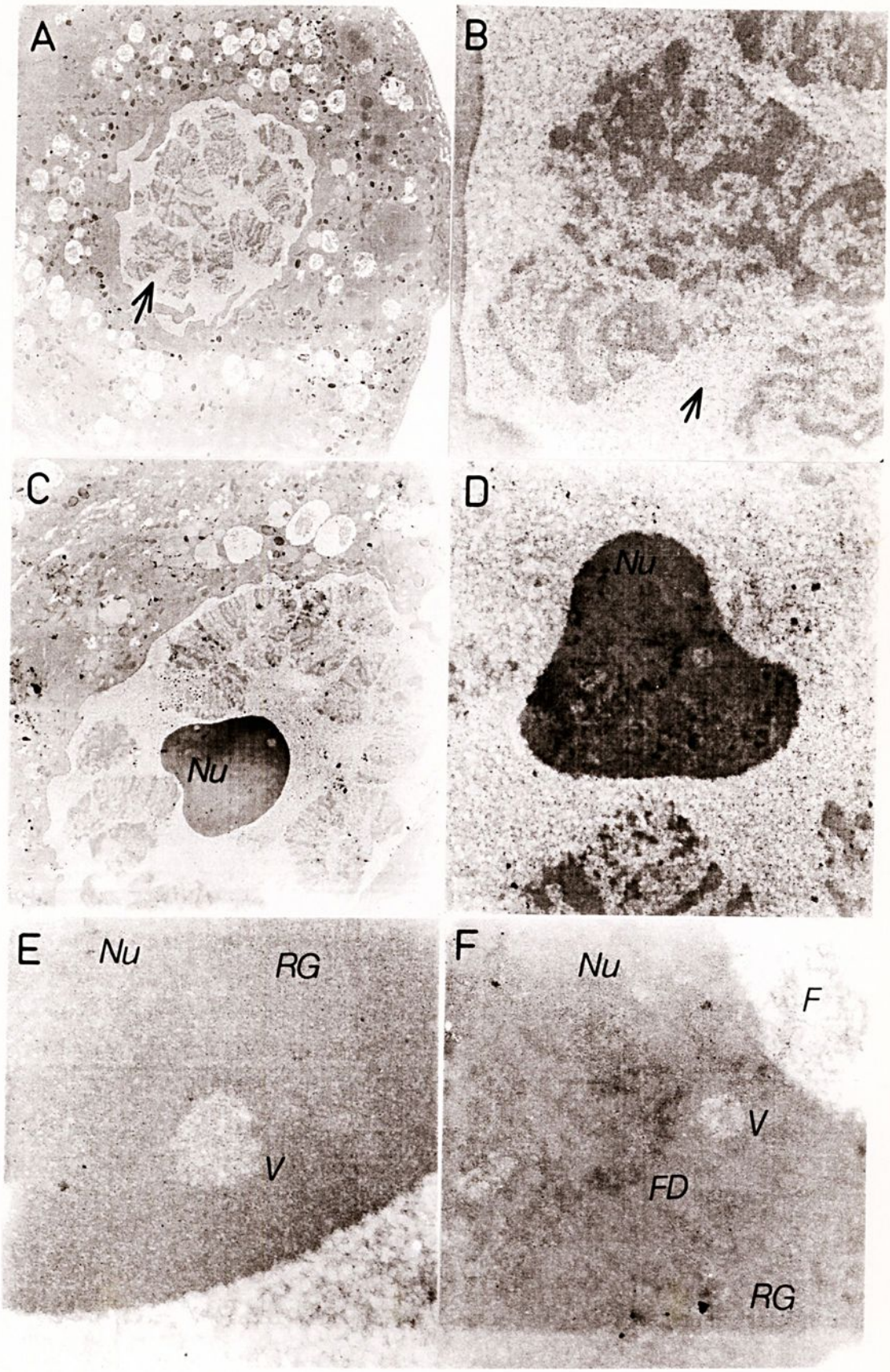
IV.3.2. Características de estruturas celulares em pupas médias

Nas glândulas salivares de pupas médias, como já foi mencionado, há uma variação do grau de alteração da ultraestrutura em diferentes células, isto é, em algumas os cromossomos aparecem mais íntegros, com seu

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Figura 45 A-F. Larva de terceiro estádio tardio. MET. Observação da ultraestrutura das células das glândulas salivares. **A:** cromossomos com a estrutura característica em bandas e interbandas (seta) e o citoplasma com numerosos vacúolos e vesículas, aparentemente contendo material de secreção, e pequenas estruturas mais densas, provavelmente mitocôndrias. **B:** porção ampliada de A mostrando detalhes da estrutura cromossômica e o nucleoplasma. **C, D:** observação do nucléolo (Nu) que se destaca no núcleo por sua densidade. **E, F:** fotos aumentadas dos nucléolos vistos em C e D, mostrando detalhes da ultraestrutura nucleolar, onde se observam vacúolos (V), região granular (RG) e fibrilar densa (FD). Em **F**, à direita, observam-se fibrilas (F) que aparentemente penetram no nucléolo e que talvez constituam a cromatina associada ao nucléolo. A = 2.156 x; B = 12.930 x; C = 2.784 x; D = 10.000 x; E = 27.800 x; F = 21.560 x.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17


A
B
C
Nu
D
Nu
E
Nu
RG
V
F
Nu
F
V
FD
RG

aspecto de bandas e interbandas ainda definido, enquanto, em outras, há apenas resquícios dessa estrutura (Figura 46). Em fases avançadas, o núcleo aparece constituído por "massas" de filamentos, alargadas, parecendo incluir mais de um cromossomo (Figura 46C).

As regiões heterocromáticas mantêm-se condensadas e aparentemente íntegras, mesmo nas células que mostram padrão cromossômico bastante alterado (Figura 46). Em vários cortes, a heterocromatina aparece associada ao nucléolo. Este, por sua vez apresenta alteração de forma (Figura 46 E). Na Figura 46F observa-se uma estrutura, no interior do núcleo, que lembra um vacúolo digestivo que poderia ser uma das vesículas vistas em associação aos cromossomos, em microscopia de luz.

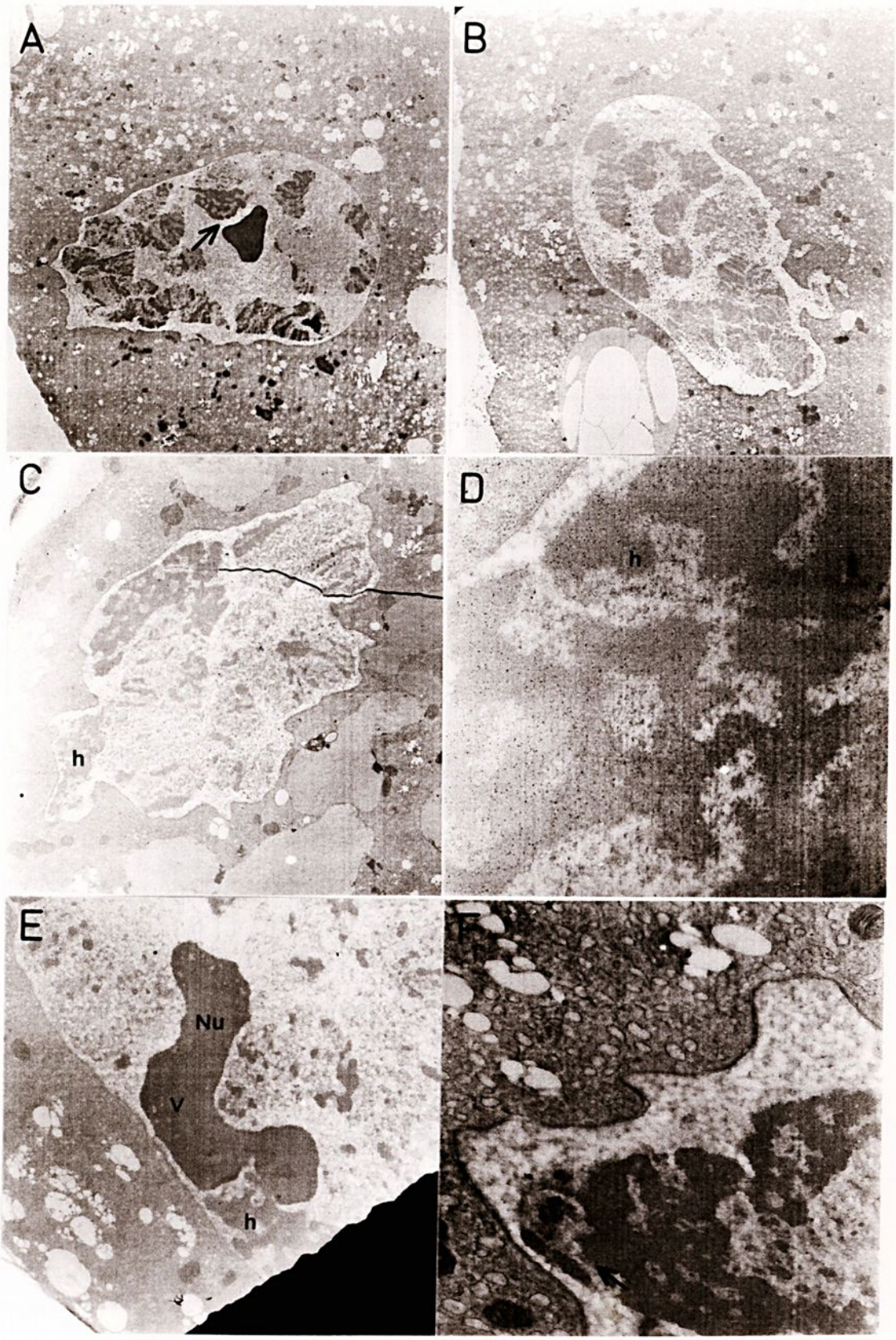
Uma diferença bastante nítida entre as células das glândulas salivares de larva e de pupa é a presença, no citoplasma desta última, de enorme quantidade de grânulos, vesículas e vacúolos de variados tamanhos, contendo estruturas também variadas. Em alguns casos o conteúdo é fibrilar, em outros é granular, cristalino ou homogeneamente denso. A Figura 47 mostra essa grande variedade de aspecto e tamanho dessas formações presentes no citoplasma das células em análise. Algumas observações sugerem que vacúolos ou vesículas menores unem-se formando estruturas maiores ou introduzem os seus conteúdos em outras formações (Figuras 47 e 48).

