Satiko Nanya

Atividade Organizadora Nucleolar e Bandamentos C E G em Drosophila Mulleri, D. Arizonensis e Seus Híbridos

1910000343

SATIKO NANYA

ATIVIDADE ORGANIZADORA NUCLEOLAR E BANDAMENTOS C E G EM *Drosophila mulleri, D. arizonensis* E SEUS HÍBRIDOS

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

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

1986

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
T-343/87

ORIENTADORA :

Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico a

Eikiti e Mitsuko, meus pais

e a todos os irmãos:

Emiko, Sadae, Yudi, Toshiyuki, Tazuko,
Misako e Liria.

"O essencial é invisível para os olhos,
só se vê bem com o coração."

Saint-Exupéry

"A ciência é conhecimento cumulativo. Cada geração de cientistas trabalha para enriquecer o tesouro congregado por seus predecessores. Uma descoberta feita hoje pode não ter significado ou mesmo não ser compreensível por si mesma, mas ela fará sentido associada às que foram conhecidas antes."

Theodosius Dobzhansky

AGRADECIMENTOS

Ao término desta etapa do trabalho, expresso agora, com palavras, a minha gratidão, ao permanente apoio e incentivo das pessoas que convivem comigo, tornando o ambiente o mais agradável e cheio de calor humano.

À querida mestre, grande pesquisadora e amiga, Professora Doutora Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, incansável orientadora deste trabalho, que muito tem contribuído para minha formação científica, pela orientação segura e dedicada, pelo constante incentivo e renovação de coragem e entusiasmo que sempre nos proporcionou, os quais enriqueceram-me como pessoa, sou imensamente grata.

Ao Prof. Dr. Aluísio José Gallo, Chefe do Departamento de Biologia, pelo grande estímulo e permanente apoio, por ter nos propiciado as condições materiais para a realização do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Abbade Mourão, um dos pioneiros do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Genética, a quem devemos o nosso ingresso neste curso e o início de nossa carreira. O interesse e dedicação com quem sempre nos recebeu foram muito valiosos.

À Profª Drª Marileila Varella Garcia, coordenadora do Curso de Pós-Graduação, pelo exemplo de integridade pessoal e profissional, pelas mãos amigas sempre dispostas, e sobretudo pela criteriosa revisão do texto deste trabalho e por todas as valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Wlademir João Tadei, pela atenção dedicada e pela valiosa colaboração na análise estatística dos dados deste trabalho.

À Profª Drª Adelina Buzini da Costa Silva, pelo interesse e inestimável incentivo, oferecendo-me estágio junto ao Departamento de Biologia, o que muito contribuiu para minha iniciação na pesquisa nesta área.

Ao Prof. Dr. Grigor Vartanian, pelo apoio e estímulos nos momentos exatos.

À Profª Drª Maria Astride Saad Corradi, pelo carinho e pelas constantes manifestações de interesse.

À Profª Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pelo apoio constante, carinho e amizade e sobretudo pela colaboração na correção do manuscrito e por todas as valiosas sugestões.

Aos Professores Doutores Wanderli Pedro Tadei, Paulo Cesar Naoum e Sonia Maria Oliani Vieira da Silva, pelo incentivo e carinhosa amizade demonstrada.

À Profª Drª Marlene Kiyoni Hosaki, pelas sugestões valiosas durante a execução deste trabalho, e principalmente pela amizade que nos dedicou.

Ao Prof. Carlos Roberto Ceron, pela valiosa colaboração e constante troca de idéias e estímulos.

Ao Prof. Dr. James Robert Colleman, pelo incentivo constante e pela revisão do texto Summary and Conclusions.

Ao Prof.Dr. Benedicto Antonio Duarte de Oliveira, pelo muito que contribuiu para minha formação no início da graduação, pela oportunidade de estágio junto ao Departamento de Botânica, despertando em mim o interesse pela pesquisa.

À Profª Drª Lurdes Foresti de Almeida Toledo, do Instituto de Biociências da USP, pelas valiosas sugestões durante a análise da proforma desta Dissertação.

Ao Prof. Dr. Amilton Ferreira e Professora Doralice Maria Cella, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências de Rio Claro, pelo carinho e dedicação com que nos receberam em seu laboratório.

Aos companheiros do Curso de Pós-Graduação:Agnes Cristina de Hitler Fett, Alberto Augusto Nagel, Ana Elizabete Silva, Cláudia Márcia A. Carareto Camargo, Edson Guilherme Vieira, Eliana Morielle, Elza Aparecida Vetorazzi, Firmino Alvares Filho, Haroldo Wilson Moreira, Lilian Madi Ravazzi, Marina Terezinha A. Coleman, Nívea Dulce T.C. Froes e Sirlei Branco, pelo ambiente fraterno e cordial do dia a dia.

Ao amigo Josué Rodrigues dos Santos, pela atenção e colaboração assídua na parte técnica e fotográfica.

À Sra. Urbana Antonia da Silva Gonçalves e Sr. Paulo Antonio Maziero, responsáveis pelo meio de cultura, pelo carinho e amizade.

A Sra. Yone Sass Dias e Maria José Guimarães, pela amizade e colaboração.

Ao Sr. Domingos Zanchetta Netto,do Departamento de Patologia da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, por nos auxiliar na aplicação das técnicas de reação PAS e Azul de Alcian-PAS.

A Srta. Elza Midori Hashimoto, pela amizade e colaboração na correção da datilografia.

A Sra. Angela Maria Arantes Felix Silveira, pela atenção e disposição na confecção de gráficos e esquemas.

A Sra. Linda Lúcia Comar Canova, pelos serviços de datilografia, pela presteza e delicadeza constante.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de Bolsas de Estudo desde o Aperfeiçoamento ao Mestrado.

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

Ao Corpo Administrativo deste Instituto, pelo apoio e colaboração constantes.

Aos meus pais, pela compreensão e incentivo que mesmo à custa de muitos sacrifícios, proporcionaram facilidades ao meu estudo, minha especial gratidão.

Aos meus irmãos e cunhados, e em especial à Hatsumi, pelo incentivo e disposição com que se dedicaram a suprir meus períodos de ausência.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, com palavras encorajadoras, minha eterna gratidão.

Ao nosso PAI, Criador do Universo, pela vida e manifestações de amor e proteção.

INDICE

I. INTRODUÇÃO 1

II. MATERIAIS E MÉTODOS 15

A. Distribuição geográfica das espécies, origem das linhagens utilizadas e condições de cultura em laboratório. 15

B. Preparações citológicas 15

C. Obtenção de larvas e pupas para as preparações 18

D. Técnicas de coloração 19

D.1. Coloração Ag-coloidal 19

D.2. Combinação de tratamento ácido e coloração por nitrato de prata 20

D.3. Coloração para bandas C 21

D.4. Coloração para bandas G 21

D.5. Coloração com Sudan Black B 22

D.6. Reação de PAS 22

D.7. Coloração simultânea pelo Azul de Alcian e PAS 23

E. Procedimento para análise dos corpúsculos nucleolares nas células interfásicas dos gânglios cerebrais 23

F. Procedimento para medida da área nucleolar 24

G. Fotomicrografias 24

III. RESULTADOS 26

A. Análise dos gânglios cerebrais de *D. mulleri* , *D. arizonensis* e seus híbridos, corados pelo nitrato de prata 26

B. Estudos do tecido adiposo 30

B.1. Caracterização das fases do desenvolvimento utilizadas 32

B.2. O tecido adiposo de *Drosophila mulleri*... 33

B.3. Medidas das áreas nucleolares 37

B.4. Variações citoplasmáticas do tecido adiposo 51

C. Bandamentos C e G em cromossomos de gânglios cerebrais 57

IV. DISCUSSÃO 66

V. RESUMOS E CONCLUSÕES 82

VI, SUMMARY AND CONCLUSIONS 86

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

I. INTRODUÇÃO

Os mecanismos genéticos básicos, envolvidos no processo de diferenciação que leva ao aparecimento de novas espécies, ainda hoje são amplamente desconhecidos. Procura-se, através das técnicas disponíveis, reunir informações sobre as diferenças que se estabeleceram entre espécies próximas, em uma tentativa de chegar à origem do processo.

As modificações interespecíficas dos genes ribossômicos, codificadores dos RNAs 18S, 5,8S e 28S, que compõem os ribossomos maduros, e a atividade organizadora nucleolar, da qual resulta a formação do nucléolo, têm sido bastante investigadas com esse objetivo. Tem-se verificado que o DNA ribossômico (DNAr) mostra uma preservação acentuada de suas seqüências de base, no processo evolutivo. Graças a esta preservação pode-se proceder à hibridação *in situ* entre DNAr e RNAr (produto da transcrição do DNAr) de organismos tão diferentes como *Xenopus* e homem, *Xenopus* e *Drosophila* etc. (por exemplo, PARDUE *et alii*, 1970; SINCLAIR & BROWN, 1971; EVANS *et alii*, 1974). Entretanto, apesar dessa preservação, é possível diferenciar-se o DNAr ou o RNAr, de diferentes espécies, por processos que incluem o uso da eletroforese em gel de poliacrilamida ou técnicas de seqüenciação. As diferenças têm sido detectadas quanto às seqüências espaçadoras (por exemplo, BROWN *et alii*, 1972) ou ao segmento 28S dos cístrons ribossômicos (por exemplo, LOENING *et alii*, 1969; BRAMWELL & HANDMAKER, 1971; para estrutura dos genes ribossômicos, ver

LONG & DAWID, 1980 e pequena revisão em BICUDO, 1985).

Além disso, em híbridos entre espécies próximas, tanto de vegetais como de animais, observa-se frequentemente que os genes ribossômicos de uma das espécies são transcricionalmente dominantes sobre os genes ribossômicos da outra (por exemplo, WILKINSON, 1944; ELICEIRI & GREEN, 1969; BICUDO & RICHARDSON, 1977). Os genes ribossômicos da espécie recessiva não são perdidos e, sob determinadas circunstâncias, podem se manifestar nos híbridos. Esses conhecimentos sugerem, frequentemente, o envolvimento de mecanismos reguladores diferenciados, estabelecidos no processo de especiação. Trabalhos recentes sobre a regulação da expressão gênica ribossômica, realizados em *Xenopus laevis*, indicaram que, em cruzamentos dessa espécie, a dominância nucleolar pode ser devida à competição entre regiões desses genes, denominadas espaçadores não transcritos,por fatores necessários à ativação do promotor (BUSBY & REEDER, 1983; REEDER *et alii*, 1983). Entretanto, em híbridos entre *D. melanogaster* e *D. simulans*,nos quais a primeira espécie é dominante sobre a segunda quanto à atividade organizadora nucleolar,DURICA & KRIDER (1978) verificaram que a dominância depende da presença de uma região heterocromática de *D. melanogaster*, provavelmente envolvida na regulação gênica daquela atividade. De acordo com esses dados, a expressão da dominância nucleolar nesses híbridos não resulta de uma relação entre os próprios DNAs ribossômicos. O envolvimento do mecanismo de regulação na dominância da atividade nucleolar (e não uma relação entre os genes ribossômicos das espécies intercruzadas)foi também observado em híbridos de *D.*

mulleri e *D. arizonensis* (BICUDO & RICHARDSON, 1977; BICUDO, 1979). Também em híbridos celulares somáticos de camundongo e homem, ONISHI *et alii* (1984) obtiveram dados que sugerem que a dominância dos genes ribossômicos do primeiro organismo sobre o segundo, nas linhagens analisadas, é devida à perda ou inativação do gene para um fator específico, necessário ao reconhecimento do promotor dos genes ribossômicos humanos.

Espécies diferentes podem mostrar variação não só quanto à estrutura do DNAr e sua regulação, mas também quanto à sua localização cromossômica e ao número de genes ribossômicos presentes.

Os genes ribossômicos localizam-se em regiões cromossômicas específicas denominadas regiões organizadoras nucleolares ou, abreviadamente, RONs (MCCLINTOCK, 1934). Estas podem ser detectadas por hibridação *in situ* (RITOSSA & SPIEGELMAN, 1965) ou pela coloração seletiva com nitrato de prata, inicialmente descrita por GOODPASTURE & BLOOM (1975). As RONs podem ocupar posições centroméricas, intersticiais ou terminais e em algumas espécies abrangem totalmente um braço cromossômico (revisões em insetos, BICUDO, 1985; em peixes, ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 1985; em roedores, YONENAGA-YASSUDA, 1985). Na maioria dos casos, as RONs podem ser vistas como constrições secundárias em preparações convencionais.

Durante a intérfase, os genes ribossômicos são transcritos e os nucléolos são visualizados. O número de RONs que são ativadas e produzem os nucléolos, pode variar. O número de nucléolos pode, então, corresponder ou não ao número de RONs.

É comum duas ou mais RONs se associarem formando um só nucléolo. Nas preparações metafásicas mitóticas de cromossomos humanos, esse tipo de associação é freqüente e recebe o nome de associação de satélites porque envolve as regiões satélites dos cromossomos acrocêntricos (FERGUSON-SMITH & HANDMAKER, 1961; pequena revisão em FARAH, 1982).

A quantidade de DNAr também varia entre as espécies. Níveis de redundância diferentes de DNAr refletem-se em variações do tamanho do nucléolo, pois este é proporcional ao número de genes em cada organizador nucleolar (MILLER & BROWN, 1969; MILLER & GURDON, 1970; EINGENBROD, 1978). Entretanto, variações no tamanho do nucléolo podem também ser devidas a mecanismos de regulação, como foi verificado em certas fases do desenvolvimento de *Ambystoma mexicanum* (SINCLAIR *et alii*, 1974).

A quantidade de DNAr varia não apenas entre espécies, mas também entre indivíduos de mesma espécie, entre diferentes RONs de mesmo indivíduo e mesmo entre RONs homólogas (por exemplo, RITOSSA *et alii*, 1966; MILLER & BROWN, 1969; SINCLAIR *et alii*, 1974; DITTES *et alii*, 1974; FLAVELL & SMITH, 1974; revisão em anfíbios em RUIZ, 1982).

A variabilidade entre células de um mesmo indivíduo quanto a vários aspectos da atividade organizadora nucleolar, tais como número, localização, tamanho das RONs e quantidade de DNAr, frequentemente verificada em diferentes organismos, é indicativa de que essa atividade, guardados os limites das características da espécie, é específica da célula, *que tem, assim, uma certa autonomia nesse sentido* (por exemplo, GOODPASTURE & BLOOM, 1975; BICUDO, 1979; ASSIS, 1980;

FORESTI *et alii*, 1981; KASAHARA & YONENAGA-YASSUDA, 1983; SOZANSKII & TEREKHOV, 1984; SOZANSKII *et alii*, 1984; ALMEIDA-TOLEDO & FORESTI, 1985; ALMEIDA & CHU, 1985; MORIELLE *et alii*, 1985).

Morfologicamente, a maioria dos nucléolos é caracterizada pela presença de ribonucleoproteínas (RNPs) com uma estrutura fibrilar densa correspondente aos sítios de transcrição e uma granular, resultante da maturação dos produtos transcritos (BERNHARD, 1966). Na maioria dos nucléolos, as fibrilas de RNP estão em contato com zonas claras denominadas centros fibrilares, muitas vezes envolvendo-as. Dependendo do arranjo desses elementos, dois tipos de organização nucleolar têm sido descritos: nucléolos compactos e nucléolos filamentosos. Quando o componente fibrilar denso é abundante, geralmente toma o aspecto de rede e constitui o nucleolonema (ESTABLE & SOTELO, 1951; para revisão sobre a estrutura do nucléolo, ver por exemplo, HERNANDEZ-VERDUN, 1983 DEVICTOR *et alii*, 1984).

Estudos dos nucléolos em células em cultura e em células tumorais, durante o ciclo celular, mostraram que na prófase os nucléolos se dispersam em pequenas massas e somente os centros fibrilares persistem durante a mitose. O primeiro passo da nucleologênese no ciclo celular é a formação de componentes fibrilares em torno dos centros, e então os componentes granulares são formados na telófase. Na intérfase, as RONs correspondem aos centros fibrilares e ao componente fibrilar de RNP a eles associado (por exemplo, GOESSENS & LEPOINT, 1974, 1979).

O número de centros fibrilares não guarda uma

relação de proporcionalidade direta com o número de cromossomos portadores de RONs. Cada RON pode incluir vários centros fibrilares. Estes, porém, aumentam em número e tamanho com o grau de atividade celular (VAGNER-CAPODANO *et alii*, 1982; MIRRE & KNIBIEHLER, 1984).

PEBUSQUE & SEITE (1981) demonstraram que o volume dos nucléolos e dos seus centros fibrilares segue um ritmo circadiano, em neurônios de ratos sincronizados (12 horas de claro e 12 horas de escuro), atingindo seu máximo durante o período escuro, correspondente a um aumento de mais de duas vezes o volume nucleolar. Esse aumento envolve os componentes fibrilar, granular, vacuolar e também o volume médio dos centros fibrilares. Para os autores, as modificações do nucléolo nos períodos claro-escuro envolvem transcrição e processamento.

Modificações morfológicas do nucléolo também acompanham o processo de desenvolvimento. Por exemplo, é sabido que a forma e a estrutura do nucléolo diferem em várias linhagens celulares sanguíneas e sofrem alterações durante a diferenciação celular (BUSCH & SMETANA, 1970). Os nucléolos dos eritroblastos, durante sua maturação, mostram também modificações acentuadas em volume e número (SASAKI *et alii*, 1982, 1983).

SASAKI & KENDALL (1985) analisaram, ao microscópio comum e eletrônico, as modificações nucleolares ocorridas nas células hematopoiéticas das ilhas de sangue do saco vitelino do rato, durante o desenvolvimento embrionário e verificaram que aos 7-8 dias, quando começa a hematopoiese naquele tecido, os angioblastos apresentam nucléolos grandes e re-

ticulados, em conexão com a membrana nuclear, através de uma invaginação desta, ou diretamente. Nessas células em proliferação, o nucléolo apresenta o componente fibrilar, estando o granular ausente. No decorrer da eritropoiese o nucléolo mostra duas modificações variáveis em estrutura, em diferentes estádios da maturação eritróide, envolvendo o nucleolonema e as áreas fibrilares. O nucleolonema desaparece para formar o componente granular. Por outro lado, as áreas fibrilares em forma de anel desaparecem em estádios posteriores da maturação, sugerindo que a nucleologênese é inibida nos mesmos. Os eritroblastos maduros apresentam restos do nucléolo nas massas heterocromáticas. As modificações nucleolares são tão características que a estrutura nucleolar pode ser utilizada para reconhecimento dos estádios de diferenciação das células hematopoiéticas do saco vitelino.

Outro exemplo é o das variações ultraestruturais e funcionais do nucléolo observadas em espermátides, durante a espermiogênese do camundongo (MIRRE & KNIBIEHLER, 1985). Esses autores verificaram que as RONs reassumem sua atividade, nessas células, logo após as duas divisões meióticas, durante a fase de Golgi da diferenciação da espermátide e o nucléolo apresenta, então, uma estrutura específica contendo os componentes fibrilares de um nucléolo ativo. Esta atividade cai durante a fase de capuz, durante a qual o nucléolo sofre um processo de segregação de seus componentes. Nenhuma estrutura nucleolar é visível durante as fases acrossômica e de maturação da diferenciação da espermátide.

Verifica-se, por esses trabalhos, que os estudos

da atividade organizadora nucleolar podem ser também uma fonte importante de informações sobre os padrões de diferenciação e desenvolvimento das espécies.

Na moderna citogenética os padrões de bandamento cromossômico têm sido outra ferramenta de grande uso. Esses padrões revelam características da organização estrutural dos cromossomos, permitindo comparações interespecíficas sob outro enfoque.

As técnicas de bandamento cromossômico foram inicialmente desenvolvidas para análise de cromossomos humanos. As bandas tornavam-se visíveis como regiões cromossômicas mais, ou menos brilhantes, ao microscópio de fluorescência, ou como áreas diferencialmente coradas, utilizando técnicas específicas, ao microscópio comum. Esses métodos foram posteriormente estendidos aos animais e aos vegetais (por exemplo revisão em SHARMA & SHARMA, 1980).

As técnicas de bandamento têm contribuído de forma importante para o avanço da citogenética experimental e também da citogenética clínica. Entre as várias técnicas de bandamento presentemente utilizadas incluem-se as que produzem bandas C e G.

As bandas C foram casualmente descobertas por PARDUE & GALL (1970) que observaram que a heterocromatina centromérica dos cromossomos de camundongos, a qual é rica em DNA satélite, cora-se mais intensamente com Giemsa após tratamento com hidróxido de sódio e 2x SSC a 60°C. Essa técnica sofreu várias modificações, posteriormente, entre as quais incluem-se a de ARRIGHI & HSU (1971) , a de DRETS & SHAW(1971)e a de SUMNER (1972).

Embora inicialmente se tenha pensado que as bandas C representassem áreas de DNA altamente repetido, essa idéia teve que ser reformulada tendo em vista que foram observadas bandas C cuja heterocromatina não contém esse tipo de DNA (revisão em COMINGS, 1978).

Segundo COMINGS *et alii* (1973), a característica mais claramente associada com as bandas C é a extração do DNA que não produz bandas C e a permanência, no cromossomo, do DNA que as produz. Essa maior resistência à extração, do DNA nas regiões de bandas C positivas do que nas de bandas C negativas deve provavelmente refletir diferenças na sua interação com outros componentes cromossômicos e na sua organização, aspectos ainda não suficientemente esclarecidos.

Um fato bem estabelecido é que a técnica de banda C cora heterocromatina constitutiva. A denominação heterocromatina constitutiva derivou da classificação proposta por BROWN (1966) que a definiu como a heterocromatina que ocorre em porções homólogas do par cromossômico, em contraposição à heterocromatina facultativa, restrita a apenas um dos cromossomos do par. A heterocromatina centromérica é heterocromatina constitutiva e em geral aparece marcada, tanto em cromossomos mitóticos como meióticos, pela técnica de banda C. Em muitas espécies, além das regiões centroméricas ocorrem também bandas C intercalares e terminais. Por exemplo, no mosquito *Aedes*, MOTARA & RAI (1978) observaram banda C intercalar no cromossomo determinante de fêmea mas não no cromossomo determinante de macho, em 8 espécies; em uma nona espécie analisada, essa banda C era terminal. Esses dois padrões de

bandas C mostraram-se úteis para estudos de especiação nesses mosquitos.

Em *Schistocerca gregaria* o centrômero de todos os cromossomos são positivos para bandas C, tanto na mitose como na meiose; alguns dos cromossomos apresentam uma segunda banda C localizada perto do centrômero ou no telômero. As bandas C que não correspondem ao centrômero mostram às vezes uma coloração menos intensa (HAGELE, 1979).

Extenso polimorfismo de banda C foi descrito para populações diplóides e tetraplóides de *Gibasis* (Commelinaceae). Esse polimorfismo abrangia cariótipos sem heterocromatina centromérica e presença de bandas intercalares e teloméricas em número de cinco a oito, ou presença de heterocromatina centromérica em alguns cromossomos e falta das bandas intercalares ou das teloméricas, em várias combinações diferentes. O padrão de banda C de uma das espécies, *G. karwinskyana*, coincidiu com a distribuição regional e a cor da flor, independentemente do nível de ploidia da planta, sugerindo complexas relações dentro da espécie, previamente desconhecidas (KENTON, 1978).

Um alto grau de polimorfismo para banda C foi também verificado no gafanhoto *Atractomorpha similis*. Setenta populações, cobrindo a distribuição da espécie na Austrália, mostraram polimorfismo afetando os dez pares de cromossomos e incluindo variantes quanto à presença e ao número de bandas centroméricas, intersticiais e terminais (JOHN & KING, 1983).

Quanto às bandas G, também obtidas com o uso do corante Giemsa, hoje se aceita que seu padrão corresponde exatamente ao padrão cromomérico dos cromos-

somos meióticos, servindo, portanto, a técnica que as produz, apenas para evidenciar os cromômeros nos cromossomos mitóticos. Os cromômeros são particularmente visíveis no paquíteno da meiose, fase em que os cromossomos meióticos, muito mais distendidos que os mitóticos, apresentam pareamento dos homólogos, destacando aquelas diferenciações estruturais (revisão em CURTIS & HOROBIN, 1975; COMINGS, 1978; SUMNER, 1980).

Mais recentemente, têm-se utilizado técnicas de obtenção de padrões de banda G de alta resolução, nas quais, em vez de cromossomos metafásicos, são utilizados cromossomos em estágios iniciais da divisão celular. Esses cromossomos, graças ao seu maior alongamento, permitem que se visualize um bandamento mais refinado (YUNIS *et alii*, 1978).

Além dos trabalhos já referidos, muitos outros têm utilizado bandas C e G (especialmente as primeiras) como instrumento para análise e comparação cromossômica estrutural em diversos organismos. Aqui incluem-se mamíferos, entre os quais o homem (por exemplo, YUNIS *et alii*, 1978- homem, banda G; KASAHARA & YONENAGA-YASSUDA, 1982 - roedores, banda C e G; SEIXAS *et alii*, 1983 - Chiroptera, banda C; YOSHIDA & KODAMA, 1983 - camundongos, banda C; SOUZA & YONENAGA-YASSUDA, 1984 - roedores, banda C e G; SBALQUEIRO *et alii*, 1984-roedores, bandas G; SEN & SHARMA, 1985-Muntjac, bandas G; MAIA - FURTADO, 1986-roedores, bandas C e G), peixes (ALMEIDA-TOLEDO *et alii*, 1984 - *Eigenmannia sp*, bandas C;HARTLEY & HORNE, 1984 - Salmão, bandas C; SOLA *et alii*, 1984 - enguia, bandas C e G), anfíbios (SCHMID *et alii*, 1979 -*Triturus*, bandas C; BUCCINNOCENTI *et alii*, 1983 - *Triturus*, bandas C), répteis (MENGDEN, 1981-cobras,bandas C;SCOTT *et alii*, 1985-serpentes, bandas C),

plantas (STACK & COMINGS, 1979 - cebola, banda C ; HUTCHINSON & MILLER, 1982 - trigo, banda C; PIJNACKER & FERWERDA, 1984 - batatas, bandas C) e invertebrados (WEBB *et alii*, 1978 - gafanhotos, bandas C e G; BEDO, 1980 - Calliphoridae, bandas C ; JOHB & KING, 1980 - gafanhotos, banda C; MOTARA, 1982 -mosquitos, bandas C; CELLA & FERREIRA, 1982 - grilo, bandas C).

Em *Drosophila* a utilização dessas técnicas de bandamento tem sido um pouco mais restrita, especialmente as bandas G, provavelmente em decorrência de dificuldades técnicas e do tamanho muito reduzido de seus cromossomos mitóticos. Padrões de bandas C em cromossomos de *Drosophila* foram estudados por HSU (1971), GATTI *et alii* (1976), PIMPINELLI *et alii* (1976), BECK (1977), WHEELER *et alii* (1978), HALFER *et alii* (1980) e RECCO (1980).

Ao que nos consta, porém, há um único trabalho publicado referente a bandas G em *Drosophila*, o de GUEST (1980).

O presente trabalho teve por objetivo ampliar as informações referentes às espécies *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis*, visando melhor caracterizá-las quanto à atividade organizadora nucleolar e ao padrão de diferenciação cromossômica. Ambas as espécies pertencem ao complexo Mulleri do subgrupo de mesmo nome, do grupo Repleta, apresentando 6 pares de cromossomos, dos quais 5 são acrocêntricos e 1 par de microcromossomos (WHARTON, 1943). Essas espécies foram analisadas anteriormente quanto ao padrão de bandas de seus cromossomos politênicos, tendo-se observado que ambas diferem apenas pelo terço proximal do cromossomo X e por algumas bandas do cromossomo 4 (WASSERMAN, 1954; BICUDO, 1979).

A atividade organizadora nucleolar das duas espécies vem sendo analisada, em células das glândulas salivares, desde 1977 (BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1981; BICUDO,1979, 1981a, 1981b, 1982, 1983; LEONCINI & BICUDO, dados não publicados. Os resultados mostraram que nas duas espécies a síntese nucleolar envolve os cromossomos X e o microcromossomo, sendo que o segundo atua intraespecificamente como um organizador nucleolar secundário, com atividade eventual. Analisados os híbridos dessas espécies verificou-se a existência de uma dominância interespecífica da atividade organizadora nucleolar, evidenciada pela associação dos cromossomos com o nucléolo e pela diferença de bases do RNAr produzido.

Nos híbridos entre *D. mulleri* e *D. arizonensis* existe dominância da atividade organizadora nucleolar de *D. arizonensis*, que se manifesta, nas fêmeas híbridas, pela associação preferencial do cromossomo X de *D. arizonensis* (morfologicamente reconhecível) com o nucléolo, e nos machos híbridos (portadores de X de *D. mulleri*), pela associação preferencial do microcromossomo de *D. arizonensis* (também morfologicamente reconhecível) com o nucléolo. Nesse microcromossomo dos machos híbridos ocorre também uma amplificação gênica da ordem de quatro vezes o conteúdo original de DNA. Nos híbridos de ambos os sexos, o RNAr preferencialmente transcrito é o de *D. arizonensis*.

Esses resultados mostraram que as espécies analisadas sofreram diversificação no processo evolutivo, quanto aos sistemas reguladores da atividade organizadora nucleolar.

Um outro aspecto observado foi o de que a hi-

bridação compromete a síntese nucleolar em vários aspectos, alterando o número e a morfologia do nucléolo nas glândulas salivares.

Neste trabalho estudou-se a atividade organizadora nucleolar em células dos gânglios cerebrais de *D. mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos visando comparar esses resultados com os observados em células das glândulas salivares. Para tanto foram utilizadas colorações com nitrato de prata, específicas para nucléolos e regiões organizadoras nucleolares em células interfásicas e metafásicas.

Procedeu-se também a um estudo da atividade organizadora nucleolar de células do tecido adiposo de *D. mulleri*, em diferentes fases do desenvolvimento, buscando detectar modificações ao longo do mesmo. Paralelamente, foram feitas observações quanto a mudanças citoplasmáticas ocorridas durante esse processo.

E, finalmente, na tentativa de melhor caracterizar os cromossomos de *D. mulleri* e *D. arizonensis* e verificar a existência de possíveis modificações estruturais ocorridas no processo evolutivo, foram também realizadas colorações específicas para bandamentos C e G.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

A. Distribuição geográfica das espécies, origem das linhagens utilizadas e condições de cultura em laboratório.

As espécies *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis* utilizadas no presente trabalho, como acontece com a maioria das espécies do subgrupo Mulleri, estão associadas a cactos, na natureza e, por isso, sua área de distribuição é dependente da distribuição desses vegetais. Ambas ocorrem nos E.E.U.U. e no México sendo, as linhagens analisadas, procedentes de Guayalejo, Tamazunchale, México e originariamente obtidas dos estoques da Genetics Foundation, da Universidade do Texas, em Austin, U.S.A. Essas linhagens vêm sendo mantidas no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, desde 1.976.

A manutenção das espécies, em laboratório, tem sido feita em meio de cultura de banana e agar-agar, e à temperatura de 20ºC $\pm$ 1ºC. Os experimentos deste trabalho foram também realizados nessas condições.

B. Preparações citológicas

O presente trabalho foi baseado na análise de preparações citológicas dos gânglios cerebrais das duas espécies e seus híbridos, e do tecido adiposo de *D. mulleri*. Os gânglios cerebrais foram obtidos de larvas do terceiro está-

dio inicial e o tecido adiposo, das seguintes fases do desenvolvimento: larvas do terceiro estádio inicial, larvas do terceiro estádio tardio, puparium, pré-pupas e pupas jovens, aqui denominadas, respectivamente, L3A, L3B, P1, P2 e P3.

As lâminas e lamínulas empregadas nas preparações citológicas foram previamente submetidas ao seguinte tratamento: deixadas em Extran-MA 02 neutro (Merck) por 30 minutos, esfregadas individualmente e colocadas em uma cuba com água, por uma hora, em seguida, lavadas uma a uma em água corrente e colocadas em outra cuba com água destilada, por 30 minutos, transferidas para solução sulfocrômica forte, por pelo menos uma hora e enxaguadas em água corrente por 20 minutos.As lâminas foram ainda colocadas em solução de ácido clorídrico a 0,1N, por uma hora e enxaguadas em água corrente, por 20 minutos. Lâminas e lamínulas foram então colocadas em dois banhos de água destilada, por uma hora cada, seguindo-se a secagem ao ar.

As lâminas foram então recobertas com uma camada de gelatina por um processo que consiste em submergí-las em um banho preparado pela mistura de duas soluções: a) 0,10g de gelatina dissolvida em 50ml de água desionizada quente e b) 0,01g de alúmem de cromo dissolvido em 50ml de água desionizada. A mistura das duas soluções deve ser mantida em banho-maria durante o uso. Segue-se a secagem ao ar, podendo-se usar as lâminas após 4 horas.