Também foram observados aspectos relativos à eliminação dos produtos de secreção das glândulas salivares. Observamos que as vesículas contendo material de secreção, que ocorrem no citoplasma das células

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Figura 46 A-F. Início de Pupa Média. MET. **A:** o nucléolo aparece associado à heterocromatina (seta), e os cromossomos ainda preservam a organização em bandas e interbandas, em muitas regiões. **B-F:** Pupa média em fases mais adiantadas da histólise, com alteração mais acentuada da estrutura cromossômica. **C, D:** região heterocromática (h), possivelmente do cromocentro, vista em dois aumentos. **E:** o nucléolo (Nu), associado à heterocromatina (h), aparece morfologicamente alterado, tendo perdido a sua forma globular. **F:** estrutura com aspecto de vacúolo digestivo, associada ao material cromossômico (seta). A = 1.670 x; B = 2.156 x; C = 4.646 x; D = 27.800 x; E = 6.000 x; F = 12.930 x.

unesp


A
B
C
h
D
h
E
Nu
V
h
F

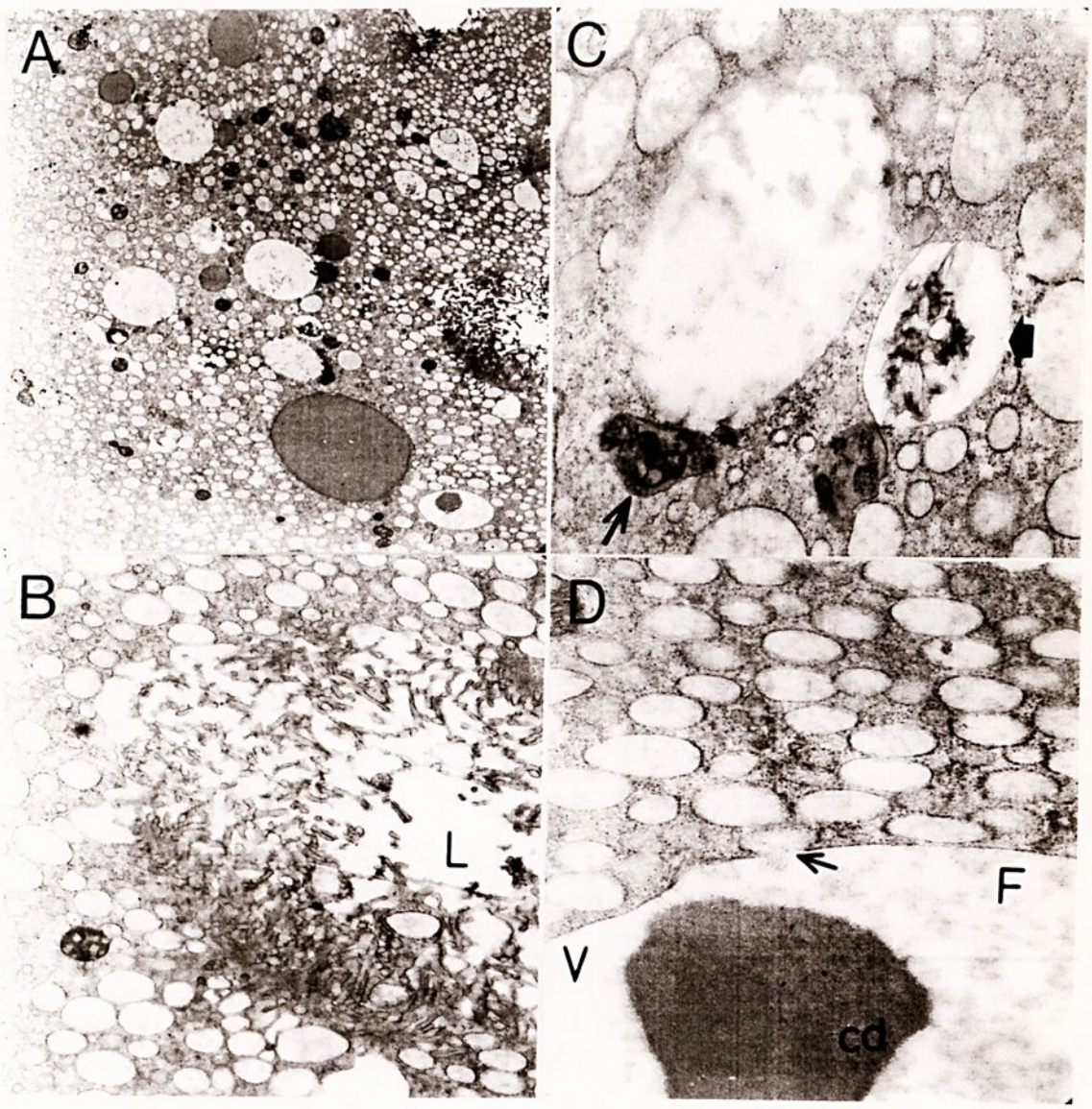


Figura 47 A-D. Pupa média. MET. **A:** visão geral do aspecto e tamanho variáveis dos numerosos grânulos, vesículas e vacúolos presentes no citoplasma das células nas glândulas salivares. **B-D:** detalhes dessas estruturas. Em **B**, próximo das microvilosidades, observam-se vacúolos que se abrem entre as mesmas para o interior do lume (L). Em **C**: vê-se um vacúolo autofágico (seta) e um vacúolo em cujo interior aparece um corpúsculo denso de aspecto cristalino (seta larga). Em **D**, observa-se um grande vacúolo (V) em cujo interior aparece material fibrilar (F) e um corpúsculo denso (cd); um pequeno vacúolo parece estar em comunicação com este grande vacúolo (seta). A = 3.597 x; B = 12.930 x; C e D = 21.560 x.

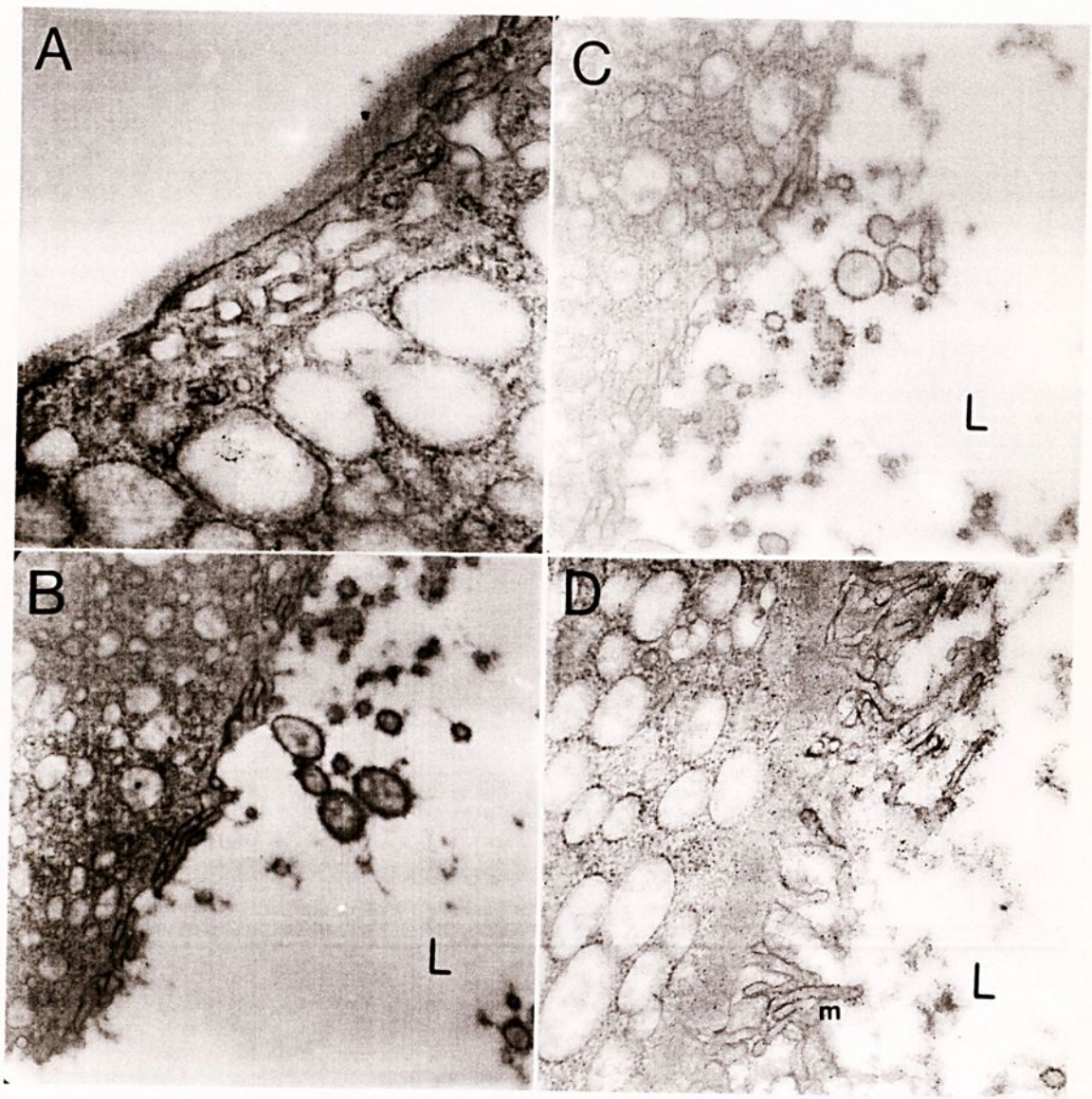


Figura 48 A-D. Pupa média. MET. Aspectos do citoplasma das células de glândulas salivares. **A:** vacúolos de tamanhos diferentes, sendo que quatro deles aparentemente estão se unindo para formar estruturas maiores, na periferia da célula. Observa-se uma camada de material depositada sobre a membrana plasmática. **B-D:** aspectos da eliminação de material para o lume da glândula. Em **D**, observam-se as microvilosidades (m). A, D = 35.970 x; B = 21.560 x; C = 27.800 x.

glandulares, abrem-se na região celular apical, entre as vilosidades que caracterizam essa região da membrana celular, eliminando o seu produto diretamente no interior do lume glandular (Figuras 47B e 48B-D).

Células em estádio avançado de histólise não foram analisadas ao MET.

IV.4. FREQÜÊNCIA DE OBTENÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES NAS DISSEÇÕES PARA PREPARO DAS LÂMINAS

A Tabela 3 apresenta dados referentes à freqüência com que as glândulas salivares foram encontradas na dissecção dos indivíduos, em três fases do desenvolvimento. Em 100% das larvas de terceiro estádio tardio e pré-pupas dissecadas, foi encontrado o par de glândulas, enquanto que nas pupas médias, apenas cerca de 38% do total de glândulas esperadas foi obtido. Em 14 indivíduos (aproximadamente 10%), foi encontrada uma só glândula.

IV.5. MORFOMETRIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES

Medidas de área e perímetro das glândulas salivares foram realizadas para cinco fases do desenvolvimento de *D. saltans*, abrangendo: larva de terceiro estádio inicial, larva de terceiro estádio tardio, puparium, pré-pupa e pupa média (Figura 49).

Os valores médios e desvios padrões da área (μm^2) e do perímetro (μm), das glândulas salivares constam da Tabela 4. Esses dados foram obtidos utilizando o analisador de imagens, conforme descrito em Material e Métodos (item *III.4.1.7*).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Tabela 3. Freqüência de obtenção das glândulas salivares de *D. saltans*, nas dissecções, em três fases do desenvolvimento: larva de terceiro estádio tardio (L_3T); pré-pupa (PP) e pupa média (PM).