As preparações dos gânglios cerebrais foram feitas por esmagamento, obedecendo ao procedimento indicado por GUIMARÃES & BICUDO (1982). As larvas foram colocadas em solução de fermento Fleischmann por mais ou menos 15 minutos e, em

seguida, foram lavadas e dissecadas em solução fisiológica de Demerec (DEMEREC & KAUFMANN, 1945). Os gânglios cerebrais foram transferidos para ácido acético (solução aquosa a 45%) aí permanecendo por 2 minutos, e depois para ácido lático (solução aquosa a 50%), por 10 minutos. Após este tratamento, o material dissecado era transportado para a lâmina contendo uma gota de ácido acético, coberto com a lamínula e submetido imediatamente a esmagamento conforme ATHERTON & GALL (1972). Esse esmagamento é feito batendo-se delicadamente, com a ponta de um lápis-borracha sobre a lamínula, da lâmina preparada e envolta em papel de filtro, e acompanhando-se, ao microscópio, o grau de distensão dos cromossomos. No presente trabalho a lamínula era retirada com o auxílio de nitrogênio líquido.

As lâminas assim preparadas foram submetidas à coloração pelo nitrato de prata (HOWELL & BLACK, 1980; HAGELE & RANGANATH, 1983), à coloração para bandas C (HALFER *et alii*, 1980) e para bandas G (SUMNER *et alii*, 1971).

Para as preparações do tecido adiposo utilizou-se também o esmagamento. A dissecção era feita em solução fisiológica de Demerec e o tecido adiposo era transportado para uma placa escavada ficando imerso em ácido acético (solução aquosa a 45%) durante 2 minutos, e em seguida transferido para ácido lático (solução aquosa a 50%), por 3 minutos. O material era então colocado na lâmina, em uma gota de ácido acético e coberto com lamínula, seguindo-se o esmagamento conforme a técnica já mencionada para os gânglios cerebrais. Após a retirada da lamínula com o auxílio do nitrogênio líquido, as lâminas eram coradas com nitrato de prata (HOWELL & BLACK, 1980).

Lâminas de tecido adiposo preparadas por esse

mesmo processo foram também submetidas à coloração com Sudan Black B (MELLO & VIDAL, 1980), à Reação de PAS (MELLO & VIDAL, 1980) e à coloração simultânea pelo Azul de Alcian e PAS (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

C. Obtenção de larvas e pupas para as preparações

As preparações citológicas dos gânglios cerebrais foram feitas a partir de indivíduos obtidos dos estoques e de híbridos F1. Os híbridos foram produzidos pelo cruzamento de fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonensis*.

Esses híbridos foram obtidos pelo processo de cruzamentos *em massa*, preparados em caixas de população, seguindo a técnica descrita por BICUDO & RICHARDSON (1978). Este processo é particularmente adequado para obtenção de larvas híbridas interespecíficas, porque um número maior de casais pode ser utilizado, aumentando a produtividade. Além disso, devido à maior facilidade de observação, pode-se controlar melhor o grau de maturidade dos descendentes e, consequentemente, aproveitar maior número deles no estádio adequado ao preparo das lâminas.

As espécies utilizadas no presente estudo intercruzam com dificuldade, produzindo geralmente pequeno número de híbridos. Assim, cada cruzamento em massa envolveu o uso de 200 casais aproximadamente, por caixa. As fêmeas virgens e os machos permaneceram separados, em tubos, até a idade de 7 a 10 dias quando os cruzamentos foram preparados.

As caixas de população utilizadas são de acrílico incolor medindo 16 cm de lado e de altura e têm pés de 3cm. Apresentam duas aberturas na base e outra em uma das paredes

laterais, todas com diâmetro de 5,5cm. Às aberturas da base adaptam-se, com fita adesiva, placas de petri plásticas, contendo meio de cultura, as quais foram trocadas, no presente experimento, em intervalos de 48 horas. A abertura lateral serve para introduzir as moscas e para arejamento através de um orifício na rolha que a fecha, envolta com gase. A tampa da caixa é vedada com fita adesiva e pode ser removida para limpeza. Os descendentes nascidos nas placas de petri foram utilizados para o preparo das lâminas.

Caixas de população como as descritas para obtenção de gânglios cerebrais de larvas híbridas foram também utilizadas para as preparações de tecido adiposo de *D. mulleri* devido à facilidade de reconhecimento dos indivíduos no estádio adequado.

D. Técnicas de coloração

D.1. Coloração Ag-coloidal (HOWELL & BLACK, 1980)

Esta coloração utiliza duas soluções, as quais devem ser guardadas em frascos escuros, envoltos em papel de alumínio, na geladeira. Uma delas é a solução coloidal reveladora, que se prepara dissolvendo muito bem 1g de gelatina em 50ml de água desionizada e acrescentando-se 0,5ml de ácido fórmico (solução A). A outra é a solução aquosa de nitrato de prata, preparada com 1g de nitrato de prata dissolvida em 2ml de água desionizada (solução B).

O procedimento de coloração consiste em pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina, misturar, cobrir com lamínula e colocar em

placa aquecedora ou estufa a 70ºC. Em aproximadamente 8 minutos a mistura de soluções torna-se marrom-dourada. Lava-se com água desionizada e seca-se ao ar. A montagem dessas lâminas, em nosso laboratório, é feita com verniz cristal, com bons resultados.

Esta técnica foi utilizada para coloração de lâminas de gânglios cerebrais e de tecido adiposo. Na coloração destas últimas, a temperatura da estufa foi alterada para 55ºC e, em consequência, o tempo de coloração foi aumentado para 11 minutos, aproximadamente.

D.2. Combinação de tratamento ácido e coloração por nitrato de prata (HÄGELE & RANGANATH, 1983)

Nesta técnica, as lâminas preparadas por esmagamento foram mantidas em álcool absoluto a -12ºC, por 15 dias e secas ao ar. A seguir, foram incubadas em TCA a 5%., a 90ºC, por 12 a 15 minutos, lavadas duas vezes em água destilada e tratadas com HCl a 0,1N, a 60ºC, por 12 a 15 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água destilada, secas ao ar e coradas com nitrato de prata. Para esta coloração foi utilizado o método de GOODPASTURE & BLOOM (1975). O material seco ao ar foi tratado com solução de nitrato de prata a 50%, coberto com lamínula e exposto à lâmpada de 75W, em estufa a 60ºC, por 15 minutos. A técnica original recomenda, que após lavadas com água destilada e retiradas as lamínulas, as lâminas sejam reveladas com duas gotas de solução de prata amoniacal (preparada pela dissolução de 4g de nitrato de prata em 5ml de água e acrescentando-se 5ml de hidróxido de amônia concentrado) e

duas gotas de solução aquosa de formalina a 3%, neutralizada (pH 7,0) com cristais de acetato de sódio e ajustada a pH 4,5 com ácido fórmico. Entretanto, por esse processo, as lâminas de gânglios cerebrais ficavam espelhadas e sem condições de análise. Assim, as lâminas foram reveladas apenas com a solução de prata amoniacal, por um a dois minutos, o que eliminou o problema mencionado.

D.3. Coloração para bandas C (HALFER *et alii*, 1980)

Procedeu-se a algumas modificações na técnica original, principalmente na duração dos tratamentos, a fim de adequá-la ao material em estudo. Os melhores resultados foram obtidos em preparações com mais de 30 dias. Estas foram tratadas com hidróxido de sódio a 0,07N em cloreto de sódio a 0,112M (pH 12), por um minuto, e submetidas a 3 banhos com 2x SSC, 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma cuba com 6x SSC, também à temperatura ambiente, e incubadas em banho-maria regulado a 60°C, por 24 horas, seguindo-se 2 banhos de álcool a 70% e 2 banhos de álcool a 95%. Após secagem ao ar, as lâminas foram coradas com Giemsa Gurr 1:10, durante 20 minutos.

D.4. Coloração para bandas G (SUMNER *et alii*, 1971)

Neste caso também procedeu-se a algumas modificações na técnica original, principalmente nos tempos empregados. Foram utilizadas lâminas com mais de 4 dias de preparo. Estas foram tratadas com solução de cloreto de potássio a 0,075M, por 8 minutos, e lavadas em água destilada. Em seguida, foram tra

tadas com solução 3:1 (3 partes de metanol: 1 parte de ácido acético) por 5 minutos, à temperatura ambiente, lavadas com água destilada, incubadas por uma hora em banho-maria, a 60ºC, em solução de 2x SSC, lavadas com água destilada. Logo após, coradas com Giemsa Gurr a 2% em tampão fosfato com pH 6,8, por 15 minutos, lavadas com água destilada e secas ao ar. Essas lâminas foram analisadas sem lamínulas para evitar descoloração.

D.5. Coloração com Sudan Black B (MELLO & VIDAL, 1980)

Para esta técnica foram utilizadas as lâminas preparadas por esmagamento do tecido adiposo, em vez de cortes de congelação recomendados pela técnica original de MELLO & VIDAL (1980).

As preparações foram lavadas durante 30 segundos em etanol a 50%, coradas de 15 a 45 minutos com solução recém-preparada e saturada de Sudan Black B em etanol a 50%. Em seguida, foram lavadas com água destilada, secas ao ar e montadas em gelatina-glicerinada.

D.6. Reação de PAS (MELLO & VIDAL, 1980)

Neste caso também procedeu-se a algumas modificações na técnica original de MELLO & VIDAL (1980), na tentativa de adequá-la ao material utilizado. Em vez de cortes, foram utilizadas lâminas preparadas por esmagamento do tecido adiposo e submetidas ao seguinte processo: banho em água desionizada durante 30 segundos, oxidação em ácido periódico a 0,5%, por aproximadamente 6 minutos, lavagem em água corrente, por

15 minutos, e tratamento com o reativo de Schiff, durante 30 minutos. Em seguida, foram submetidas a três banhos de metabissulfito de sódio a 0,5%, permanecendo, em cada banho, 3 minutos, e lavadas em água destilada, durante 10 minutos. Para desidratação, as lâminas foram mergulhadas nos álcoois a 70%, 80% e 95% e, após secagem ao ar, montadas em bálsamo do Canadá.

D.7. Coloração simultânea pelo Azul de Alcian e PAS (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983)

Esta técnica é uma variação da anterior. As preparações de esmagamento do tecido adiposo foram submetidas à solução de Alcian Blue a 1%, em ácido acético a 3%, durante 30 minutos, lavadas em água destilada, deixadas por 15 minutos em solução de ácido periódico a 2% e lavadas em água destilada. Após esse tratamento as lâminas foram colocadas em uma cuba com reativo de Schiff, por um período de 15 minutos, lavadas em água corrente, de 10 a 15 minutos, coradas rapidamente com hematoxilina e novamente lavadas em água. Em seguida, procedeu-se à desidratação na série de álcoois, à secagem ao ar e à montagem em bálsamo do Canadá.

E. Procedimento para análise dos corpúsculos nucleolares nas células interfásicas dos gânglios cerebrais

Foram analisados dois campos microscópicos por cérebro (ou indivíduo) totalizando um número variável entre 27 a 200 células, por campo, e de 62 a 314 células, por indivíduo. Essa variação dependeu principalmente da qualidade das prepa-

rações. Para facilitar a análise, o campo microscópico foi dividido em quatro partes.

F. Procedimento para medida da área nucleolar (BICUDO, 1982)

Para as medidas das áreas nucleolares foram utilizados negativos fotográficos. Estes eram colocados no ampliador fotográfico Fuji-Enlarger-S 69, na câmara escura, e a imagem dos nucléolos era projetada sobre papel vegetal quadriculado (Lumicart- formato A2), onde o contorno dos nucléolos era desenhado com caneta de ponta fina. Os quadradinhos do papel vegetal que correspondiam a cada nucléolo eram então contados com o auxílio de uma lupa Wild Heerbrugg-Plan 1X. Para a obtenção da área em micrômetros quadrados foi feito o seguinte: com a mesma ampliação dada aos negativos dos nucléolos pela posição do ampliador, projetou-se o negativo fotográfico da régua micrométrica (correspondente ao aumento utilizado no microscópio para fotografar os nucléolos) sobre o papel vegetal milimetrado, obtendo-se assim, o valor de cada quadradinho em micrômetros. Este, elevado ao quadrado, fornece sua área e esta, multiplicada pelo número de quadradinhos de cada nucléolo, fornece a área do mesmo.

G. Fotomicrografias

As fotomicrografias foram feitas em um microscópio Zeiss Standard Junior (883), com sistema fotográfico MC-63

automático acoplado (doação CNPq - Processo nº 40049/80) e um fotomicroscópio II Zeiss (doação FAPESP - Processo Biológicas nº 70/562).

Foram utilizados filmes Kodak Panatomic X 32 ASA, Kodalith e Agfa Gevaert e papéis fotográficos Kodak Kodabromide F-2, F-3 e F-4.

As fotos 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, seguindo-se as técnicas de rotina.

Em todas as figuras, a escala corresponde a 10 micrômetros. A presença de escala em um só componente da montagem significa que a escala é a mesma para os demais componentes.

III. RESULTADOS

A. Análise dos gânglios cerebrais de *D. mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos, corados pelo nitrato de prata

Para esta análise foram utilizadas larvas de terceiro estádio inicial (L3A), cuja idade foi estabelecida para *D. mulleri*, *D. arizonensis* e híbridos, como sendo, respectivamente, cerca de 145 horas, 176 horas e 192 horas (NANYA & CERON, dados não publicados).

As preparações de gânglios cerebrais corados pelo nitrato de prata, com qualquer das técnicas utilizadas, mostraram coloração dos nucleólos em marrom-escuro e nenhuma coloração nos cromossomos metafásicos. Em algumas células, porém, as regiões centroméricas de todos os cromossomos coraram-se.

Os nucléolos das células interfásicas foram analisados quanto ao número e tamanho. Os resultados obtidos acham-se resumidos nas tabelas 1 e 2. A tabela 1 apresenta dados referentes ao número de indivíduos e de células analisadas das duas espécies e seus híbridos. Essa tabela mostra que foram analisados sete fêmeas e cinco machos de *D.mulleri*, quatro fêmeas e cinco machos de *D. arizonensis* e oito híbridos. Diferentemente do que ocorre com as espécies parentais, o sexo desses híbridos não pode ser distinguido na fase de larva, devido ao desenvolvimento anormal dos primórdios dos testículos que os torna semelhantes aos primórdios dos ovários.

TABELA 1. Número de cérebros e de células analisadas por cérebro, em *D. mulleri*, *D. arizonensis* e nos híbridos F1. F = fêmeas ; M = machos.

Espécie	Sexo	Nº de cérebros analisados.	Número de células analisadas por cérebro	Total de células analisadas
D. mulleri	F	7	92(a); 98(b); 117(c); 230(d); 265(e); 291(f); 314(g)	1.407
	M	5	70(a);122(b); 126(c); 139(d); 154(e)	613
D. arizonensis	F	4	64(a); 69(b); 100(c); 180(d)	413
	M	5	62(a); 65(b); 76(c); 85(d); 100(e)	388
Híbridos		8	73(a); 78(b); 103(c); 122(d); 123(e); 175(f); 178(g); 233(h)	1.085
				3.906

De cada uma das sete fêmeas de *D. mulleri* foi analisado um número variável entre 92 e 314 células, totalizando 1.407 células, enquanto nos cinco machos da mesma espécie o número de células analisadas por indivíduo variou de 70 a 154, totalizando 613 células. Cada uma das quatro fêmeas de *D. arizonensis* teve um número variável de 64 a 180 células analisadas, totalizando 413 células, enquanto dos cinco machos foram analisadas, por indivíduo, 62 a 100 células, com um total de 388. Quanto aos híbridos, o número de células analisadas, por indivíduo, variou de 73 a 233, totalizando 1.085 células dos oito indivíduos.

A tabela 2 mostra a distribuição das células analisadas quanto ao número de nucléolos, por indivíduo. Cinco das sete fêmeas de *D. mulleri* apresentaram de um a três nucléolos (fêmeas a, b, c, e, g) e duas, de um a quatro nucléolos (fêmeas d, f). Do total de 1.407 células das sete fêmeas, 89,62% (ou 1.261) apresentaram um só nucléolo. Células com dois, três e quatro nucléolos ocorreram nas freqüências de, respectivamente, 8,46% (119), 1,71% (24) e 0,21% (3). Nas células de três dos cinco machos de *D. mulleri* foi encontrado um só nucléolo (machos a, b, c). Os outros dois machos (d,e) apresentaram variação de um a quatro nucléolos, sempre, porém, com predominância de células uninucleolares. Assim, do total de 613 células, 94,94% (582) apresentaram somente um nucléolo, 3,59% (22) apresentaram dois nucléolos, 1,14% (7) três nucléolos e 0,33% (2) quatro nucléolos.

Em *D. arizonensis*, três das quatro fêmeas analisadas apresentaram um só nucléolo (fêmeas a, b, c) e a quarta (fêmea d) mostrou variação de um a três. Nos machos da mesma

TABELA 2. Número de células analisadas por indivíduo e sua distribuição quanto ao número de nucléolos em *D. mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. F = fêmeas; M = machos.

Espécie	Sexo e indivíduos		Nº de células analisadas	Distribuição quanto ao número de nucléolos			
				1	2	3	4
D. mulleri	F	a	92	69	22	1	-
		b	98	86	10	2	-
		c	117	95	13	9	-
		d	230	200	25	3	2
		e	265	245	15	5	-
		f	291	267	21	2	1
		g	314	299	13	2	-
			1.407	1.261	119	24	3
	M	a	70	70	-	-	-
		b	122	122	-	-	-
		c	126	126	-	-	-
		d	141	128	9	3	1
		e	154	136	13	4	1
			613	582	22	7	2
D. arizonensis	F	a	64	64	-	-	-
		b	69	69	-	-	-
		c	100	100	-	-	-
		d	180	164	11	5	-
			413	397	11	5	-
	M	a	62	62	-	-	-
		b	65	65	-	-	-
		c	76	76	-	-	-
		d	85	85	-	-	-
		e	100	84	9	5	2
			388	372	9	5	2
Híbridos		a	73	73	-	-	-
		b	78	78	-	-	-
		c	103	80	20	3	-
		d	122	122	-	-	-
		e	123	123	-	-	-
		f	175	147	26	2	-
		g	178	178	-	-	-
		h	233	233	-	-	-
			1.085	1.034	46	5	-

espécie, quatro mostraram apenas células uninucleolares (machos a, b, c, d) e um apresentou variação de um a quatro nucléolos (macho e). Assim, do total de 413 células das fêmeas, 96,13% (397) mostraram um só nucléolo, 2,66% (11) e 1,21% (5), respectivamente dois e três nucléolos. A situação dos machos de *D. arizonensis* foi semelhante à das fêmeas, sendo 95,88% (372) das 388 células, uninucleolares e 2,32% (9), 1,29% (5) e 0,51% (2) portadoras respectivamente, de dois, três e quatro nucléolos.

Quanto aos híbridos, seis dos oito indivíduos (a, b, d, e, g, h) mostraram apenas células uninucleolares, enquanto os demais (c, f) mostraram células com um a três nucléolos. Do total de 1.085 células analisadas, 95,30%(1.034) continham um nucléolo, 4,24%(46), dois e 0,46% (5) três.

Quanto ao tamanho, avaliado só pela observação, os nucléolos parecem acompanhar o tamanho do núcleo, e consequentemente o da célula, de forma diretamente proporcional, isto é, núcleos maiores com nucléolos maiores. Observou-se que, geralmente, quando há mais de um nucléolo por célula, seus tamanhos são diferentes.

A posição do nucléolo nos núcleos das células dos gânglios cerebrais é predominantemente periférica, mesmo quando há mais de um corpúsculo nucleolar presente na célula. Essas observações quanto ao tamanho e posição dos corpúsculos nucleolares são válidas para as duas espécies e seus híbridos (Figura 1).

B. Estudos do tecido adiposo

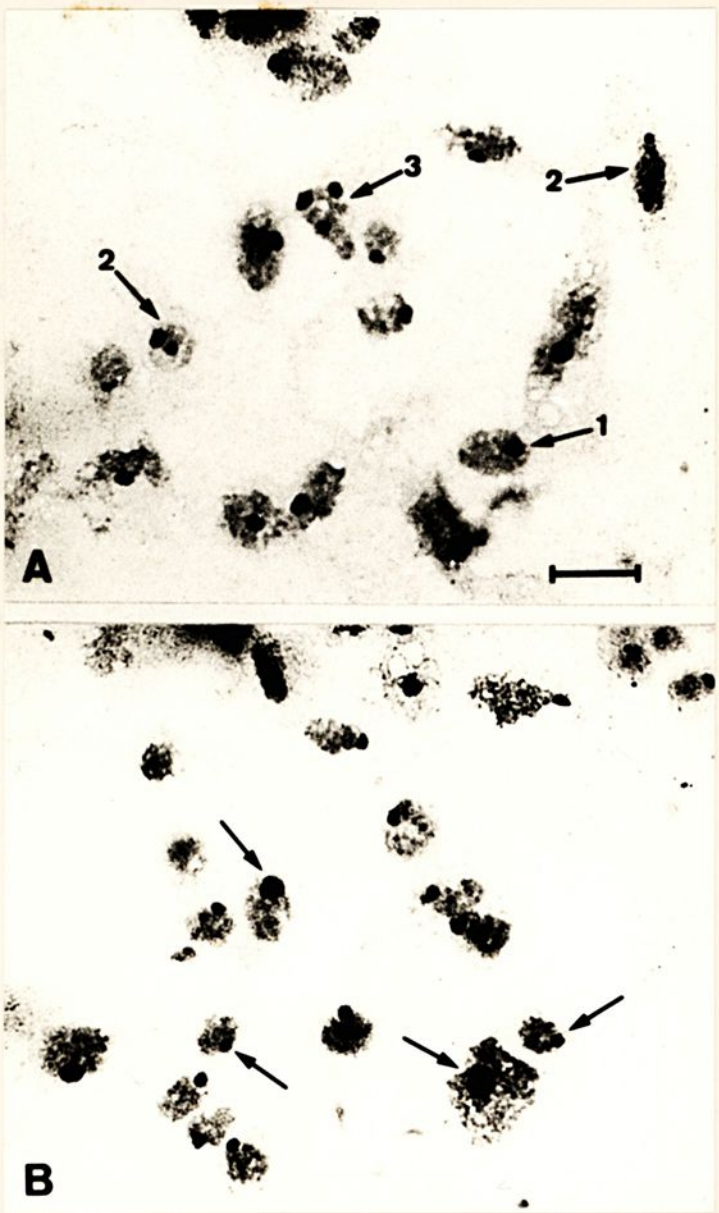


FIGURA 1. A-B. Núcleos e nucléolos de macho *D. mulleri*. A. As setas indicam o número de nucléolos, variável de um a três, em alguns núcleos. B. As setas apontam alguns nucléolos grandes em núcleos grandes e outros pequenos em núcleos menores. Observem-se em A e B a posição predominantemente periférica dos nucléolos.

B.1. Caracterização das fases do desenvolvimento utilizadas

A análise do tecido adiposo em diferentes fases do desenvolvimento foi precedida de um estudo da duração das mesmas, de modo a poder caracterizá-las não só morfologicamente mas também quanto à idade. Esse estudo preliminar foi realizado em colaboração com o Prof. Carlos Roberto Ceron, do IBILCE, a quem agradecemos a autorização para utilização dos dados obtidos, ainda não publicados.

Como foi mencionado em MATERIAIS E MÉTODOS, foram utilizadas cinco fases do desenvolvimento de *D. mulleri* para análise do tecido adiposo. Essas fases podem ser descritas do seguinte modo:

L3A (larvas do terceiro estádio inicial) - indivíduos com idade aproximada de 145 horas, portadores de espiráculos anteriores brancos, ainda muito móveis e preferencialmente submersos no meio de cultura;

L3B (larvas do terceiro estádio tardio) - indivíduos com idade aproximada de 206 horas, portadores de espiráculos anteriores amarronzados, pouco móveis e preferencialmente localizados nas paredes dos frascos de cultura;

P1 (puparium) - indivíduos com idade aproximada de 215 horas, caracterizados morfologicamente pela eversão dos espiráculos anteriores, ainda sem

cutícula rígida e com movimentação do aparelho bucal. Esta fase é de duração curta (aproximadamente uma hora);

P2 (prépupas) - indivíduos com aproximadamente 216 horas de idade, portadores de cutícula rígida, ainda sem pigmentação, e espiráculos anteriores curvados lateralmente. Esta fase também é de curta duração (cerca de uma hora);

P3 (pupas jovens) - indivíduos com idade aproximada de 225 horas, portadores de cutícula externa marrom, rígida, e sob esta, uma cutícula fina envolvendo os órgãos. O aparelho bucal encontra-se ainda ligado ao corpo não segmentado e o tubo traqueal ainda é visível.

B.2. O tecido adiposo de *Drosophila mulleri*

Nas formas holometabólicas de insetos o corpo gorduroso sofre considerável modificação durante a metamorfose e, desse modo, podem ser distinguidas, em *Drosophila*, duas séries de células adiposas: as que se originam do mesoderma embriônico para formar o corpo gorduroso do período larval e as diferenciadas durante a pupação para tornar-se o tecido gorduroso do adulto (KOCH, 1945 e POULSON, 1950, em RIZKI, 1978).

As observações realizadas neste trabalho mostraram que as células do corpo gorduroso larval de *D. mulleri* es

tão arranjadas de maneira semelhante às células do mesmo tecido de *D. melanogaster* (linhagem Ore-R), conforme descrito em RIZKI (1978). Segundo esse autor o tecido mencionado está localizado entre as vísceras e a musculatura da parede do corpo e se extende da região anterior deste ao segmento caudal. Sua morfologia regional é distinta. De cada lado, começando na região anterior, há um pedaço triangular do tecido, a cabeça do corpo gorduroso, a qual está localizada sobre o hemisfério cerebral. Do lado antero-ventral deste segmento desce uma fileira de células que se extende acima da glândula salivar e se junta com a parte ventral que conecta as duas camadas laterais principais do corpo gorduroso.

RIZKI (1964, em RIZKI, 1978) usou critérios morfológicos e bioquímicos para distinguir seis regiões na massa de tecido gorduroso de *D. melanogaster* (Figura 2a,b). Segundo RIZKI (1978), o número de células do corpo gorduroso é fixado ao tempo em que a larva eclode do ovo e não há nenhuma multiplicação celular posterior. O número de células foi contado em preparações do corpo gorduroso total e intacto da espécie e observou-se que esse número é maior em fêmeas que em machos. Seguindo-se a formação do puparium, o corpo gorduroso larval sofre uma reorganização e as células de diferentes regiões assumem posições definidas com relação ao tecido em metamorfose (Figura 2c, d). Finalmente, ocorre dissociação e dispersão das células do corpo gorduroso larval na pupa (Figura 2e).

A figura 3 (também segundo RIZKI, 1978) mostra uma preparação total do corpo gorduroso de larva de *D. melanogaster*. Essa figura é apresentada para efeito de comparação com as preparações completas do mesmo tecido de *D. mulleri*,

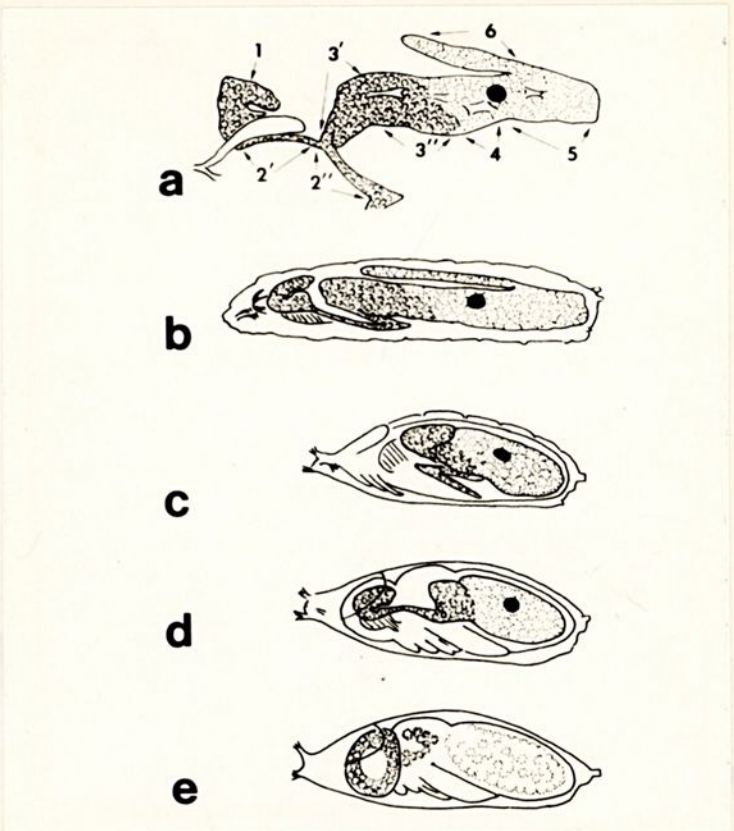


FIGURA 2. a-e. Organização e disposição do corpo gorduroso em larva e pupa de *D. melanogaster*. a. Metade lateral do corpo gorduroso da larva mostrando a numeração para identificar as regiões do tecido. b. Vista lateral da disposição do corpo gorduroso dentro da larva. c,d. Posição relativa das massas do corpo gorduroso anterior, antes e depois da eversão do complexo cefálico. e. Dissociação e dispersão das células do corpo gorduroso larval na pupa (conforme RIZKI, 1978).

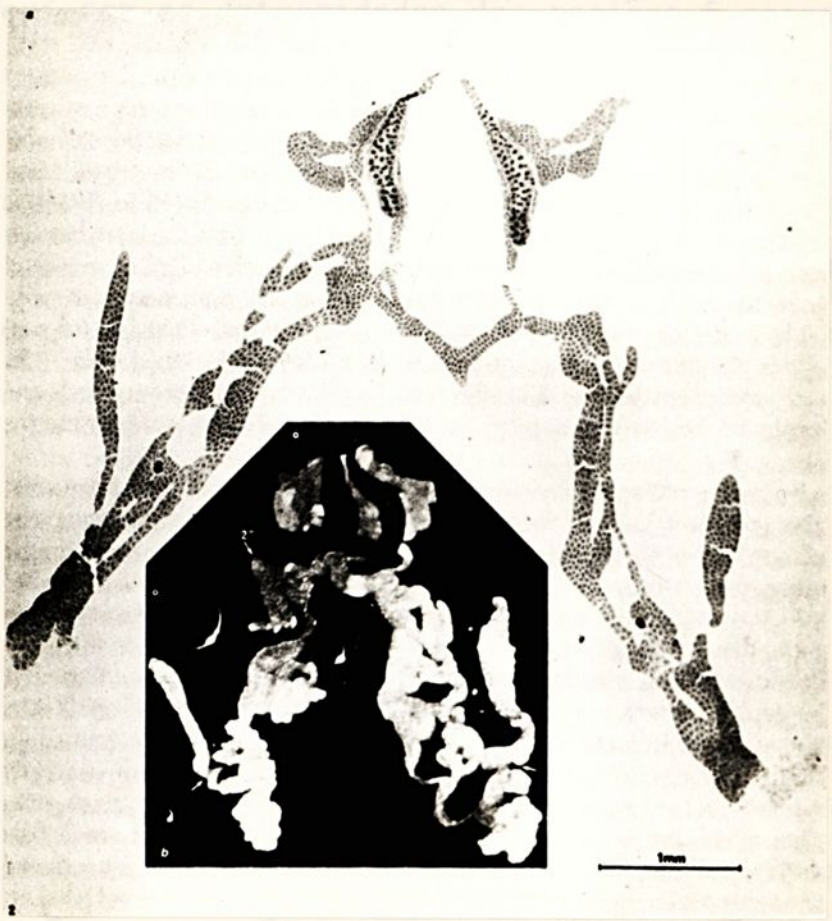


FIGURA 3. a-b. a. Preparação total do corpo gorduroso de larva macho do terceiro estádio, de *D. melanogaster* . b. Preparação total do mesmo tecido de um ginandromorfo, mostrando que a parte esquerda, masculina, é menor por conter menor número de células que a direita, feminina (conforme RIZKI, 1978).

contidas nas figuras 4 e 5. A figura 4 mostra a diferenciação das regiões do corpo gorduroso dessa espécie, numeradas do mesmo modo com que RIZKI (1978) numerou as regiões do corpo gorduroso de *D. melanogaster*, pois em ambas esse tecido se apresenta da mesma maneira. A figura 5 mostra o corpo gorduroso de *D. mulleri* com as extremidades das regiões 5 separadas, como apresentado na figura 3 para *D. melanogaster*. Na larva, entretanto, essas extremidades acham-se apostas, da forma como se vê na figura 4.

A análise do corpo gorduroso apresentada neste trabalho restringiu-se à região 1 que é a região anexa à glândula salivar.

B.3. Medidas das áreas nucleolares

As áreas nucleolares foram medidas em um número variável entre dez e treze indivíduos fêmeas e o mesmo número de machos de cada estádio, exceto P3 em que foram analisados sete fêmeas e quatro machos. De cada indivíduo foram analisadas entre três e nove células, totalizando 60 células para fêmeas e para machos dos estádios L3A, L3B, P1 e P2, e,respectivamente, 38 e 24 células para fêmeas e machos de P3.