Estádio do desenvolvimento	Nº de indivíduos dissecados	Nº de glândulas salivares	
		Esperadas	Obtidas
L_3T	89	178	178
PP	47	94	94
PM	142	284	107*

* 14 indivíduos com uma só glândula.

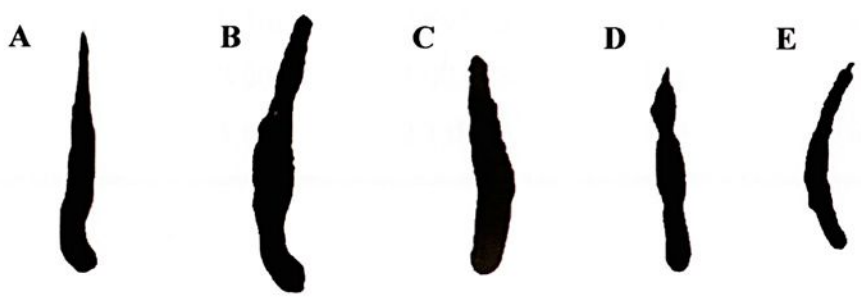


Figura 49 A-E. Glândulas salivares de *D. saltans* em diferentes fases do desenvolvimento. **A** = larva de terceiro estádio inicial (L_3i); **B** = larva de terceiro estádio tardio (L_3T); **C** = puparium (PU); **D** = pré-pupa (PP) e **E** = pupa média (PM). Orceína lacto-acética. 157,5 x.

Tabela 4. Valores médios e desvios padrões das medidas de área (μm^2), e de perímetro (μm) das glândulas salivares de *D. saltans*, em cinco fases do desenvolvimento. L3i = larva de terceiro estádio inicial, L3T = larva de terceiro estádio tardio, PU = puparium, PP = pré-pupa e PM = pupa média. Nº = número de glândulas salivares analisadas em cada fase.

		Área (μm^2)		Perímetro (μm)	
Fase	Nº	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
L_3i	30	6.034	1.645,20	602	119,00
L_3T	32	10.348	5.171,79	728	155,59
PU	31	7.462	2.693,48	565	97,59
PP	33	7.003	3.023,88	506	100,62
PM	30	5.815	2.138,74	474	102,09

No total foram medidas 156 glândulas salivares das cinco fases. Observou-se que, tanto para a área quanto para o perímetro (ambas as medidas se relacionam), os maiores desvios ocorreram nas fases de larva de terceiro estádio tardio e pré-pupa (Tabela 4). Em parte, essa variação deve ser decorrente de uma dificuldade em se caracterizar precisamente a fase, mas, deve ser também conseqüência de uma real variação entre os indivíduos de uma mesma fase.

Os dados da Tabela 4, colocados em gráficos, constam da Figura 50. No gráfico referente às medidas de área, observa-se uma elevação entre as fases de larva de terceiro estádio inicial e larva de terceiro estádio tardio, da ordem de 71%, uma queda acentuada entre larva de terceiro estádio tardio e puparium, da ordem de 28%, uma pequena queda entre puparium e pré-pupa (cerca de 6%) e uma queda mais acentuada entre pré-pupa e pupa média (17%). No gráfico referente ao perímetro, verifica-se uma elevação entre as fases de larva de terceiro estádio inicial e larva de terceiro estádio tardio (aproximadamente 21%), e queda a partir dessa fase (22% entre larva de terceiro estádio tardio e puparium; 10% entre puparium e pré-pupa e 6% entre pré-pupa e pupa velha).

A Tabela 5 mostra a significância das comparações por teste *t* dos valores de área e perímetro, nas diferentes fases do desenvolvimento analisadas.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

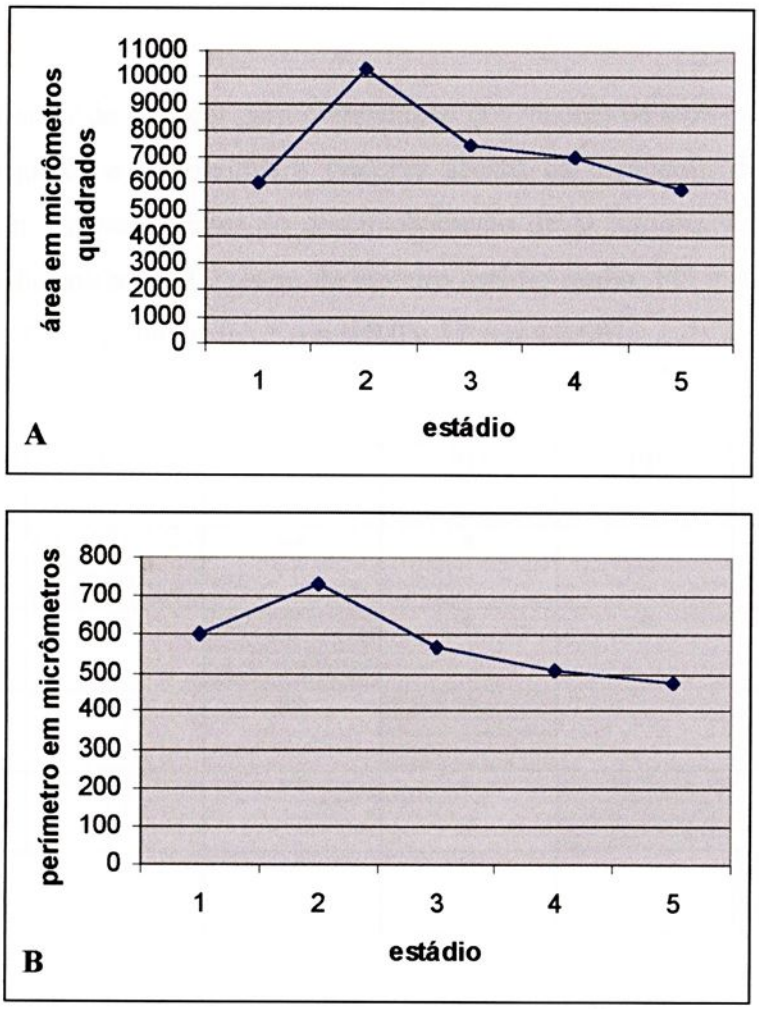


Figura 50 A, B. Variação dos valores de área em μm^2 (A) e do perímetro em μm (B) das glândulas salivares de *D. saltans*, ao longo do desenvolvimento. 1 = larva de 3º estádio inicial; 2 = larva de 3º estádio tardio; 3 = puparium; 4 = pré-pupa e 5 = pupa média.

Tabela 5. Teste *t* de Student para comparação dos valores de área (valores acima do eixo diagonal) e do perímetro (valores abaixo da diagonal), das glândulas salivares entre diferentes fases do desenvolvimento de *D. saltans*. L_3i = larva de terceiro estádio inicial, L_3T = larva de terceiro estádio tardio, PU = puparium, PP = pré-pupa e PM = pupa média. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,001$.

	L_3i	L_3T	PU	PP	PM
L_3i		**	*		
L_3T	**		*	*	**
PU		**			*
PP	**	**	*		
PM	**	**	**		

V. DISCUSSÃO

A histólise das glândulas salivares de *Drosophila* é precedida por modificações morfológicas das estruturas celulares e da própria glândula, que refletem as alterações fisiológicas subjacentes. No presente trabalho, foram analisadas algumas dessas modificações, em *D. saltans*, envolvendo os cromossomos, o nucléolo, o cromocentro, o citoplasma e o próprio tamanho da glândula. As análises foram realizadas no desenvolvimento, entre a fase de larva de terceiro estádio e a histólise das glândulas, na fase de pupa média.

Os cromossomos politênicos de *D. saltans* são em número de três pares, cujas regiões heterocromáticas associam-se formando uma estrutura denominada cromocentro. Esses cromossomos atingem seu maior tamanho em larvas de terceiro estádio tardio. Nessa fase, a diferenciação em bandas e interbandas é bem nítida e os cromossomos coram-se fortemente pela orceína lacto-acética e pelo Feulgen. A microscopia eletrônica mostrou a mesma organização, já conhecida na literatura, de longa data.

Na microscopia de fluorescência, o alaranjado de acridina corou, como esperado, o DNA em verde, reforçando as observações quanto à integridade morfológica e funcional desses cromossomos, na fase de larva de terceiro estádio tardio. Os pufes presentes nesses cromossomos mostraram coloração alaranjada ou vermelha, que caracteriza a presença de RNA, produto da transcrição dos genes presentes nesses pufes.

Vimos que à medida que o desenvolvimento avança, caminhando para a histólise, na fase de pupa média, a estrutura de bandas e interbandas vai desaparecendo para dar lugar a um emaranhado tênue de

filamentos ou massas de DNA. As alterações não atingem o cromossomo inteiro, simultaneamente, podendo haver regiões alteradas e não alteradas em um mesmo cromossomo. Isto foi visto tanto em microscopia de luz, como na eletrônica. Da mesma forma, essas alterações não ocorrem simultaneamente em todas as células, podendo-se encontrar em uma mesma glândula, células com diferentes graus de deterioração cromossômica. O fato de se ter encontrado, no presente trabalho, uma única glândula em várias pupas médias dissecadas para o preparo de lâminas, mostra que as próprias glândulas podem ser diferencialmente afetadas no tempo, no processo que leva à histólise.

Em glândulas salivares em estado avançado de alteração, ainda permanecem no núcleo, fracamente diferenciado, resquícios de filamentos cromossômicos que mantêm a coloração verde com o alaranjado de acridina e que permanecem entre os restos celulares, quando as células se rompem.

É importante destacar o fato de que as glândulas salivares de *D. saltans*, em fase de histólise, não mostraram a presença de núcleos picnóticos (condensados), que foram descritos para *D. melanogaster*, nas glândulas salivares (Berendes & Ashburner, 1978; Jiang *et al.*, 1997), em embriões (Abrams *et al.*, 1993; White *et al.*, 1994) e durante a ovogênese (Chao & Nagoshi, 1999; Nezis *et al.*, 2002), assim como em outros organismos, tais como *Leishmania major* (Arnoult *et al.*, 2002), *Tetrahymena* (Mpoke & Wolfe, 1997), camundongo (Jaggi, 1998) e humanos (Kerr *et al.*, 1972; Oberhammer *et al.*, 1993; Harmon & Allan, 1997).

O alaranjado de acridina tem sido usado para identificar células

apoptóticas em embriões de *Drosophila* (Abrams *et al.*, 1993; White *et al.*, 1994), mas poucos detalhes foram publicados sobre quais estruturas são coradas (Mpoke & Wolfe, 1997). É empregado de duas maneiras: como corante metacromático em tecidos fixados, corando diferencialmente os ácidos nucléicos de fita única em alaranjado e de fita dupla, em verde (Darzynkiewicz, 1990) e como corante vital, servindo como indicador de pH ácido, que em compartimentos como lisossomos e fagossomos, causa uma fluorescência vermelho-alaranjada. Em *Tetrahymena*, Mpoke & Wolfe (1997), utilizando o alaranjado de acridina como corante vital, observaram que os núcleos apoptóticos em estágio adiantado de degeneração coravam-se em vermelho-alaranjado, sugerindo que se tornavam compartimentos acídicos.