Os dados obtidos foram utilizados em várias comparações, abrangendo:

1. Comparação entre as áreas nucleolares das células de cada indivíduo;

2. Comparação entre as médias das áreas nucleolares dos indi

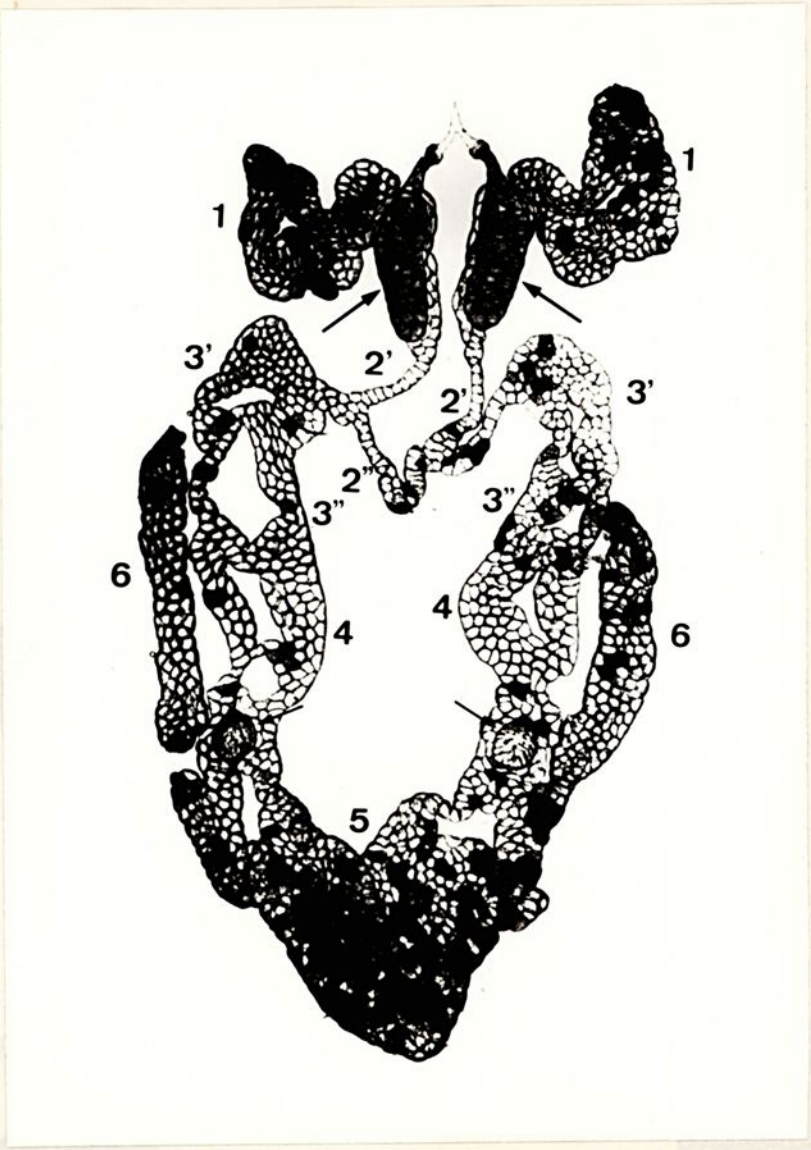


FIGURA 4. Tecido gorduroso de larva macho de terceiro estádio de *D. mulleri*, em preparação total, com a diferenciação das regiões numeradas de 1 a 6, conforme RIZKI (1978) para *D. melanogaster*. Observem-se as glândulas salivares (setas longas) e os testículos (setas curtas).



FIGURA 5. O mesmo da figura 4, com as extremidades das regiões 5 separadas para melhor visualização. Observe-se a alteração das células ocorridas no decorrer da análise da preparação.

víduos de mesmo estádio e sexo;

3. Comparação entre as médias das áreas nucleolares dos estádios diferentes e mesmo sexo;

4. Comparação entre as médias das áreas nucleolares entre os dois sexos em cada estádio.

A tabela 3 refere-se aos resultados da primeira comparação, isto é, das medidas nucleolares de cada indivíduo por estádio e por sexo. Os valores obtidos para coeficientes de variação da distribuição das áreas nucleolares de cada indivíduo foram elevados, tanto para fêmeas como para machos , em todos os estádios (L3A - fêmeas: entre 18 e 33, machos:entre 7 e 30; L3B - fêmeas: entre 14 e 27, machos: entre 5 e 30; P1 - fêmeas: entre 6 e 25, machos: entre 8 e 22; P2 - fêmeas: entre 10 e 26, machos: entre 7 e 29; P3 - fêmeas: entre 8 e 15, machos: entre 8 e 18).

Esses valores elevados dos coeficientes de variação demonstram uma alta variabilidade intraindividual das áreas nucleolares.

A distribuição dos coeficientes de variação das áreas nucleolares de cada indivíduo, por sexo e estádio, apresentada na tabela 3, mostra ainda que a variabilidade intraindividual verificada decresce com o avanço do desenvolvimento, sendo maior em fêmeas que em machos, nos estádios L3A e L3B.

A tabela 4 apresenta dados comparativos das médias das áreas nucleolares entre indivíduos do mesmo estádio, por sexo. Essa tabela contém os limites das áreas nucleolares médias de fêmeas e machos dos cinco estádios e seus coefi

TABELA 3. Distribuição dos coeficientes de variação das áreas nucleolares de cada indivíduo, de cada estádio, por sexo, em *D. mulleri*. F = fêmeas; M = machos.

Estádios	Sexo	Nº de indivíduos	Distribuição dos coeficientes de variação																												
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
L3A	F	10														1				2	1	2		1			1	1			1
	M	12			1			1					1			1	1	1	1	1					1	1	1	1			
L3B	F	11										2	1	1	1	2			1			1	1		1						
	M	13	1			2	2			2	1	1		1	1		1											1			
P1	F	11		1		1		1	1	2		1	1	1				1					1								
	M	12				2		2		1		1	1	1	1	1	1			1											
P2	F	11						1	1	1	2			1				1		3				1							
	M	10			1			3	1		1		2				1										1				
P3	F	7				1	1			2	1		1					1													
	M	4				1							1			2															

TABELA 4. Limites das áreas nucleolares médias (em μm^2) e coeficientes de variação das médias nucleolares por estádio e por sexo, em *D. mulleri*. F = fêmeas; M = machos.

Estádio	Sexo	Número de indivíduos	Área Nucleolar		Coeficiente de variação
			>	<	
L3A	F	10	1.047,53	355,46	37,29
	M	12	660,90	187,03	38,37
L3B	F	11	679,13	442,32	21,17
	M	13	588,77	289,30	22,54
P1	F	11	566,06	359,57	18,73
	M	12	540,27	323,42	18,15
P2	F	11	639,15	309,26	24,28
	M	10	441,91	294,65	19,28
P3	F	7	836,03	400,08	28,14
	M	4	491,85	315,83	22,24

cientes de variação. Os valores destes são elevados, indicando alto grau de variabilidade entre os indivíduos de mesmo estádio e sexo. Observa-se que os valores dos coeficientes de fêmeas e machos em L3A, L3B e P1 são muito próximos e decrescentes com o avanço do desenvolvimento, sofrendo um aumento crescente em P2 e P3, maior para fêmeas que para machos.

Conforme as tabelas 5 e 6, a análise de variância mostrou que a área nucleolar varia significativamente entre os indivíduos de mesmo estádio, tanto para fêmeas quanto para machos.

A tabela 7 contém as áreas nucleolares médias e desvios padrões (em μm^2) dos diferentes estádios analisados, por sexo. Os valores das médias, tanto para fêmeas como para machos, decrescem entre L3A e P2, sofrendo aumento em P3.

A análise de variância para comparação das médias nucleolares entre os diferentes estádios mostrou que a variação observada é significativa. Esses resultados estão contidos nas tabelas 8 e 9, que se referem, respectivamente, às fêmeas e aos machos.

Com o objetivo de detectar que estádios apresentam médias significativamente diferentes, aplicou-se o teste de Tukey, cujos resultados mostraram, para fêmeas ($W_{0,01(4,50)} = 90,21$):

P_2	P_1	L3B	L3A
439,24	493,83	547,01	673,73

TABELA 5. Análise de variância entre as áreas nucleolares médias das fêmeas de cada estádio de *D. mulleri*. gl = graus de liberdade (* = P < 0,05; ** = P < 0,01).

Estádios	Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
L3A	entre	9	2.114.936,01	243.992,89	7,30**
	dentro	50	1.609.292,24	32.185,84	
	TOTAL	59	3.724.228,25		
L3B	entre	10	236.278,12	23.627,81	2,08*
	dentro	49	555.089,34	11.328,35	
	TOTAL	59	791.367,46		
P1	entre	10	260.432,74	26.043,27	5,24**
	dentro	49	243.635,71	4.972,16	
	TOTAL	59	504.068,45		
P2	entre	10	365.560,29	36.556,03	5,39**
	dentro	49	332.268,17	6.780,98	
	TOTAL	59	697.828,46		
P3	entre	6	815.811,57	135.968,59	29,42**
	dentro	31	143.283,20	4.622,04	
	TOTAL	37	959.094,77		

TABELA 6. Análise de variância entre as áreas nucleolares médias dos machos de cada estádio de *D. mulleri*. gl = graus de liberdade (** = P < 0,01).

Estádios	Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
L3A	entre	11	1.686.409,18	153.309,92	14,71**
	dentro	48	500.298,69	10.422,89	
	TOTAL	59	2.186.707,87		
L3B	entre	12	441.026,10	36.752,17	7,50**
	dentro	47	230.134,23	4.896,47	
	TOTAL	59	671.160,33		
P1	entre	11	150.924,52	13.720,41	3,66**
	dentro	48	179.744,60	3.744,68	
	TOTAL	59	330.669,12		
P2	entre	9	142.152,33	15.794,70	5,56**
	dentro	50	141.941,95	2.838,84	
	TOTAL	59	284.094.28		
P3	entre	3	111.449,64	37.166,55	9,79**
	dentro	20	75.940,54	3.797,03	
	TOTAL	23	187.440,18		

TABELA 7. Áreas nucleolares médias e desvios padrões ($\bar{X} \pm S$) em μm^2, de fêmeas (F) e machos (M) dos diferentes estádios do desenvolvimento.

Estádio	Sexo	Número de Nucléolos	Área Nucleolar Média
L3A	F	60	673,73 ± 251,24
	M	60	501,77 ± 192,52
L3B	F	60	549,01 ± 115,81
	M	60	473,12 ± 106,66
P1	F	60	493,83 ± 92,48
	M	60	412,38 ± 74,86
P2	F	60	439,24 ± 106,63
	M	60	359,94 ± 69,39
P3	F	38	572,05 ± 161,00
	M	24	405,98 ± 90,27

TABELA 8. Análise de variância entre as médias nucleolares dos cinco estádios do desenvolvimento para fêmeas. gl = graus de liberdade (** = P < 0,01).

Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
entre	4	1.849.574,22	462.386,80	19,98**
dentro	273	6.650.180,00	24.359,63	
TOTAL	277	8.499.727,22		

TABELA 9. Análise de variância entre as médias nucleolares dos cinco estádios do desenvolvimento, para machos. gl = graus de liberdade. (** = P < 0,01).

Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
entre	4	743.441,66	185.860,42	13,15**
dentro	259	3.660.071,79	14.131,55	
TOTAL	263	4.403.513,45		

e para machos ($W_{0,01(4,50)} = 70,49$):

P2	P1	L3B	L3A
359,94	412,31	473,12	501,77

As médias compreendidas na mesma linha não são significativamente diferentes. As diferenças são significativas para fêmeas (P2 difere de L3B e L3A; P_1 difere de L3A ; L3B difere de L3A) e para machos (P2 difere de L3B e L3A; P1 difere de L3A). A não inclusão do estádio P3 na análise de Tukey foi devida à diferença de seu n em relação aos outros estádios, seguindo-se a recomendação de STEEL & TORRIE (1960). Contudo, entendemos que o aumento das médias nucleolares entre P2 e P3, de 46 μm^2 para machos e 133 μm^2 para fêmeas, pode ter um significado biológico real.

Finalmente, a comparação das médias entre os sexos em cada estádio, pelo teste *t de Student* mostrou diferenças altamente significativas em todo os estádios: L3A - $t_{118} = 4,208$ ($P < 0,001$), L3B - $t_{118} = 3,635$ ($P < 0,001$), P1 - $t_{118} = 5,302$ ($P < 0,001$), P2 - $t_{118} = 4,828$ ($P < 0,001$) e P3 - $t_{60} = 4,608$ ($P < 0,001$).

Portanto, os resultados mostram que as áreas nucleolares dos machos são significativamente menores que as das fêmeas, em todos os estádios.

A figura 6 mostra nucléolos de fêmeas e machos, representativos das diferentes fases do desenvolvimento de

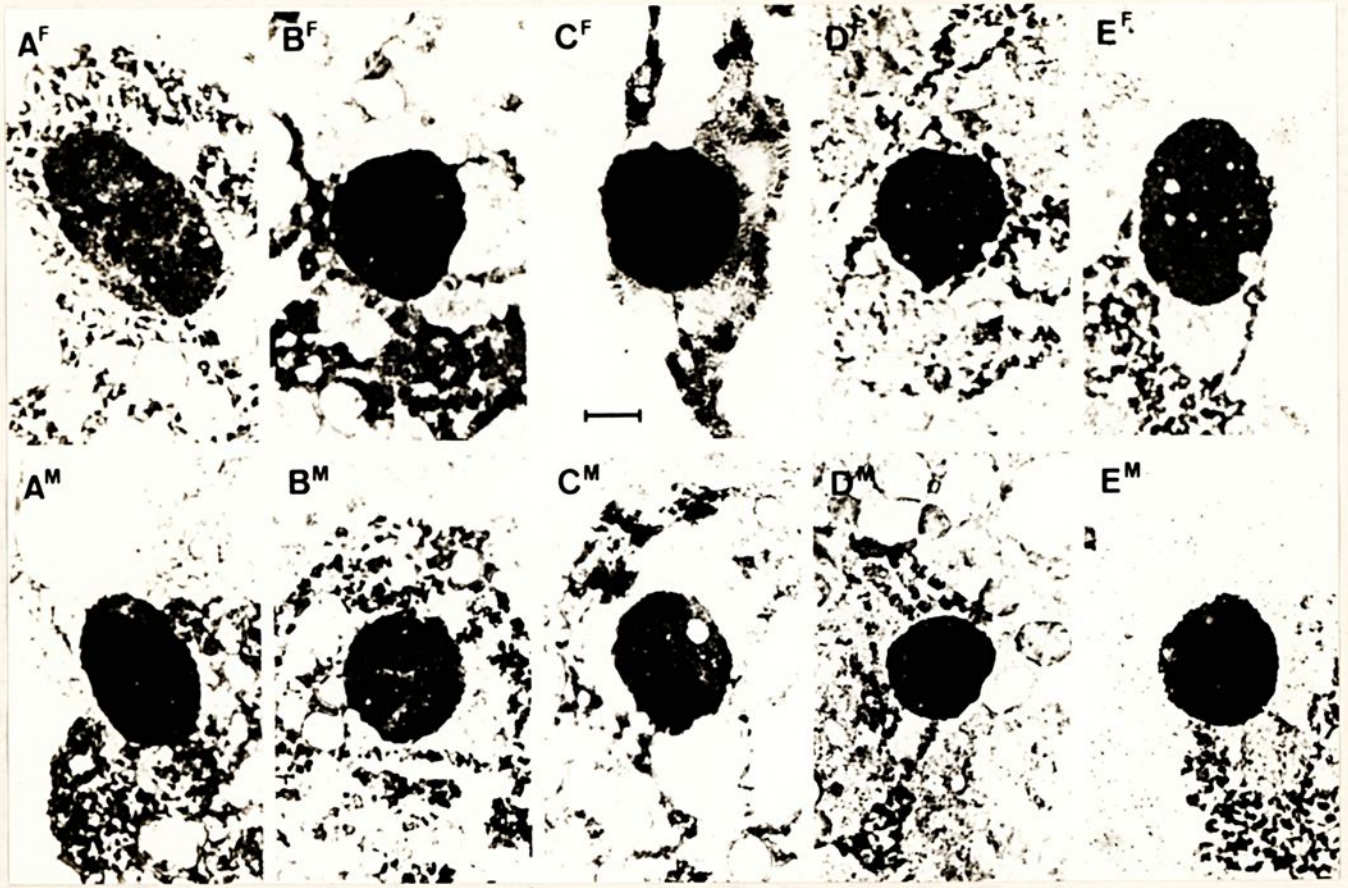


FIGURA 6. A-E. Nucléolos do tecido gorduroso de fêmeas e machos dos diferentes estádios do desenvolvimento de *D. mulleri*. A = L3A; B = L3B; C = P1; D = P2; E = P3. Os expoentes F e M indicam, respectivamente, fêmeas e machos. Observe-se que os nucléolos das fêmeas são maiores que os dos machos em todas as fases.

D. mulleri analisadas.

O gráfico da figura 7 sintetiza as variações das médias nucleolares de fêmeas e machos, observadas entre os diferentes estádios.

B.4. Variações citoplasmáticas do tecido adiposo

O citoplasma do tecido adiposo mostrou variações, ao longo dos estádios analisados, devidas à presença de grânulos densos e ao aspecto e localização das gotas de gordura.

As figuras 8 e 9 dizem respeito aos grânulos. Estes geralmente não são observáveis em fêmeas e machos do estádio L3A (Figura 8 A^F e A^M), mas começam a se tornar visíveis a partir de L3B, apresentando um aumento crescente em seu diâmetro paralelamente a uma aparente redução numérica, tanto em fêmeas como em machos (Figura 8, B, C e Figura 9 D, E).

As observações referentes às gotas de gordura são apresentadas nas figuras 10 e 11. Essas figuras mostram a presença desse material não só no citoplasma mas também no nucléolo, muitas vezes deformando o contorno deste. As gotas de gordura têm tamanho muito variável em qualquer dos estádios do desenvolvimento analisados. Contudo, nos estádios P2 e P3 encontram-se, com maior freqüência, grandes gotas resultantes, ao que tudo indica, da reunião de várias gotas menores.

As preparações foram submetidas à coloração pelo Sudan Black B, específica para lipídeos, com resultado po

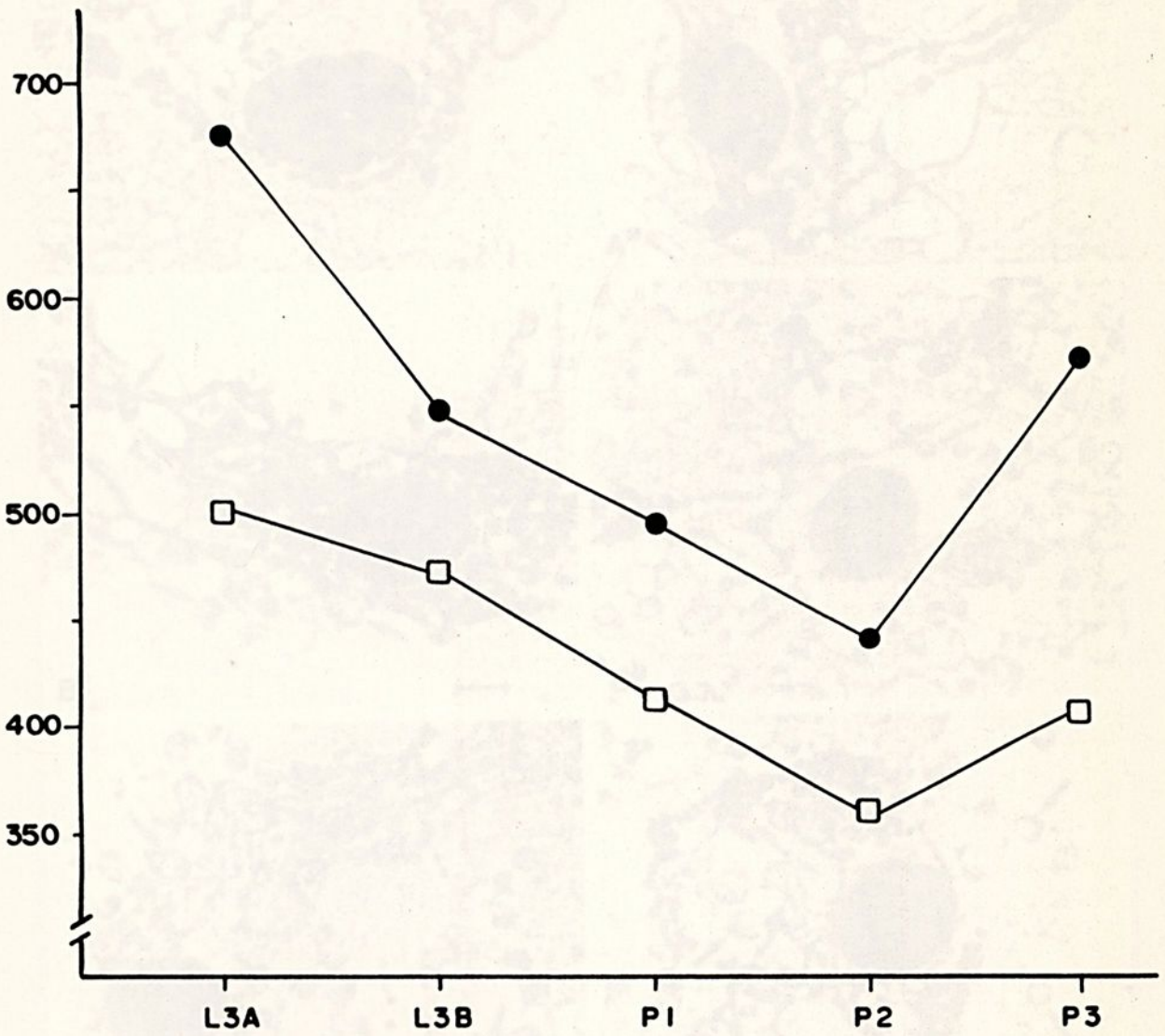


FIGURA 7. Variação das áreas nucleolares médias nos cinco estádios analisados, para fêmeas (●—●) e para machos (□—□). Em ordenada, área nucleolar média (em μm^2) e, em abcissa, os estádios do desenvolvimento.

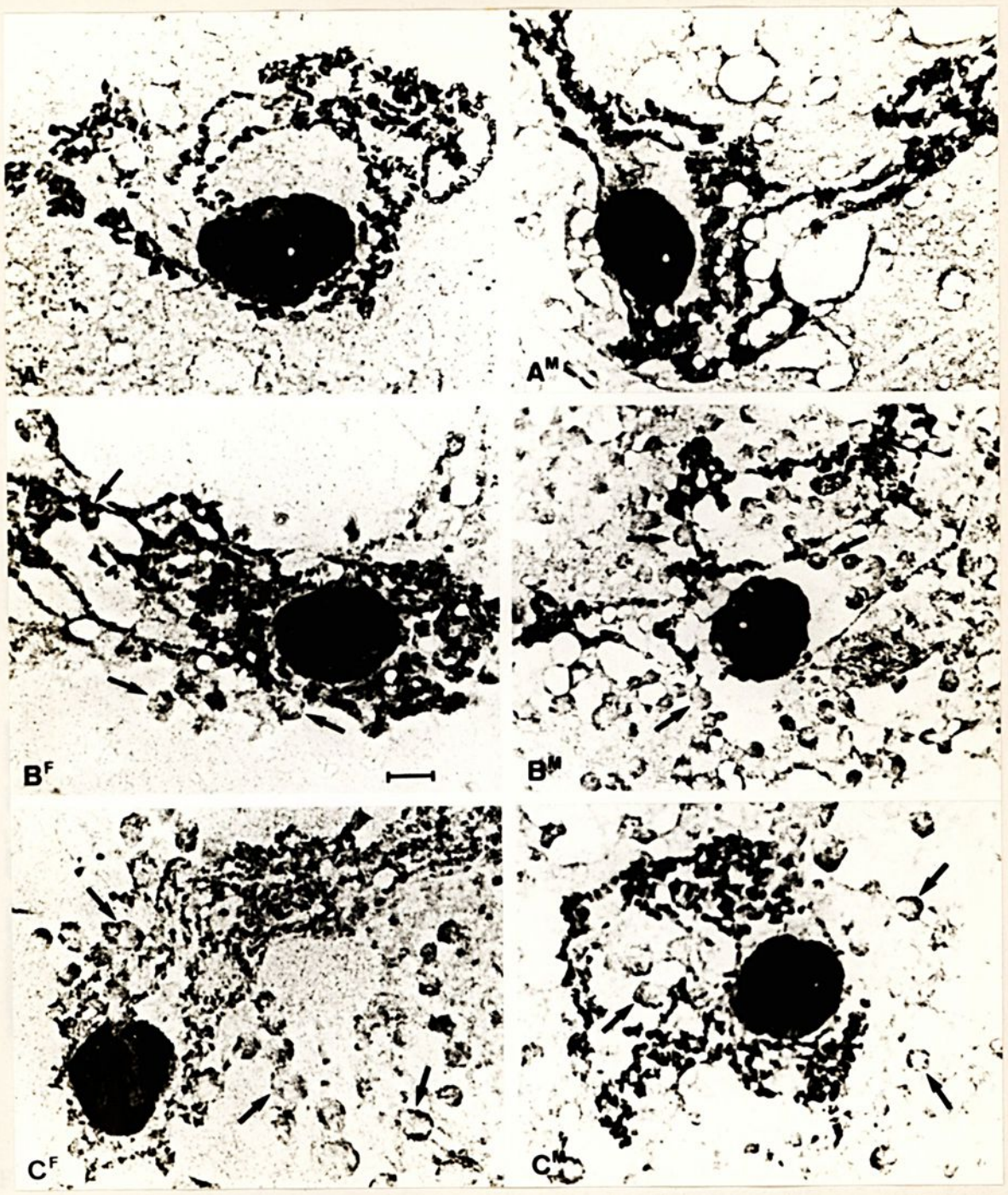


FIGURA 8. A-C. Tecido gorduroso de *D. mulleri*. A. Estádio L3A mostrando ausência de grânulos densos no citoplasma. B,C. Estádios L3B e P1 mostrando grânulos, alguns dos quais são apontados pelas setas. Expoentes F e M = fêmeas e machos.

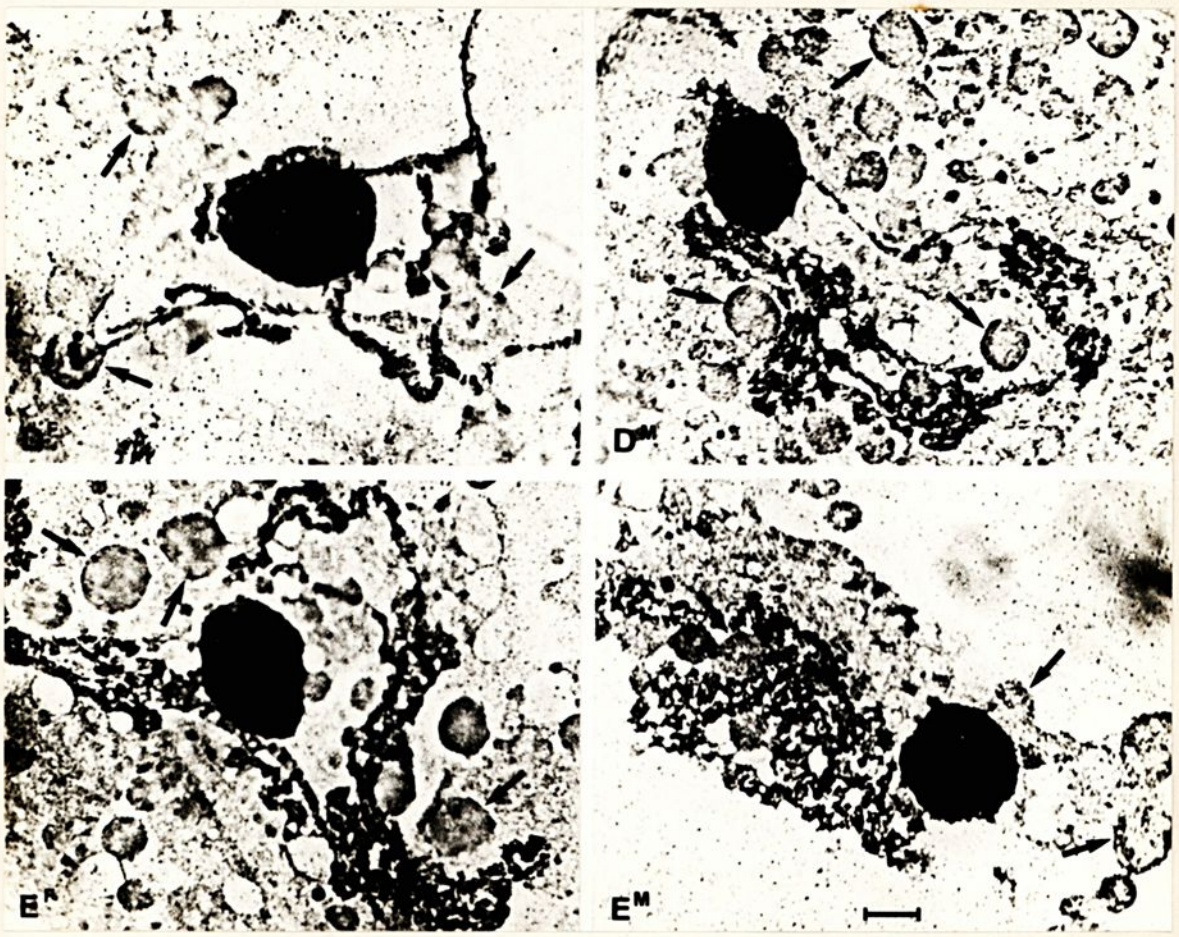


FIGURA 9. D-E. (continuação da figura 8). D,E. Estádios P2 e P3 mostrando os grânulos citoplasmáticos (alguns dos quais apontados pelas setas), maiores que nos estádios anteriores.

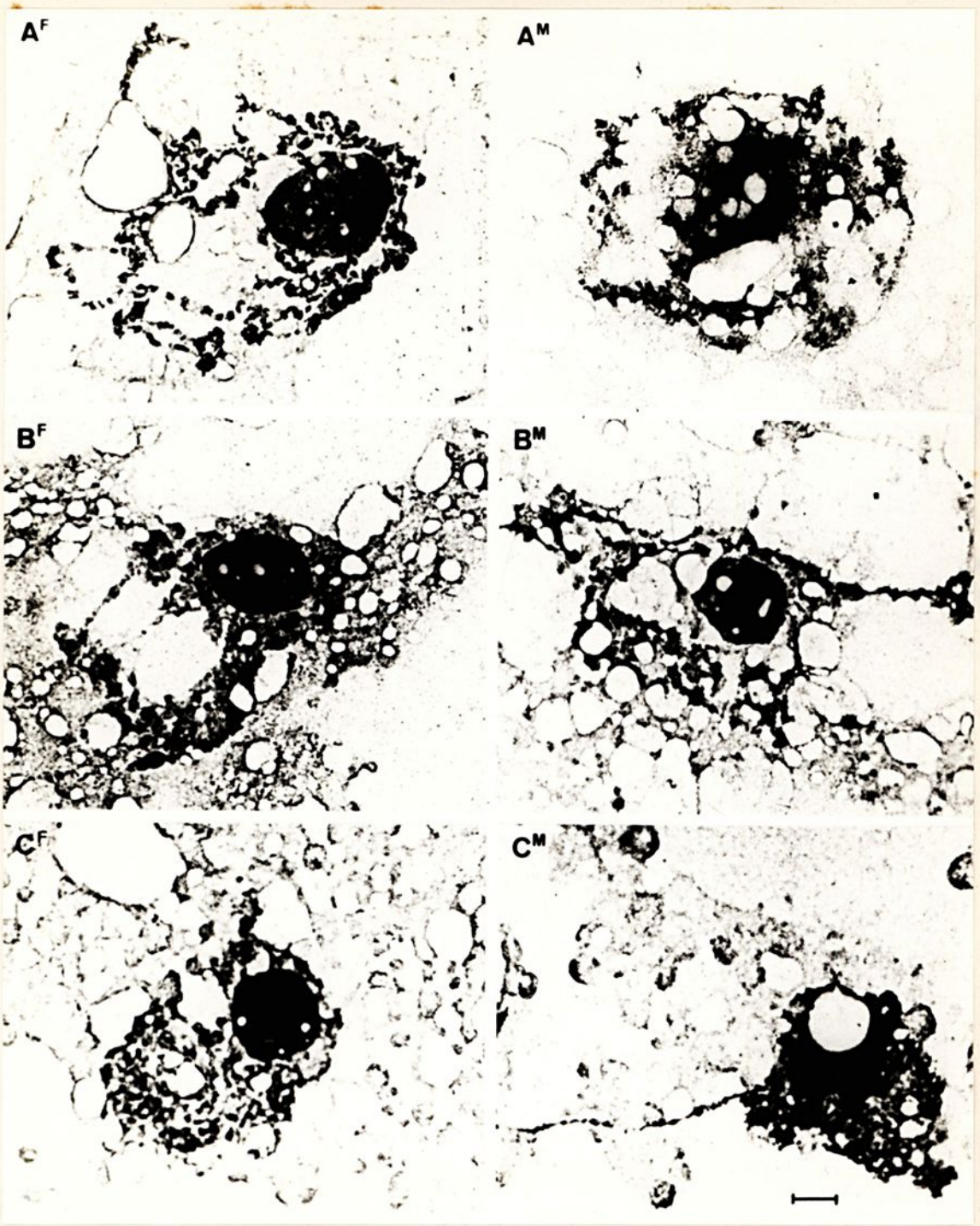


FIGURA 10. A-C. Tecido gorduroso de *D. mulleri*. A,B,C. Estádios L3A, L3B e P1 mostrando gotas de gordura no citoplasma e no nucléolo. Expoentes F e M =fêmeas e machos. Em A^F, A^M, B^M, e C^M observam-se as gotas na periferia do nucléolo, aparentemente rodeadas de material nucleolar em todos os casos.