Nas lâminas preparadas por esmagamento, no presente trabalho, as células das glândulas salivares tiveram os núcleos rompidos, impedindo que estes fossem corados como um compartimento fechado. Nas pupas médias de *D. saltans*, fase em que ocorre a histólise das glândulas salivares, a coloração com alaranjado de acridina, nos núcleos rompidos, destacou a estrutura alterada dos cromossomos, mas ainda manteve a coloração predominantemente verde que foi observada na fase de larva. Em alguns casos em que os núcleos não se romperam, foi possível observar a coloração vermelho-alaranjada indicativa da alteração de pH, mencionada pelos autores referidos.

Outro aspecto importante, no presente trabalho, foi a observação, junto aos cromossomos, de vesículas que aumentam em número e tamanho à medida que a alteração cromossômica progride. Essas vesículas

aparecem freqüentemente associadas aos cromossomos. Coram-se pela orceína lacto-acética, e também pela técnica de Feulgen, no tom rosa característico de ambas. Já o alaranjado de acridina cora, predominantemente, o envoltório em alaranjado e o conteúdo em verde, ou ambos em alaranjado. Aventamos a hipótese de que sejam corpos fagocíticos que englobam partes do material nuclear (cromossomos e nucléolos). Na microscopia eletrônica observamos uma estrutura, no interior do núcleo, que poderia corresponder a essa descrição. Na literatura não há referência a essas formações no interior do núcleo.

Paralelamente às alterações que ocorrem no núcleo, com o desenvolvimento, também verificamos, em microscopia de luz e principalmente em microscopia eletrônica, uma quantidade grandemente aumentada e heterogênea de estruturas vacuolares e vesiculares presentes no citoplasma, no período que antecede o desaparecimento da glândula. A observação dessas glândulas, ao microscópio eletrônico, mostrou a presença de mitocôndrias, vesículas de secreção, vacúolos autofágicos contendo no seu interior restos do que parecem mitocôndrias e de outras estruturas membranosas, bem como estruturas não diagnosticadas. Aparentemente, nessa fase, ocorre intensa eliminação de material para o lume da glândula. Com o alaranjado de acridina algumas dessas formações mostraram coloração verde ou alaranjada. A interpretação com base na literatura é de que essas estruturas possam corresponder a lisossomos e fagossomos. Mpoke & Wolfe (1997) verificaram que os lisossomos nas células apoptóticas de *Tetrahymena* circundam o núcleo em fase de morte apoptótica.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

A presença de vacúolos autofágicos, no citoplasma, como os observados no presente trabalho, em *D. saltans*, foram também descritos por Lee & Baehrecke (2001), em *D. melanogaster,* utilizando a técnica de cortes histológicos e a análise ao microscópio eletrônico. Essa observação foi a base para a classificação da MCP das glândulas salivares de *Drosophila*, por esses autores, como sendo autofágica, conforme foi mencionado na Introdução.

Com relação ao nucléolo, nas células das glândulas salivares de larvas de terceiro estádio tardio de *D. saltans*, ele geralmente é único, de forma aproximadamente arredondada ou ovalada, corando-se intensamente em marrom escuro pelo nitrato de prata e em alaranjado ou vermelho com o alaranjado de acridina.

Tanto na microscopia de luz como na eletrônica, o nucléolo das células das glândulas salivares de *D. saltans*, na fase de larva de terceiro estádio, mostra uma estrutura não homogênea, com regiões mais, ou menos condensadas. As regiões mais condensadas parecem ser massas de filamentos e grânulos anastomosados, que são descritos na literatura como massa de RNP (ribonucleoproteína nucleolar) (Thiry & Goessens, 1996). As regiões menos densas são os interstícios e os vacúolos. Às vezes, o nucléolo pode apresentar uma estrutura mais homogênea, mas, já se sabe que o estado funcional da célula é um elemento importante na determinação de variações dessa estrutura (Derenzini *et al.*, 1998; Abdo-Banhos, 2000).

Em algumas células, podem ser observados dois ou mais corpúsculos nucleolares, e neste caso, esses nucléolos adicionais são bem menores



e parecem associar-se a outras regiões cromossômicas que não as anteriormente referidas, do cromossomo X. Essas outras regiões poderiam ser organizadoras nucleolares secundárias, como foi descrito por Bicudo & Richardson (1977), em espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (grupo *repleta*).

O nitrato de prata cora o nucléolo porque se associa às proteínas B23 (numatrina) e C23 (atualmente designada por nucleolina), que estão envolvidas na biogênese ribossômica (Lischwe *et al.*, 1979). Nas larvas de terceiro estádio, o nucléolo cora-se pelo nitrato de prata, em toda a sua extensão. Nas fases mais adiantadas do desenvolvimento, porém, a coloração se restringe a partes do nucléolo, sugerindo que ocorre uma modificação na distribuição daquelas proteínas e consequentemente, na localização da biogênese dos ribossomos.

Como vimos na Introdução, dados moleculares (Stegh *et al.*, 1998) sugerem que a proteína DEDD, componente da via apoptótica, que conduz à ativação das caspases, migra do citoplasma para o núcleo e, neste, para o nucléolo, onde desliga as atividades biossintéticas. De fato, a partir de um certo momento, já não se visualiza material corado com nitrato de prata no núcleo das células das glândulas salivares em processo de histólise. Assim, durante a MCP, o nucléolo passa a ser visto não como um corpúsculo único e bem delimitado, mas como massas dispersas em meio aos cromossomos alterados, que posteriormente já não são visíveis. Permanece a possibilidade de que o material alterado, nucleolar e cromossômico, seja eliminado pela ação de vesículas autofágicas vistas no núcleo associadas ou não aos cromossomos, com o uso das várias

unesp

técnicas, inclusive em algumas células coradas pelo nitrato de prata. A desagregação do nucléolo em células em fase de apoptose foi mencionada por Jaggi (1998) em glândula mamária de camundongo. Em cultura de células humanas, induzidas a apoptose por estresse hipertônico, foi observada a formação de corpúsculos nucleolares que são eliminados para o citoplasma e posteriormente para o interior de bolhas que se formam na superfície citoplasmática. Nesse local, os corpúsculos nucleolares ainda contêm proteínas do organóide, como a fibrilarina (Pelliciari *et al.*, 2000).

A coloração com o alaranjado de acridina, em fases bastante avançadas do processo de eliminação das glândulas salivares, mostra a presença constante, no interior do núcleo, de uma formação globular mais densa, localizada próxima ao limite entre o núcleo e o citoplasma. Essa formação pode ser o nucléolo, reorganizado e agora envolvido apenas no controle da MCP, uma vez que não foi detectada com a técnica de impregnação pelo nitrato de prata. Sua estrutura é consistente e aparentemente homogênea quando corada com o alaranjado de acridina, permanecendo íntegra nos espaços entre as células, quando estas se rompem. Encontra-se geralmente associada a restos de filamentos cromossômicos e é especialmente visível em núcleos parcialmente vazios. Sugerimos ainda que esse material cromossômico que aparece associado a esse possível nucléolo, seja formado por restos da heterocromatina. Pelas nossas observações, tanto em microscopia de luz como na eletrônica, a heterocromatina ainda se encontra aparentemente intacta, quando a maior parte dos cromossomos já se encontra bastante alterada.

As técnicas de Feulgen e orceína lacto-acética, não coram o nucléolo, mas, coram a heterocromatina associada ao nucléolo, que na *Drosophila* contém os genes ribossômicos (Pardue *et al.*, 1970; Bicudo & Richardson, 1981). A heterocromatina associada ao nucléolo mantém prolongamentos para a região organizadora nucleolar (RON), localizada nos cromossomo. No presente trabalho, essa associação foi vista tanto em microscopia de luz como na eletrônica.

Em *D. saltans*, a ligação da heterocromatina associada ao nucléolo se faz com a região centromérica do cromossomo X ou com região próxima dessa. Contudo, não conseguimos ainda determinar em qual dos braços cromossômicos do X (que é metacêntrico), localiza-se a RON. Bicudo (1967) descreveu a sua localização no braço XR. No presente estudo, há indicação tanto para a presença da RON no braço XL, como para o braço XR. Portanto, permanece a dúvida, que não pode ser resolvida pela técnica do nitrato de prata, aplicada aos cromossomos mitóticos, porque em insetos, freqüentemente, não ocorre a marcação específica.

Em *D. saltans*, como mencionado anteriormente, ocorre a formação de um cromocentro pela associação das regiões heterocromáticas centroméricas de todos os cromossomos. Sob pressão na lamínula, os cromossomos se separam, verificando-se que a maior parte do cromocentro permanece associada à região centromérica do par de cromossomos II, que é metacêntrico.

O cromocentro, sendo heterocromático, cora-se diferencialmente pela técnica de bandamento C. Mas como é uma região condensada, também se

destaca pela coloração com orceína lacto-acética e Feulgen. A observação mais cuidadosa do cromocentro, corado com essas técnicas, mostra, na fase de larva, a existência de uma pequena região compacta mais corada, geralmente em forma de grânulo. Esse grânulo cora-se também intensamente pela prata, sugerindo que pode conter material nucleolar. Como mencionamos, em *D. saltans*, o nucléolo se associa à região heterocromática. Bicudo & Richardson (1981), observaram que a hibridação *in situ* com rRNA marca não só o interior do nucléolo, como avança pelo filamento que une a heterocromatina à região organizadora nucleolar.

O cromocentro é uma estrutura que tem despertado o interesse dos pesquisadores desde longa data (Heitz, 1934; Zhang & Spradling 1995; Berghella & Dimitri, 1996). Na verdade, a heterocromatina, de uma maneira geral, representa um dos componentes mais intrigantes dos genomas eucariotos. Citologicamente densa permanece condensada através do ciclo celular, replica tardiamente na fase S e tem uma grande proporção de DNA altamente repetitivo (John, 1988). Em *D. melanogaster*, a heterocromatina ocupa aproximadamente um terço do genoma (Adams *et al.*, 2000), contém poucos genes mutáveis e uma alta proporção de seqüências repetitivas (Gatti & Pimpinelli, 1992).

Como mencionamos anteriormente, sugerimos que essa região esteja envolvida no processo de MCP das glândulas salivares de *D. saltans*. A natureza repetitiva do DNA heterocromático e sua habilidade em inibir a função gênica eucromática, levaram alguns autores a sugerir que a heterocromatina é meramente "junk" DNA (DNA "lixo"), não tendo utilidade na célula. Todavia, a visão da heterocromatina como "inerte" é baseada na ausência de conhecimento e



incompletas análises estruturais e funcionais (Leach *et al.*, 2000). Muitas funções essenciais residem nas regiões heterocromáticas, incluindo os genes para rRNA, assim como genes requeridos para a viabilidade e fertilidade (Gatti & Pimpinelli, 1992). Em adição, a heterocromatina desempenha um papel chave na segregação cromossômica, uma vez que contém elementos responsáveis pelo pareamento meiótico, coesão entre as cromátides irmãs, função centromérica e formação do cinetócoro (Dej & Orr-Weaver, 2000; Sullivan *et al.*, 2001).