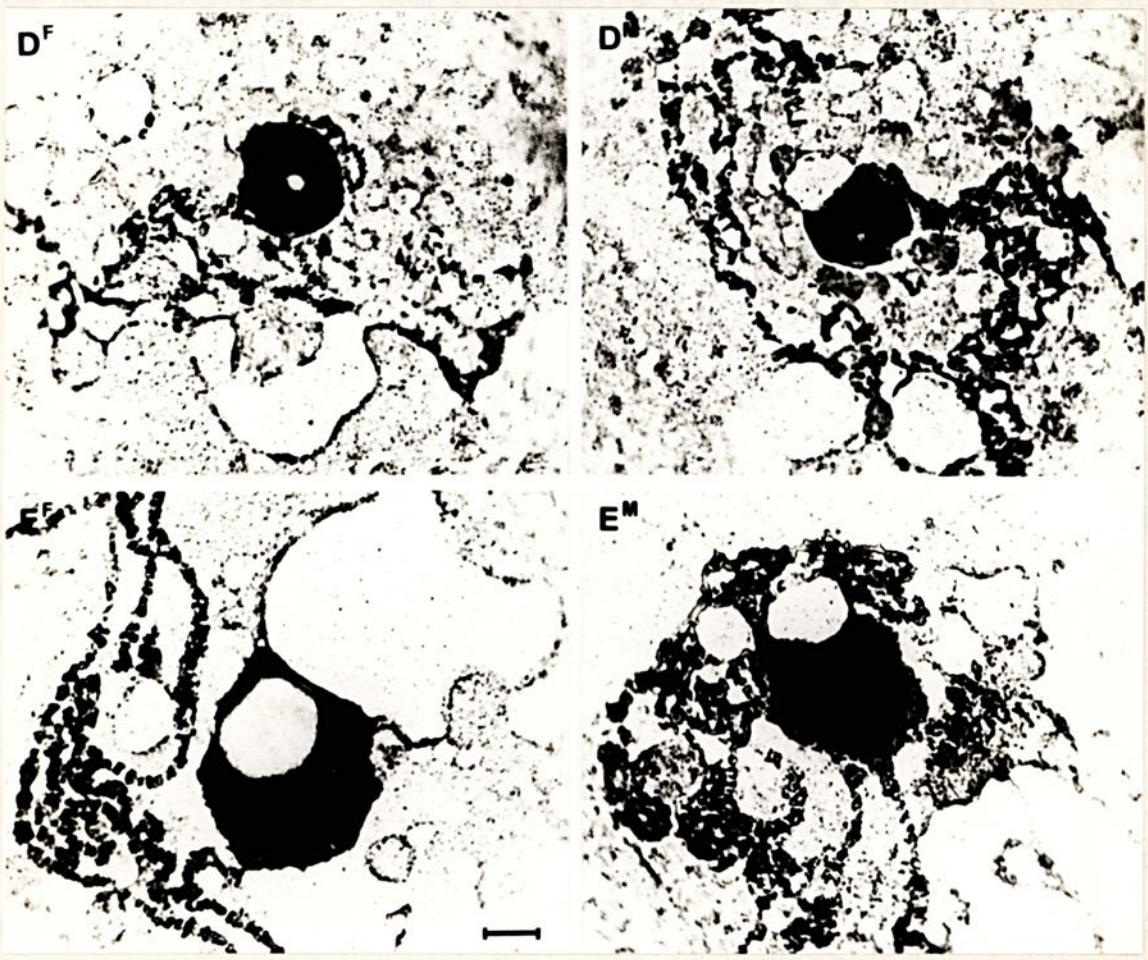


FIGURA 11. D-E. (continuação da figura 10). D,E. Estádios P2 e P3. Em D^F e E^F observam-se grandes gotas de gordura aparentemente formadas pela coalescência de gotas menores.

sitivo, isto é, coloração negra intensa (Figura 12).

As preparações foram também submetidas à coloração PAS, específica para glicogênio e glicoproteínas, e à coloração simultânea Azul de Alcian-PAS, que permite corar os polissacarídeos ácidos e os neutros, que muitas vezes coexistem no citoplasma. Com a primeira técnica as substâncias mencionadas devem adquirir coloração vermelha intensa. Com a segunda, os polissacarídeos ácidos devem mostrar coloração azul celeste e os polissacarídeos neutros, coloração vermelha.

Os resultados obtidos para as preparações de tecido adiposo são apresentados na figura 13. Com a coloração PAS, coraram-se em vermelho grãos citoplasmáticos e os contornos das gotas de gordura (Figura 13 A, B). Com o Azul de Alcian-PAS o resultado foi o mesmo, porém a coloração foi mais suave (Figura 13 C, D).

C. Bandamentos C e G em cromossomos de gânglios cerebrais

A técnica de bandas C, aplicada aos cromossomos de gânglios cerebrais das duas espécies e híbridos F1 mostrou marcação na região centromérica de todos os cromossomos, e marcação total do cromossomo Y e dos microcromossomos. Foram experimentadas várias técnicas de bandamento C, sendo que a técnica de HALFER *et alii* (1980) deu os melhores resultados. Ao nível de nossas observações, as duas espécies não diferem quanto à localização das bandas C (Figura 14).

O bandamento G de *D. mulleri* e *D. arizonensis* mostrou um padrão característico para cada par de cromossomos

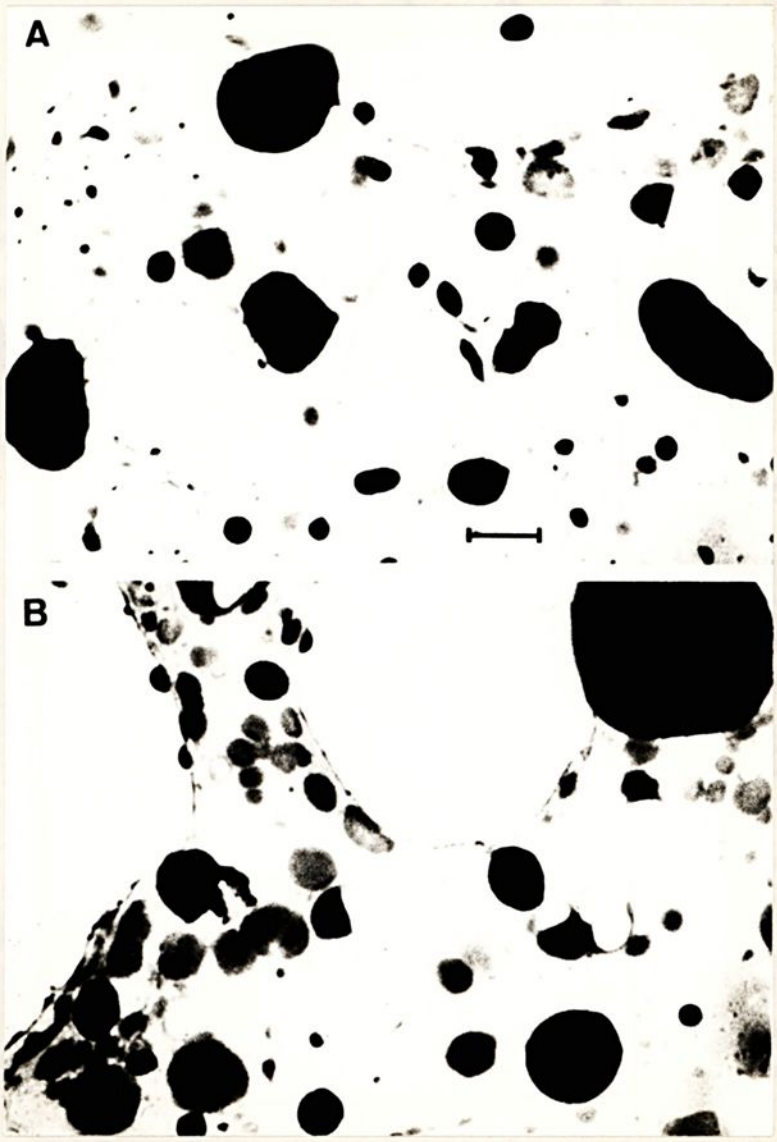


FIGURA 12. A-B. Tecido gorduroso de *D. mulleri* submetido à coloração com Sudan Black B. A. L3A, macho. B. L3B, fêmea. Observam-se gotas de gordura de tamanhos diferentes, coradas em negro.

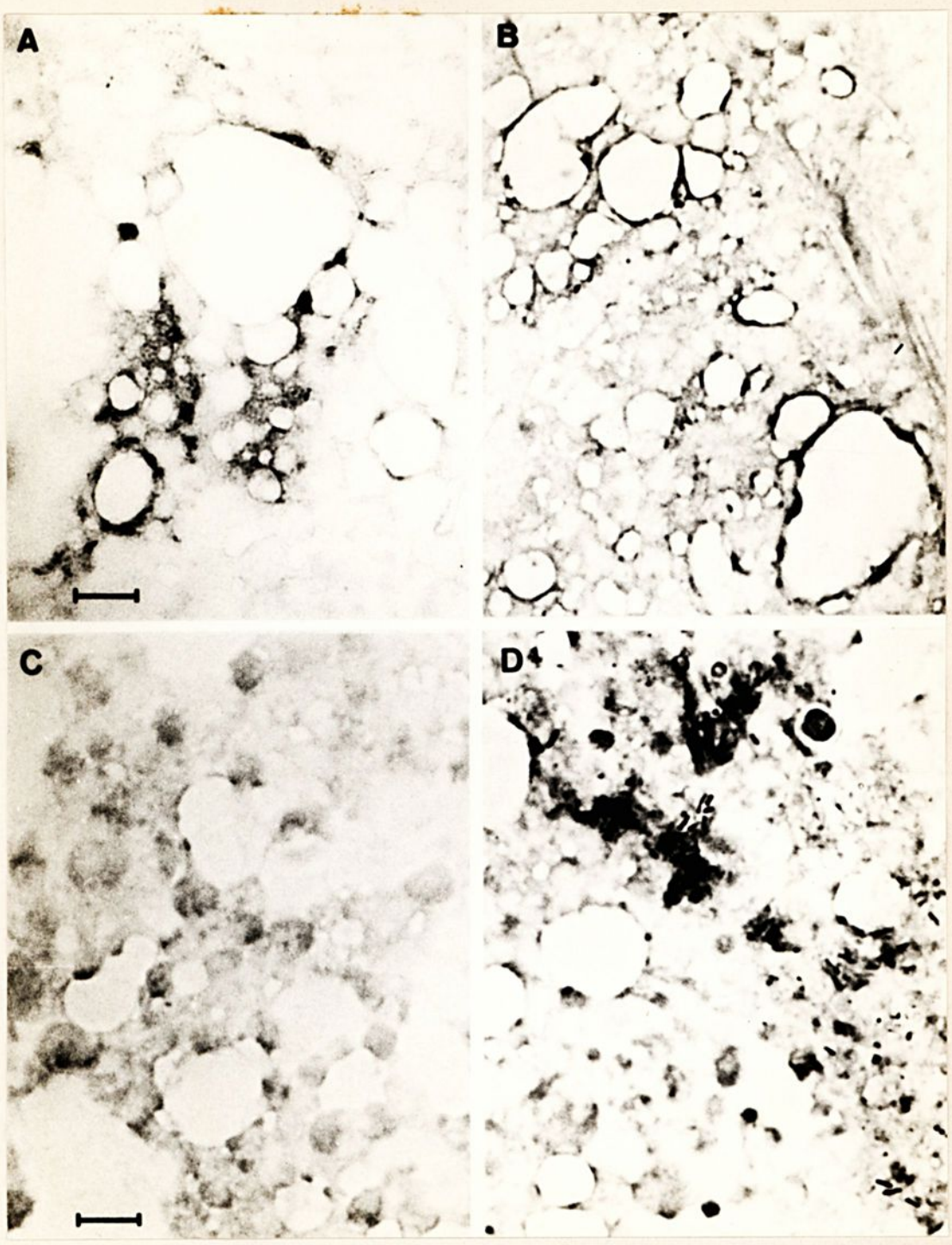


FIGURA 13. A-D. Tecido gorduroso de *D. mulleri*. A,B. Fêmeas L3B, submetidas à coloração PAS. C, D. Machos L3B, submetidos à coloração de Azul de Alcian-PAS. Em ambos os casos observa-se coloração nos grânulos citoplasmáticos (melhor visualizados em C e D) e no contorno das gotas de gordura.

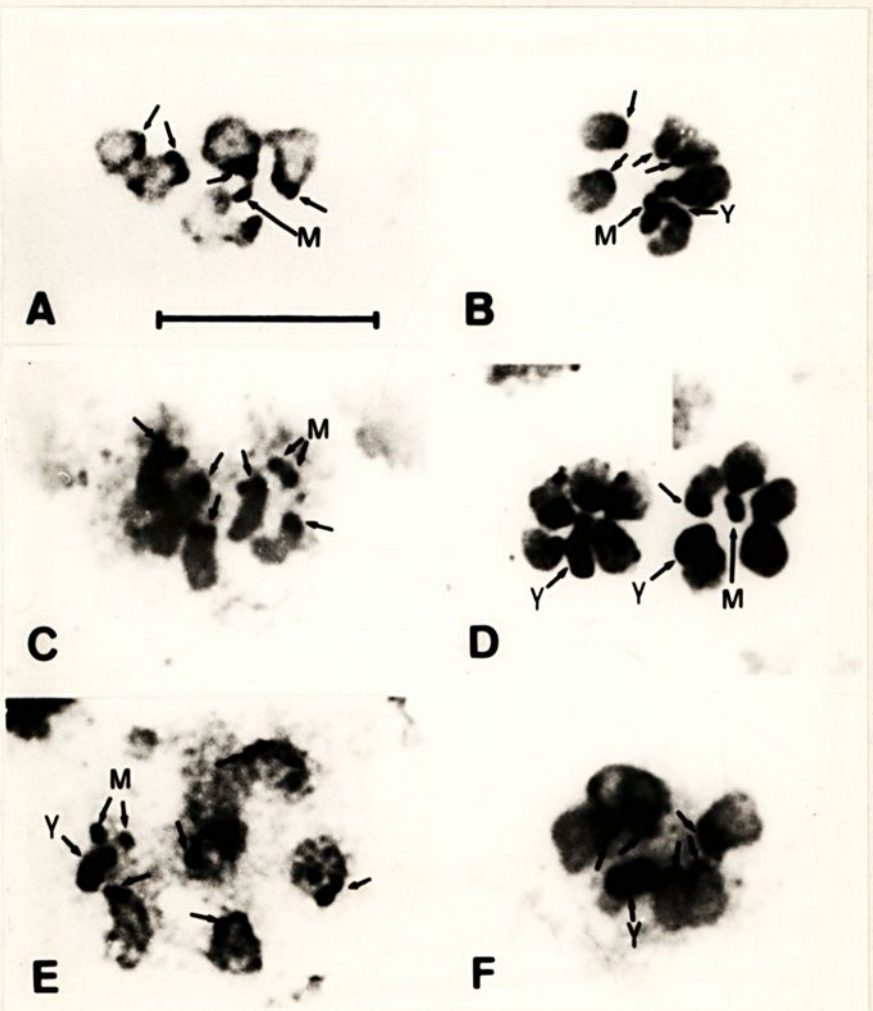


FIGURA 14. A-F. Cromossomos de gânglio cerebral corados pela técnica de bandas C. A. *D. mulleri*, fêmea; B. *D. mulleri*, macho; C. *D. arizonensis*, fêmea; D. *D. arizonensis*, macho; E-F. Machos híbridos. As setas apontam as regiões coradas. M = Microcromossomos.

acrocêntricos. Esse padrão, entretanto, pode variar em função do grau de condensação cromossômica. As espécies não diferem quanto a esse padrão ao nível de nossas observações. Assim,quanto às bandas escuras,o cromossomo X,o maior do complemento, mostrou,mais frequentemente, quatro bandas,as quais em outras metáfases podiam aparecer como cinco. O cromossomo Y apresentou três bandas espessas muito próximas. O segundo, terceiro e quarto pares mostraram três bandas que podiam menos frequentemente aparecer como quatro, havendo uma certa dificuldade em diferenciá-los quanto à posição das bandas e intensidade de coloração, devido ao tamanho reduzido dos cromossomos. O quinto par apresentou duas bandas ou raramente três. O par de microcromossomos cora-se fracamente com a técnica de banda G, não apresentando diferenciação visível; são cromossomos muito pequenos para esse tipo de análise. Especialmente no híbrido, observa-se, com freqüência variável, diferença no tamanho dos elementos do par de microcromossomos (Figuras 15, 16 e 17).