O DNA ribossômico, responsável pela produção de RNA ribossômico, tem sido mapeado próximo ou dentro da heterocromatina mitótica em vários organismos, como a *Drosophila* (Pardue & Dawid, 1981). Assim, a heterocromatina constitutiva abriga as regiões organizadoras nucleolares, e dados da literatura sugerem que essa localização é funcionalmente importante, podendo a heterocromatina atuar como reguladora da atividade das RONs (Spofford, 1976; Durica & Krider, 1977, 1978).

Nos últimos anos foram identificadas várias proteínas, fisiologicamente importantes, na heterocromatina, incluindo as proteínas SIR, envolvidas com o envelhecimento celular, na levedura (Grunstein, 1998), e HP1, Su (var)3-7 e ORC, nos organismos superiores (Wallrath, 1998; Zhao *et al.*, 2001). A compreensão de como essas e outras proteínas contribuem para a estrutura da heterocromatina e como se relacionam com as funções dinâmicas da mesma estão começando a ser estudadas (Brown *et al.*, 1997; Murzina *et al.*, 1999).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Os cromossomos politênicos, dado seu tamanho avantajado, constituem um material muito bom para estudos citogenéticos da heterocromatina. Apesar da mesma estar sub-replicada nos cromossomos politênicos (isto é, ela não amplia sua quantidade nos mesmos níveis da eucromatina), foi possível obter várias informações analisando esse material. Segundo Leach *et al.* (2000), nas células politênicas as seqüências heterocromáticas estão sub-replicadas porque a Fase S termina antes que a replicação da heterocromatina esteja completada, gerando DNAs heterocromáticos truncados. Esses autores propuseram que as seqüências satélites heterocromáticas representam uma barreira para a replicação do DNA. Assim, na glândula salivar larval, os cromossomos politênicos excedem 1000c, enquanto as seqüências satélites heterocromáticas nos mesmos cromossomos permanecem com o número de cópias de 2c ou próximo disto.

O cromocentro, em *D. saltans*, apresenta, como já foi mencionado, um grânulo que se cora fortemente com orceína lacto-acética, Feulgen e nitrato de prata. Em *D. melanogaster*, Heitz (1934) distinguiu essas duas regiões, chamando-as de α (para o grânulo corado) e β (para a região mais frouxa ou para o restante do cromocentro). Dados da literatura indicam que o grânulo condensado (heterocromatina α), é a heterocromatina mitótica que sofre pouca ou nenhuma politenização. Já a heterocromatina β não contém seqüências altamente repetitivas, replica pelo menos parcialmente durante a politenização e parece ser tão ativa quanto a eucromatina (revisões em John, 1998; Zhang & Spradling, 1995; Berghella & Dimitri, 1996). Em função das características da heterocromatina β, Spofford (1976), cunhou para ela o termo *quasi-*



heterochromatin, com a implicação de que ela não é equivalente à heterocromatina constitutiva.

Não são todas as espécies de *Drosophila* que mostram o corpúsculo denso de heterocromatina α no cromocentro, em lâminas preparadas por esmagamento. As espécies do grupo *virilis* o apresentam, mas, em *D. melanogaster*, as regiões α e β só podem ser vistas em corte (John, 1988). *D. saltans*, analisada no presente trabalho, comporta-se, quanto a esse aspecto, como as espécies do grupo *virilis*.

Como já mencionamos, com o avanço do desenvolvimento, o cromocentro que é volumoso nas espécies do grupo *saltans*, em *D. saltans*, mantém sua estrutura e o intenso grau de coloração por tempo maior do que o material cromossômico. Nas células das glândulas salivares de pupa média, coradas com alaranjado de acridina, o cromocentro aparece como uma estrutura homogênea, corada em verde. Mas em lâminas coradas com orceína ou Feulgen, sua estrutura "desorganizada" ainda é visível. Em células em que os cromossomos já estão bastante alterados, freqüentemente, ainda é possível ver a região do cromocentro bem delimitada.

As mudanças que ocorrem na estrutura nuclear, no encaminhamento para a histólise, são acompanhadas por alterações na síntese protéica, indicada por modificações no padrão de pufes. As modificações no padrão de pufes são induzidas pelo hormônio esteróide ecdisona, o qual dirige a metamorfose da *Drosophila*. A literatura mostra que a atividade gênica é refletida pelo aparecimento de pufes precoces e tardios nos cromossomos politênicos das

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

glândulas salivares. Quando a ecdisona se liga a seu receptor, dá início a uma cascata de sinais bioquímicos, na qual os inibidores da MCP são reprimidos e os ativadores são ligados (Fletcher *et al.*, 1995; Baechrecke & Thummel, 1995).

Pulsos do hormônio ecdisona dirigem as principais transições do desenvolvimento durante o ciclo de vida da *Drosophila*. Os pulsos melhor caracterizados ocorrem no final do terceiro estádio larval, encaminhando para a formação do pupário e sinalizando a formação da pré-pupa. No final do estádio de pré-pupa ocorre um outro pulso de ecdisona que marca a transição pré-pupa – pupa (Fletcher *et al.*, 1995). Esses foram os períodos do desenvolvimento escolhidos para a análise do padrão de pufes, no presente trabalho. Os pufes mais destacados foram registrados e seu comportamento acompanhado nessas duas fases. Maior número de pufes regride do que se forma entre as fases de larva de terceiro estádio tardio e pré-pupa. A intensa alteração estrutural dos cromossomos na fase de pupa média impediu que o padrão de pufes fosse analisado nessa fase.

Em todos os braços cromossômicos, na fase de larva de terceiro estádio tardio foram observados vinte e três pufes. Vinte e um deles reduziram seu diâmetro entre essa fase e a de pré-pupa, sendo que doze retornaram à morfologia normal das bandas envolvidas, o que provavelmente significa cessação da transcrição. Porém, onze mantiveram-se em atividade, embora reduzida, e três novos pufes surgiram.

A partir da literatura, sabe-se que em *D. melanogaster* um pico na atividade de pufação ocorre aproximadamente 4 horas antes da eversão da cabeça (Ashburner, 1972) e em *D. hydei* um aumento na atividade de pufação é

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

observado durante as primeiras 5-10 horas depois da formação do pupário (Berendes, 1965). Além disso, em *D. melanogaster*, as células das glândulas salivares são, durante o período de pré-pupa, muito ativas na síntese de novas proteínas, entre as quais estão muitos tipos de proteínas que não são sintetizadas por glândulas larvais (Tissières *et al.*, 1974). Portanto, parece haver uma variação entre as espécies, quanto aos momentos de maior atividade de pufação.

É possível que a atividade de alguns dos pufes observados na fase de pré-pupa, em *D. saltans*, esteja relacionada com a MCP das glândulas salivares. Contudo, uma ligação entre pufes e apoptose como a observada em *D. melanogaster*, não foi possível nesta etapa do trabalho. Em *D. melanogaster*, os genes E74 e E93, correspondentes aos pufes 74EF e 93F, respectivamente, estão envolvidos no processo, sendo ativados pela ecdisona (Fletcher *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000). A utilização de anticorpos para esses dois pufes permitiria reconhecer sua localização em *D. saltans*.

Neste trabalho, uma visão geral da glândula salivar em fase próxima da histólise mostrou que ela tem uma estrutura frágil, e que em baixo aumento, ao microscópio de luz, abriga formações globulares com diferentes tamanhos. É interessante mencionarmos também, estruturas que foram vistas em várias lâminas coradas com o alaranjado de acridina, de glândulas em estado avançado de MCP, preparadas por esmagamento. Essas estruturas são principalmente filamentosas ou fusiformes, de diâmetro e comprimento variáveis. A impressão que se tem é que essas estruturas derivam da massa citoplasmática ou das membranas celulares e aparentemente vão sofrendo redução em seu diâmetro

até que haja apenas um tênue emaranhado de filamentos. Às vezes, é possível ver a presença de estruturas filamentares no limite (que é pouco nítido), entre o núcleo e o citoplasma de células rompidas. Nessa fase, já não são visíveis estruturas vacuolares e vesiculares na célula, com essa técnica. É nessa fase que a formação globular densa é mais facilmente visível no interior do núcleo, que freqüentemente encontra-se parcialmente vazio.

Na tentativa de organizar as observações e interpretar seu significado, podemos supor que a MCP das glândulas salivares envolve duas fases ou processos: primeiro a eliminação de componentes nucleares e citoplasmáticos por fagocitose e, segundo, a eliminação dos restos celulares por essa desintegração filamentar. Esta última fase estaria sob o controle do nucléolo e da heterocromatina. Essas suposições, porém, requerem estudos para a sua confirmação.

Paralelamente às alterações estruturais celulares, a própria glândula salivar mostra alterações de natureza morfométrica. Medidas de área e perímetro, das glândulas salivares, realizadas para cinco fases do desenvolvimento, mostraram aumento dessas medidas, do terceiro estádio larval inicial para o tardio, e redução a partir dessa fase. A redução foi mais acentuada entre o terceiro estádio tardio e a formação do puparium, tornando-se mais suave a partir dessa fase. A autólise celular parece ser acompanhada de uma diminuição do tamanho das células, que se reflete no tamanho total da glândula. A eliminação dos produtos sintetizados e a própria dissociação de componentes são, possivelmente, parte desse processo de redução de tamanho.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Todas as alterações morfológicas e estruturais observadas no presente trabalho, as quais acompanham o processo de MCP nas glândulas salivares de *D. saltans*, mostram no seu conjunto as dramáticas mudanças a que o processo conduz. Aparentemente, nessas mudanças estão envolvidos vários mecanismos, que atuam de forma orquestrada, nas diferentes estruturas celulares para finalmente eliminar as células glandulares, como é requerido pelo desenvolvimento normal desse organismo. Com o presente trabalho esperamos ter contribuído um pouco para ampliar o conhecimento dessas alterações, mas reconhecemos que resta muito ainda por esclarecer em cada aspecto abordado.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO-BANHOS, C. R.; BICUDO, H. E. M. C.; MANZATTO, A. J. Nucleolar areas and the nucleolar/nuclear ratios in megacolonic neurons of chagasic patients. **Cytobios**, v. 96, p. 45-56, 1998.

ABDO-BANHOS, C. R. Análise, por quantificação, de características nucleolares e nucleares em processos proliferativos tireoidianos. 2000. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Biologia Médica) – Faculdade de medicina, São José do Rio Preto, São Paulo.

ABRAMS, J. M; WHITE, K.; FESSLER L. I.; STELLER, H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. **Development**, v. 117, p. 29-43, 1993.

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A.; GOCAYNE J. D.; *et al.*, The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, p. 2185–2195, 2000.

AMABIS, J. M.; JANCZUR, C. Experimental induction of gene activity in the salivary gland chromosomes of *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae). **J. Cell Biol.**, v. 78, p. 1-7, 1978.

AMABIS, J. M.; SIMÕES, L. C. G. Fisiologia Cromossômica. In: AMABIS, J. M.; MORGANTE, J. S.; SIMÕES, L. C. G. **Textos de Genética.** 1. ed. São Paulo: Ed. Moderna, 1981. v. 1, p. 99-121.

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

ARNOULT, D.; AKARID, K.; GRODET, A.; PETIT, P. X.; ESTAQUIER, J.; AMEISEN, J. C. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. **Cell Death Differ**, v. 9, n. 1, p. 65-81, January, 2002.

ASHBURNER, M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. IV. Induction by ecdysone in salivary glands of *D. melanogaster* cultured in vitro. **Chromosoma**, v. 38, p. 255-281, 1972.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

ASHBURNER, M.; RICHARDS, G. The role of ecdysone in the control of gene activity in the polytene chromosomes of *Drosophila*. In: LAWRENCE, P. A. **Insect development**. New York: New York – Wiley, 1976, p. 203-225.

ASHBURNER, M.; BERENDES, H. D. Puffing of polytene chromosomes. In: ASHBURNER, M. WHIGHT, T. R. F. **The genetics and biology of *Drosophila***. 1. ed. London: Academic Press, 1978. v. 2b, p. 314-395.

ASHBURNER, M.; BONNER, J. J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. **Cell**, v. 17, n. 2, p. 241-254, 1979.

ASHBURNER, M. Puffs, genes and hormones revisited. **Cell**, v. 61, p. 1-3, April 6, 1990.

BAEHRECKE, E. H.; THUMMEL, C. S. The *Drosophila E93* gene from 93F early puff displays stage-and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone. **Developmental Biology**, v. 171, p. 85-97, 1995.

BALBIANI, E. G. Sur la struture du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*. Zool. Anz., v. 4, p. 637-641, 1881. Apud PAVAN, C. Estrutura e função dos cromossomos. In: PAVAN, C., CUNHA, A. B. **Elementos de Genética**. 2. ed. São Paulo: Companhia Ed. Nacional/Ed. da Universidade de São Paulo, 1966. p. 118-157.

BAUER, H. Structure and arrangement of salivary gland chromosomes in *Drosophila* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 22, p. 216-222, 1936.

BECKER, H. J. Die puffs der Speicheldrusenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Beobachtungen zum verhalten des puffmusters im normalstamm und bei zwei mutantem, giant und lethal-giant-larvae. **Chromosoma**, v. 10, p. 654-678, 1959. Apud BERENDES, H. D. The control of puffing in *Drosophila hydei*. In: BEERMANN, W., REINERT, J., URSPRUNG, H. (Ed.) **Results and problems in cell differentiation: Developmental studies on giant chromosomes**. Berlin: Springer, Berlin Heidelberg New York, 1972, v. 4, p. 181-207.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

BEERMANN, W. Nuclear differentiation and functional morfology of chromosomes. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 21, p. 217-232, 1956.

BEERMANN, W. Differentiation at the level of the chromosomes. **Cell Differentiation and Morfogenesis**, p. 24-54, 1966.

BERENDES, H. D. Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. **Chromosoma**, v. 17, p. 35-77, 1965.

BERENDES, H. D.; HOLT, T. K. H. Differenciation of transplanted larval salivary glands of *Drosophila hydei* in adults of the same species. **J. Exp. Zool.**, v. 160, p. 299-317, 1965.

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

BERG, S. **Micro-Scope: An online reference guide to *microscopy*** - Fluorescence microscopy and Fluorophores. Disponível em: <http://www.micro-scope.de/toc.html>. Acesso em: 19 outubro de 2002.

BERGHELLA, L.; DIMITRI, P. The heterochromatic *rolled* gene of *Drosophila melanogaster* is extensively polytenized and transcricionally active in the salivary gland chromocenter. **Genetics**, v. 144, p. 117-125, September, 1996.

BICUDO, H. E. M. C. **Variabilidade cromossômica e isolamento reprodutivo em quatro espécies do subgrupo *saltans* (*Drosophila*)**. 1967. 131f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo.

BICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Gene regulation in *Drosophila mulleri*, *D. Arizonensis* and their hibrids: The nucleolar organizer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 3498-3502, 1977.

BICUDO, H. E. M. C.; RICHARDSON, R. H. Location of ribosomic cistrons in the salivary gland cells of *D. mulleri*, *D. arizonensis* and their hybrids. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 4, n. 3, p. 477-481, 1981.

BICUDO, H. E. M. C. **Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (grupo *repleta*)**. A regulação da atividade organizadora nucleolar. 1982. 104f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo.

BIRNSTIEL, M. L.; HYDE, B. B. Protein synthesis by isolated pea nucleoli. **J. Cell Biol.**, v. 18, p. 41-50, 1963.

BODESTEIN, D. The postembryonic development of *Drosophila*. In: DEMEREC, M. **Biology of *Drosophila***. New York: Wiley and Sons, 1950. p. 275-367.

BREUER, M. E.; PAVAN, C. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. **Chromosoma**, v. 7, p. 371-386, 1955.

BRIDGES, C. B. The structure of salivary chromosomes and the relation of the banding to the genes. **Amer. Natl.**, v. 69, p. 59, 1935.

BROWN, D. D.; GURDON, J. B. Absence of rRNA synthesis in the anucleolate mutant of *X. laevis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 51, p. 139-146, 1964.

BROWN, K. E.; GUEST, S. S.; SMALES, S. T.; HAHM, K.; MERKENSCHLAGER, M.; FISHER, A. G. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. **Cell**, v. 91, p. 845-854, December 12, 1997.

BURTIS, K. C.; THUMMEL, C. S.; WELDON, J.; KARIM, F. D.; HOGNESS, D. S. The *Drosophila* 74EF early puff contains *E74*, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. **Cell**, v. 61, p. 85-99, April 6, 1990.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

CHAO, S. H.; NAGOSHI, R. N. Induction of apoptosis in the germline and follicle layer of *Drosophila* egg chambers. **Mechanisms of Development**, v. 88, p. 159-172, 1999.

CHEN, P.; NORDSTROM, H.; GISH, B.; ABRAMS, J. M. *Grim*, a novel cell death gene in *Drosophila*. **Genes & Dev.**, v. 10, p. 1773-1782, 1996.

CHEN, P.; RODRIGUEZ, A.; ERSKINE, R.; THACH, T.; ABRAMS, J. M. Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim and hid in *Drosophila*. **Dev. Biol.**, v. 201, n. 2, p. 202-216, September 15, 1998.

CHINNAIYAN, A. M.; CHAUDHARY, D.; O'ROURKE, K.; KOONIN, E. V.; DIXIT, V. M. Role of CED-4 in the activation of CED-3. **Nature**, v. 388, p. 728-729, 1997.

COMAI, L. The nucleolus: a paradigm for cell proliferation and aging. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1473-1478, 1999.

DARZYNKIEWICZ, Z. Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content. In: DARZYNKIEWICZ, Z.; ROBINSON, J.; CRISSMAN, H. **Methods in Cell Biology**. San Diego: Academic Press, 1990. v. 41, p. 401-420.

D'AVINO, P. P.; CRISPI, S.; POLITO, L. C.; FURIA, M. The role of the *BR-C* locus on the expression of genes located at the ecdysone-regulated 3C puff of *Drosophila melanogaster*. **Mechanisms of Development**, v. 49, p. 161-171, 1995.

DEJ, K. J.; ORR-WEAVER, T. L. Separation anxiety at the centromere. **Trends Cell Biol.**, v. 10, p. 392-399, 2000.

DEMEREC, M.; KAUFMANN, B. P. ***Drosophila* Guide**. The Lord Baltimore Press, Baltimore, Maryland, 1945.

DERENZINI, M.; TRERE, D.; PESSION, A.; MONTANARO, L.; SIRRI, V.; OCHS, R. L. Nucleolar function and size in cancer cells. **American Journal of Pathology**, v. 152, p. 1291-1297, 1998.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

DORSTYN, L.; COLUSSI, P. A.; QUINN, L. M.; RICHARDSON, H.; KUMAR, S. DRONC, an ecdysone-inducible *Drosophila* caspase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 4307-4312, April, 1999a.

DORSTYN, L.; STUART, H. R.; QUINN, L. M.; RICHARDSON, H. DECAY, a novel *Drosophila* caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30778-30783, October 22, 1999b.

DOUMANIS, J.; QUINN, L.; RICHARDSON, H.; KUMAR, S. STRICA, a novel *Drosophila melanogaster* caspase with an unusual serine/threonine-rich prodomain, interacts with DIAP1 and DIAP2. **Cell Death Differ**, v. 8, n. 4, p. 387-394, April, 2001.

DURICA, D. S.; KRIDER, H. M. Studies on the ribosomal RNA cistrons in interspecific *Drosophila* hybrids. I. Nucleolar dominance. **Develop. Biol.**, v. 59, p. 62-74, 1977.

DURICA, D. S.; KRIDER, H. M. Studies on the ribosomal RNA cistrons in interspecific *Drosophila* hybrids. II. Heterochromatic regions mediating nucleolar dominance. **Genetics**, v. 89, p. 37-64, 1978.

DWORNICZAK, R.; SEIDEL, R.; PONGS, O. Puffing activities and binding of ecdysteroid to polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. **The EMBO Journal**, v. 2, n. 8, p. 1323-1330, 1983.

EVANS, H. J.; BUCKLAND, R. A.; PARDUE, M. L. Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. **Chromosoma**, v. 48, p. 405-426, 1974.

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

FARKAS, R.; MECKLER, B. M. **Ecdysone-triggered apoptosis of *Drosophila* salivary glands requires interaction between *l(2)gl, zipper* and *BCR*.** 2000b. Disponível em: <http://www.faseb.org/genetics/dros00/html/f73.htm>. Acesso em: 30 novembro 2002.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

FLETCHER, J. C.; BURTIS, K. C.; HOGNESS, D. S.; THUMMEL, C. S. The *Drosophila E74* gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. **Development**, v. 121, p. 1455-1465, 1995.

FRASER, A. G.; EVAN, G. Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2805-2813, 1997.

GARCIA, S. N.; PILLUS, L. Net results of nucleolar dynamics. **Cell**, v. 97, p. 825-828, June 25, 1999.

GATTI, M.; PIMPINELLI, S. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Annu. Rev. Gen.**, v. 26, p. 239-275, 1992.

GINISTY, H.; SICARD, H.; ROGER, B.; BOUVET, P. Structure and functions of nucleolin. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 761-772, 1999.

GRETHER, M. E.; ABRAMS, J. M.; AGAPITE, J.; WHITE, K.; STELLER, H.; The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. **Genes Dev.**, v. 9, p. 1694-1708, 1995.

GRUNSTEIN, M. Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. **Cell**, v. 93, p. 325-328, May 1, 1998.

GUERRA, M. S. Os ciclos endomitóticos e os cromossomos politênicos. In:___ **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1997. p. 36-44.

HARMON, B. V.; ALLAN, D. J. Apoptosis. **Advances in Genetics**, v. 35, p. 35-56, 1997.

HARVEY, N. L.; DAISH, T.; MILLS, K.; DORSTYN, L.; QUINN, L. M.; READ, S. H.; RICHARDSON, H.; KUMAR, S. Characterization of the *Drosophila* caspase, DAMM. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 27, p. 25342-25350, July 6, 2001.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

HEITZ, E.; BAUER, H. Beweise fur die chromosomennatur der kernschdeifen in den knaulkernen von *Bibio hortulanus.* **L. Z. Zellforsch**, v. 17, p. 57-62, 1933. Apud PAVAN, C. Estrutura e função dos cromossomos. In: PAVAN, C., CUNHA, A. B. **Elementos de Genética**. 2 ed. São Paulo: Companhia Ed. Nacional/Ed. da Universidade de São Paulo, 1966, p. 118-157.

HEITZ, E. Über α- and β-heterochromatinization sowie konstanz und bau der chromomeren bei *Drosophila*. **Biol. Zentralbl.**, v. 54, p. 588-609, 1934. Apud BERGHELLA, L.; DIMITRI, P. The heterochromatic *rolled* gene of *Drosophila melanogaster* is extensively polytenized and transcricionally active in the salivary gland chromocenter. **Genetics**, v. 144, p. 117-125, September, 1996.

HENDERSON, A. S.; WARBURTON, D.; ATWOOD, K. C. Location of ribosomal RNA in the human chromosome complement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 69, p. 3394-3398, 1972.

HENDERSON, A. S.; WARBURTON, D.; ATWOOD, K. C. Location of rRNA in the chimpanzee (*Pan troglodytes*) chromosome complement. **Chromosoma**, v. 46, p. 435-441, 1974a.

HENDERSON, A. S.; EICHER, E. M.; YU, M. T.; ATWOOD, K. C. The chromosomal location of ribosomal DNA in the mouse. **Chromosoma**, v. 49, p. 155-160, 1974b.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, October 12, 2000.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

HSU, T. C.; SPIRITO, S. E.; PARDUE, M. L. Distribution of 18S + 28S ribosomal gene in mammalian genomes. **Chromosoma**, v. 53, p. 25-36, 1975.

HUET, F.; RUIZ, C.; RICHARDS, G. Puffs and PCR: the *in vivo* dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*. **Development**, v. 118, p. 613-627, 1993.

INOHARA, N.; KOSEKI, T.; HU, Y.; CHEN, S.; NÚÑEZ, G. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 10717-10722, September, 1997.

JAGGI, R. **Morphological changes during programmed cell death (PCD) in the involuting mouse mammary gland**. 1998. Disponível em: <http://mammary.nih.gov/reviews/development/jaggi001/>. Acesso em: 10 dezembro 2002.

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

JIANG, C.; LAMBLIN, A. F. J.; STELLER, H.; THUMMEL, C. S. A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. **Molecular Cell**, v. 5, p. 445-455, March, 2000.

JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: VERMA, R. S. **Heterochromatin: Molecular and Strutural Aspects**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988, p. 1-147.

KEEGAN, J.; SCHMERER, M.; RING, B.; GARZA, D. The 62E early-late puff of *Drosophila* contains D-spinophilin, an ecdysone-inducible PDZ-domain protein dynamically expressed during metamorphosis. **Gen. Res.**, v. 77, p. 27-39, 2001.

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.

KIRSCHBAUM, W. F. Feulgen stain at room temperature of *Drosophila melanogaster* salivary gland chromosomes. **DIS**, v. 50, p. 195, 1973.

LEACH, T. J.; CHOTKOWSKI, H. L.; WOTRING, M. G.; DILWITH, R. L.; GLASER, R. L. Replication of heterochromatin and structure of polytene chromosomes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 17, p. 6308-6316, September, 2000.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

LEE, C. Y.; WENDEL, D. P.; REID, P.; LAM, G.; THUMMEL, C. S.; BAEHRECKE, E. H. *E93* directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. **Molecular Cell**, v. 6, p. 433-443, August, 2000.

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

LEENDERS, H. J.; DERKSEN, J.; MAAS, P. M. J. M.; BERENDES, H. D. Selective indution of a giant puff in *Drosophila hydei* by vitamin B_6 and derivatives. **Chromosoma**, v. 41, p. 447-460, 1973.

LISCHWE, M. A.; SMETANA, K.; OLSON, M. O.; BUSH, H. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. **Life Sci.**, August 20, v. 25, n. 8, p. 701-708, 1979.

McCALL, K.; STELLER, H. Facing death in the fly: genetic analysis of apoptosis in *Drosophila*. **Trends Genet.**, v. 13, p. 222-226, 1997.

McCARTHY, J. C.; DIXIT, V. M. Apoptosis induced by *Drosophila* Reaper and Grim in a human system. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 24009-24015, 1998.

McCLINTOCK, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Z. Zellforsch. Mikrosk.**, v. 21, p. 294-398, 1934.

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

METZ, C. W. Structure of the salivary gland chromosomes in *Sciara*. **J. Hered.**, v. 26, p. 177-188, 1935.

MONESI, N.; FERNANDEZ, M. A.; FONTES, A. M.; BASSO-JR, L. R. B.; NAKANISHI, B. B.; BUTTIN, G.; PAÇO-LARSON, M. L. Molecular characterization of an 18 Kb segment of DNA puff C4 of *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). **Chromosoma**, v. 103, p. 715-724, 1995.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

MPOKE, S. S.; WOLFE, J. Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: application to macromolecular elimination in *Tetrahymena*. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 45, n. 5, p. 675-683, 1997.

MURZINA, N.; VERREAULT, A.; LAUE, E.; STILLMAN, B. Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. **Mol. Cell**, v. 4, p. 529- 540, October, 1999.

NANYA, S. **Estudo de cromossomos politênicos e da síntese protéica sob efeito de choques de temperatura, em *Drosophila mulleri, D. arizonensis* e híbridos.** 1993. 130f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo.

NEZIS, I. P.; STRAVOPODIS, D. J.; PAPASSIDERI, I.; ROBERT-NICOUD, M.; MARGARITIS, L. H. Dynamics of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stages of *Drosophila* oogenesis. **Cell Tissue Res.**, v. 307, n. 3, p. 401-409, March, 2002.

NICOLETTI, I.; MANNUCCI, R. **Fluorescence microscopy analysis of nuclear alterations during apoptosis.** Disponível em: <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/chap3.htm>. Acesso em: 20 outubro 2002.

OBERHAMMER, F.; FRITSCH, G.; SCHMIED, M.; PAVELKA, M.; PRINTZ, T. PURCHIO, T.; LASSMANN, H.; SCHULTE-HERMANN, R. 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.

OLSON, M. O. J.; DUNDR, M.; SZEBENI, A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. **Trends in Cell Biology**, v. 10, p. 189-196, May, 2000.

PAINTER, T. S. A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. **Science,** v. 78, n. 2034, p. 585-586, December 22, 1933.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

PARDUE, M. L.; GERBI, S. A.; ECKHARDT, R. A.; GALL, J. G. Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. **Chromosoma**, v. 29, p. 268-290, 1970.

PARDUE, M. L. Localization of repeated DNA sequences in *Xenopus* chromosomes. **Symp. Quant. Biol.**, v. 38, p. 475-482, 1974.

PARDUE, M. L.; HSU, T. C. Locations of 18S and 28S ribosomal genes in the chromosomes of the Indian Muntjac. **J. Cell Biol.**, v. 64, p. 251-254, 1975.

PARDUE, M. L.; DAWID, I. B. Chromosomal locations of two DNA segments that flank ribosomal insertion-like sequences in *Drosophila*: flanking sequences are mobile elements. **Chromosoma**, v. 83, p. 29-43, 1981.

PAVAN, C. **Brookhaven Symp. Biol.**, v. 18, p. 222, 1965. Apud AMABIS, J. M.; SIMÕES, L. C. G. Fisiologia Cromossômica. In: AMABIS, J. M.; MORGANTE, J. S.; SIMÕES, L. C. G. **Textos de Genética.** 1. ed. São Paulo: Ed. Moderna, 1981. v. 1, p. 99-121.

PAVAN, C.; BASILE, R. Chromosome changes induced by infections in tissues of *Rhynchosciara angelae*. **Science**, v. 151, p. 1556-1558, 1966.

PEDERSON, T. Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 3, p. 111-112, 2002.

PELLICCIARI, C.; BOTTONE, M. G.; SCOVASSI, A. I.; MARTIN T. E.; BIGGIOGERA, M. Rearrangement of nuclear ribonucleoproteins and extrusion of nucleolus-like bodies during apoptosis induced by hypertonic stress. **Eur. J. Histochem.**, v. 44, n. 3, p. 247-254, 2000.

PERRY, R. P. The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 48, p. 2179-2186, 1962.

PERRY, R. P. The nucleolus and the syntesis of ribosomes. **Nat. Cancer Inst. Monogr.**, v. 18, p. 325-340, 1965.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

RITOSSA, F. M. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.

RODMAN, T. C. Control of polytenic replication in Dipteran larvae. I. Increased number of cicles in a mutant strain of *Drosophila melanogaster*. **J. Cell. Physiol.**, v. 70, p. 179-186, 1967.

SCHÄFER, V.; KUNZ, W. Two separated nucleolus organizers on the *Drosophila hydei* Y chromosome. **Molec. Gen. Genet.**, v. 137, 365-368, 1975.

SEMESHIN, V. F.; BARICHEVA, E. M.; BELYAEVA, E. S.; ZHIMULEV, I. F. Electron microscopical analysis of *Drosophila* polytene chromosomes. I. Mapping of the 87A and 87C heat shock puffs in development. **Chromosoma**, v. 87, p. 229-237, 1982.

SEMESHIN, V. F.; BARICHEVA, E. M.; BELYAEVA, E. S.; ZHIMULEV, I. F. Electron microscopical analysis of *Drosophila* polytene chromosomes. II. Development of complex puffs. **Chromosoma**, v. 91, p. 210-233, 1985.

SERFLING, E.; PANITZ, R.; WOBUS, U. Die experimentelle Beeinflussung des puffmusters von riesenchromosomen. I: Puffinduktion durch oxytetracyclin bei *Chironomus thummi*. **Chromosoma**, v. 28, p. 107-119, 1969. Apud SORSA, V. Polytene chromosomes in genetic research. Ed. Ellis Horwood Limited. p. 152-175, 1988.

SONG, Z.; McCALL, K.; STELLER, H. DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. **Science**, v. 275, January 24, 1997.

SORSA, V.; SAURA, A. O. Electron microscopic analysis of the banding pattern in the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Division 1 and 2 of X. **Hereditas**, v. 92, p. 73-83, 1980.

SORSA, V. **Polytene chromosomes in genetic research.** 1. ed. Inglaterra: Ed. Ellis Horwood, 1988. 289 p.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

SPOFFORD, J. B. Position effect variegation in *Drosophila*. In: Ashburner, M.; NOVITISKI, E. **Genetics and Biology of *Drosophila***. London: Academic Press, 1976. v. 1C, p. 954-1018.

STEGH, A. H.; SCHICKLING O.; EHRET, A.; SCAFFIDI, C.; PETERHÄNSEL, C.; HOFMANN, T. G.; GRUMMT, I.; KRAMMER, H.; PETER, M. E. DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 20, p. 5974-5986, 1998.

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science**, v. 267, p. 1445-1449, March 10, 1995.

SULLIVAN, B. A.; BLOWER, M. D.; KARPEN, G. H. Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, p. 584-596, 2001.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell. Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TABOGA, S. R. **Estudo citoquímico e morfométrico em núcleos e distribuição das fibras no estroma em lesões da próstata humana**. 1997. 103f. Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração em Biologia Celular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

TACAMIZAWA, S.; OKAMOTO, S.; BISHOP, W.; WEN, J.; KIMURA, K.; SANDLER, A. Differential apoptosis gene expression in pediatric tumors of the kidney. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 35, n. 2, p. 390-395, 2000.

TISSIÈRES, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, U. M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. **J. Molec. Biol.**, v. 84, p. 389-398, 1974.

THIRY, M.; GOESSENS, G. The nucleolus during the cell cycle. Berlin: Springer-Verlag, Heidelberg, 1996.

VASKOVA, M.; BENTLEY, A. M.; MARSHALL, S.; REID, P.; THUMMEL, C. S.; ANDRES, A. J. Genetic analysis of the *Drosophila* 63F early puff:

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

characterization of mutations in *E63-1* and *maggie*, a putative tom22. **Genetics**, v. 156, p. 229-244, 2000.

WALLRATH, L. L. Unfolding the mysteries of heterochromatin. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 8, p. 147-153, 1998.

WANG, S. L.; HAWKINS, C. J.; YOO, S. J.; MÜLLER, H. A. J.; HAY, B. A. The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. **Cell**, v. 98, p. 453-463, 1999.

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

WHITE, M. J. D. Os cromossomos politênicos e plumulados. In:___ **Os cromossomos**. São Paulo: Companhia Ed. Nacional/Ed. da Universidade de São Paulo, 1977, p. 59-70.

WHITE, K.; GRETHER, M. E.; ABRAMS, J. M.; YOUNG, L.; FARRELL, K.; STELLER, H. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. **Science**, v. 264, p. 677-683, April 29, 1994.

WHITE, K. P.; RIFKIN S. A.; HURBAN, P.; HOGNESS, D. S. Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. **Science**, v. 286, n. 5447, p. 2179-2184, December 10, 1999.

WYLLIE, A. H. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: BOWEN, I. D.; LOCKSHIM, R. A. **Cell Death in Biology and Patology**. London: Chapman & Hall, 1981, p. 9-34.

ZHANG, P.; SPRADLING, A. C. The *Drosophila* salivary gland chromocenter contains highly polytenized subdomains of mitotic heterochromatin. **Genetics**, v. 139, p. 659-670, February, 1995.

ZHAO, T.; HEYDUK, T.; EISSENBERG, J. C. Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 12, p. 9512-9518, March 23, 2001.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

VII. RESUMO

Foram utilizadas microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão para analisar modificações morfológicas, nas glândulas salivares de *Drosophila saltans*, que antecedem sua histólise, na fase de pupa média. Os cromossomos politênicos mostraram a perda de sua organização característica em bandas e interbandas, dando lugar a um emaranhado tênue ou massas de DNA. Vesículas, cujo número e tamanho aumentam à medida que a alteração cromossômica progride, surgem junto aos cromossomos, parecendo freqüentemente, associadas a eles. Aventamos a hipótese de que sejam corpos fagocíticos que englobam material nuclear (cromossomos e nucléolos). No citoplasma, observa-se uma quantidade grandemente aumentada e heterogênea de estruturas, que constituem vesículas de secreção e vacúolos autofágicos. O nucléolo, geralmente único e arredondado, transforma-se em massas dispersas em meio aos cromossomos alterados, deixando de ser visto em estágios avançados da degeneração celular, em lâminas coradas com nitrato de prata. Entretanto, em células coradas com alaranjado de acridina, foi observado no interior do núcleo, um corpúsculo arredondado, que pode corresponder ao nucléolo desempenhando agora uma função diferente, relacionada com a morte celular programada. O cromocentro, formado pela associação das regiões heterocromáticas centroméricas dos três pares de cromossomos de *D. saltans*, mantém-se íntegro por um tempo maior que as regiões cromossômicas eucromáticas. Ocorrem alterações no padrão de pufes, indicativas de modificações na síntese protéica; aparentemente maior número de pufes regride do que se forma entre as fases de larva de terceiro estádio tardio (L_3T) e pré-pupa. Paralelamente às alterações celulares estruturais, as



glândulas salivares sofrem redução de área e perímetro desde L_3T. No seu conjunto, as alterações morfológicas e estruturais nas células das glândulas salivares mostram as dramáticas mudanças causadas pela morte celular programada, conduzidas por um programa genético altamente orquestrado.

Palavras-chaves: *Drosophila saltans*; glândulas salivares; morte celular programada; cromossomos politênicos; pufes; nucléolo.

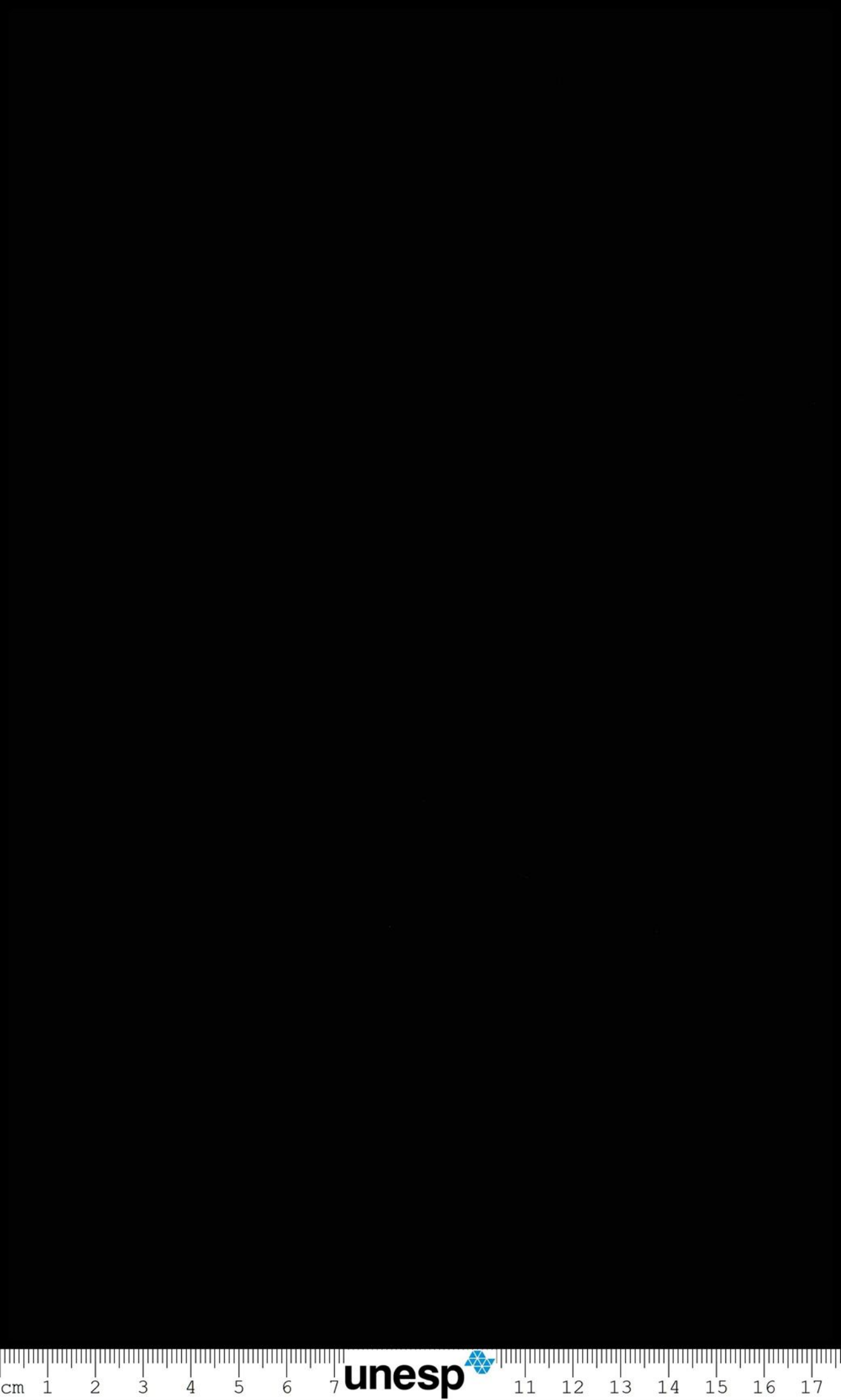
VIII. ABSTRACT

Light microscopy and transmission electron microscopy were used to analyze the morphological modifications that precede histolysis of *Drosophila saltans* salivary glands in the programmed cell death (PCD). The analysis was performed between third larval instar and medium pupal stage in which the histolysis occurs. The polytene chromosomes showed loss of the characteristic organization in bands and interbands, giving place to a tenuous tangle of DNA masses. Vesicles appear close to the chromosomes and frequently associates to them. Their number and size increase as the chromosome alteration progresses. We propose that they are phagocytic bodies that degrade nuclear material (chromosomes and nucleoli). A largely increased quantity of heterogeneous structures, among them secretion vesicles and autophagic vacuoles are observed in the cytoplasm. The nucleolus, generally single and rounded, is disrupted into masses that disperses among the structurally altered chromosomes. In advanced stages of the cellular degeneration, in cells stained with silver nitrate, nucleolar masses are absent. However, in cells stained with acridine orange, a rounded corpuscle is seen into the nucleus that may be the nucleolus performing now a different role, related to the PCD. The chromocenter, formed by the association of the heterochromatic centromeric regions of the three *D. saltans* chromosome pairs, is kept intact for a time greater than the euchromatic chromosomic regions. There are alterations in the puff pattern which indicates modifications in the protein synthesis; apparently a larger number of puffs regresses than enlarges between late third instar larvae and prepupae. From third instar larvae till medium pupae, the salivary glands show area and perimeter



reduction that becomes stronger as development progresses. In total, the morphological and structural alterations in the salivary gland cells show the dramatic changes caused by PCD, led by a highly orchestrated genetic program.

Key words: *Drosophila saltans*; salivary glands; programmed cell death; polytene chromosomes; puffs; nucleolus.


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
11 12 13 14 15 16 17