O padrão de bandas G mais frequentemente observado para as espécies *D. mulleri* e *D. arizonensis* está contido, sob a forma de esquema, na figura 18.

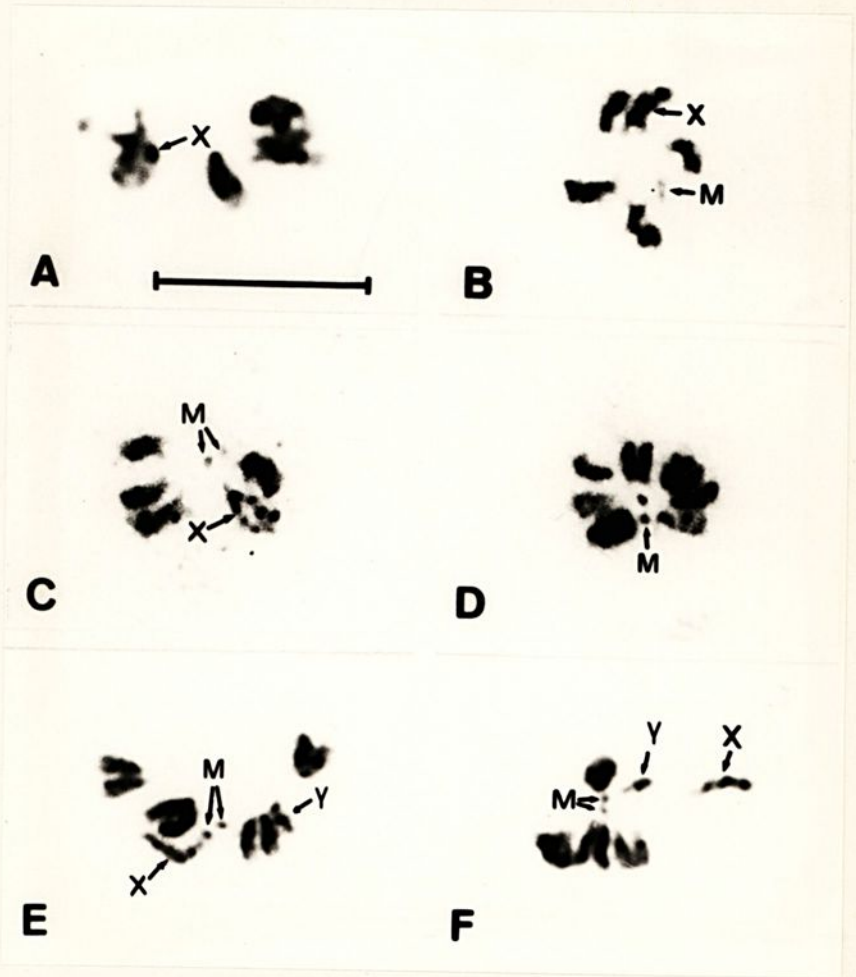


FIGURA 15. A-F. Bandas G em *D. mulleri*. A-D. Fêmeas. E-F. Machos. M = Microcromossomos.

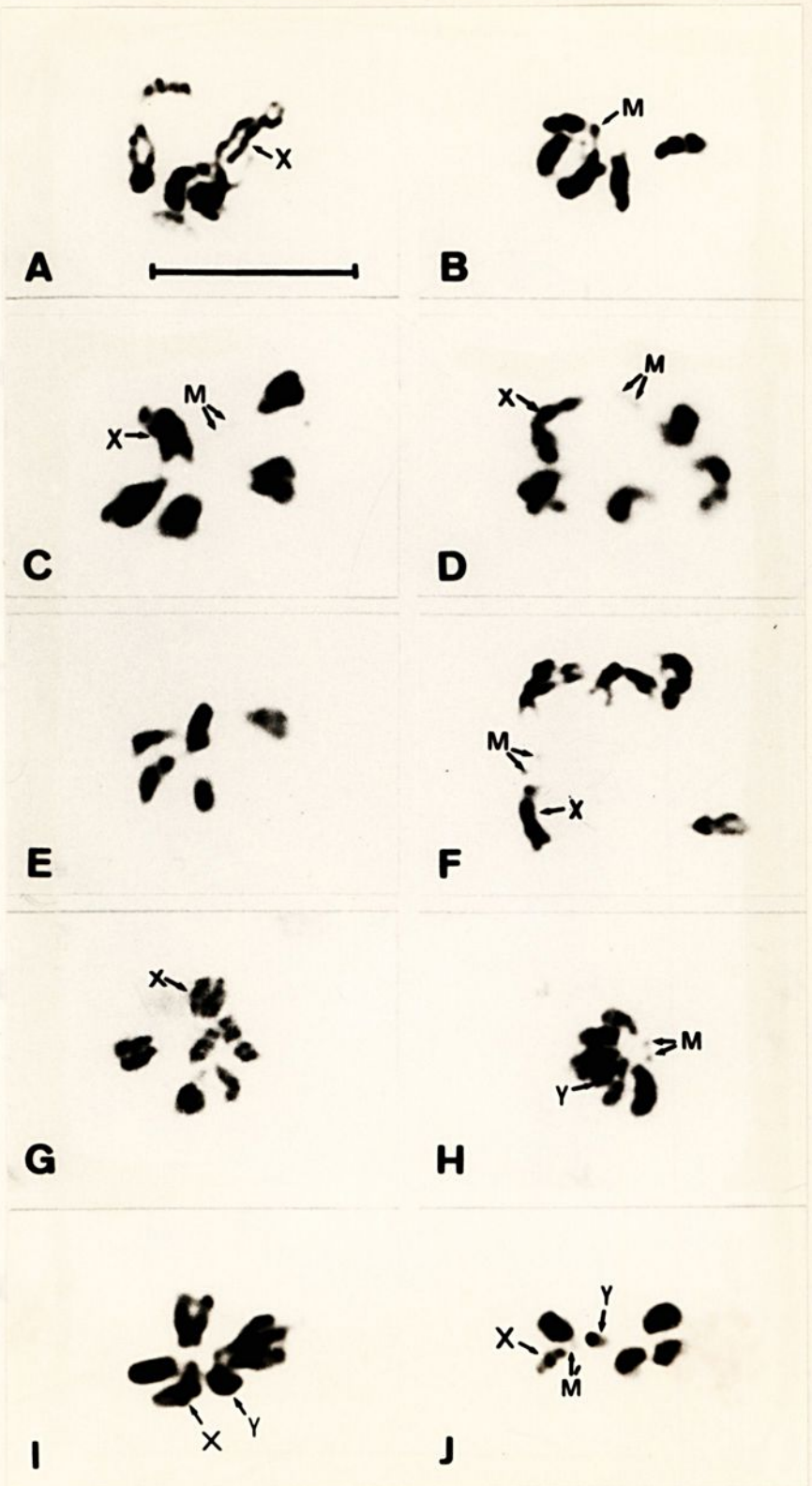


FIGURA 16. A-J. Bandas G em *D. arizonensis*. A-G. Fêmeas. H-J. machos. M = Microcromossomos.

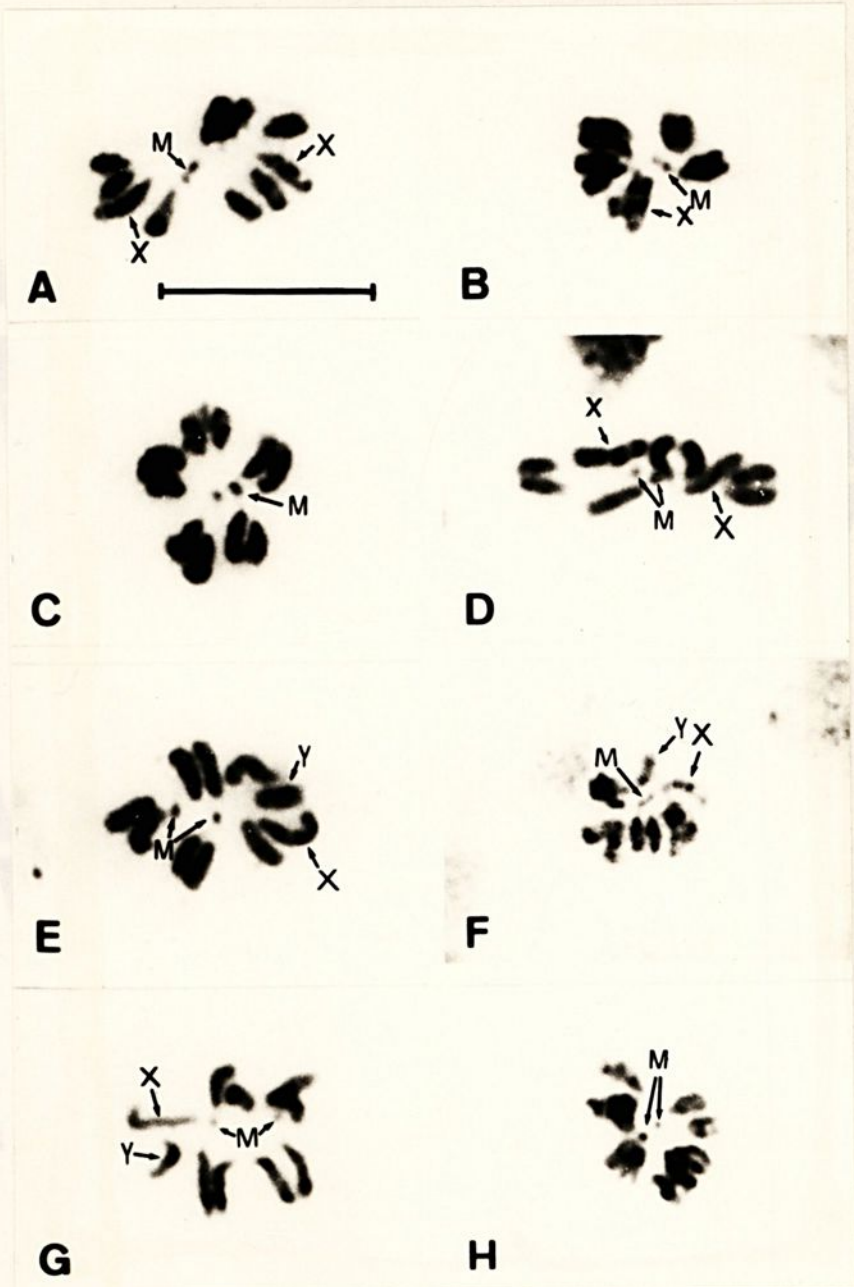


FIGURA 17. A-H. Bandas G em Híbridos F1 de *D. mulleri/D. arizonensis*. A-D. Fêmeas. E-H. Machos. M = Microcromossomos.

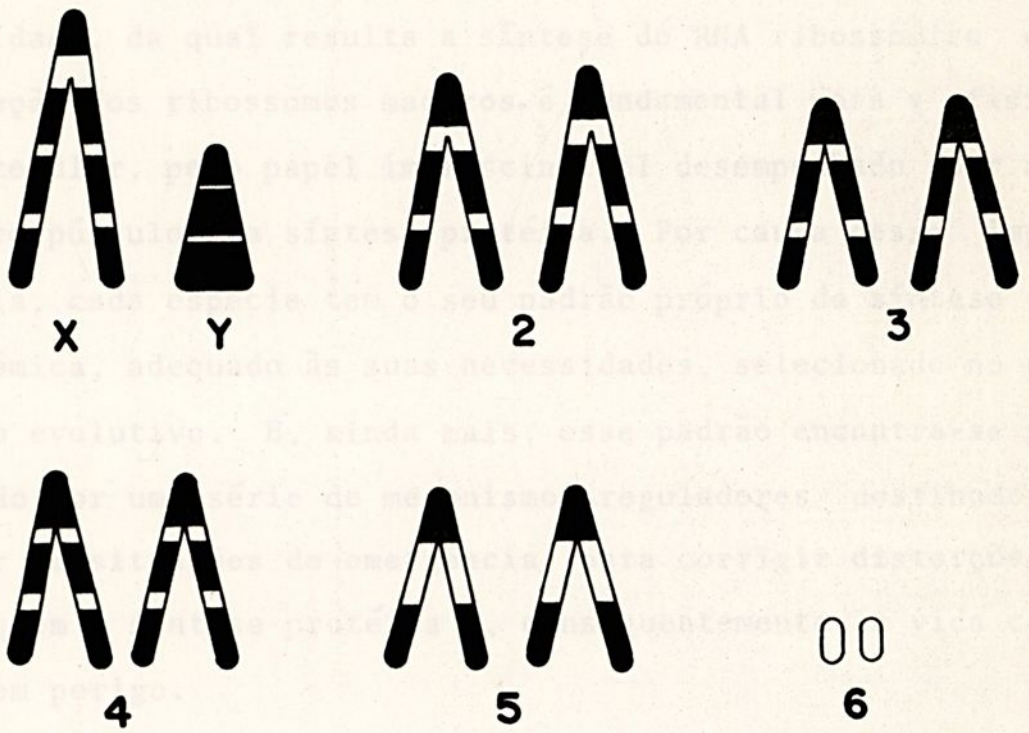


FIGURA 18. Apresentação esquemática do padrão de bandas G nos cromossomos de *D. mulleri* e *D. Arizonensis*.

IV. DISCUSSÃO

As populações naturais apresentam uma alta variabilidade genética que se manifesta sob muitos aspectos. Entre eles inclue-se a atividade organizadora nucleolar. Esta atividade, da qual resulta a síntese do RNA ribossômico e a produção dos ribossomos maduros, é fundamental para a fisiologia celular, pelo papel imprescindível desempenhado por aqueles corpúsculos na síntese protéica. Por causa dessa importância, cada espécie tem o seu padrão próprio de síntese ribossômica, adequado às suas necessidades, selecionado no processo evolutivo. E, ainda mais, esse padrão encontra-se protegido por uma série de mecanismos reguladores destinados a atuar em situações de emergência, para corrigir distorções que coloquem a síntese protéica e, consequentemente, a vida celular, em perigo.

Na INTRODUÇÃO foram feitas referências às várias formas de variabilidade da atividade organizadora nucleolar. Estas abrangem o número e a localização das regiões organizadoras nucleolares presentes ou ativas, a quantidade de DNA ribossômico ou o número de cístrons ribossômicos presentes nas mesmas, a organização das seqüências do DNA ribossômico, os mecanismos envolvidos na regulação da atividade dos cístrons ribossômicos e o número e aspectos estruturais e morfológicos do nucléolo. Essa variabilidade permite diferenciar não só espécies como também linhagens, indivíduos de mesma linhagem e até mesmo células de um mesmo indivíduo.

Em *Drosophila*, objeto do presente trabalho, três padrões básicos caracterizam a localização das RONs: RONs restritas aos cromossomos sexuais X e Y, RONs restritas ao cromossomo X e ao microcromossomo, e RONs restritas ao microcromossomo.

As espécies do complexo Mulleri analisadas quanto a esse aspecto, até o presente, apresentam o segundo padrão (BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1981; BICUDO, 1979, 1982). A verificação da presença de cístrons DNAr nos microcromossomos dessas espécies de *Drosophila* foi uma constatação importante por causa de uma implicação evolutiva mais geral, pois constitui mais um argumento favorecendo a idéia de uma origem filogenética comum para o cromossomo X e o microcromossomo nesse organismo (BICUDO & RICHARDSON, 1981).

A localização das RONs nas espécies *D. mulleri* e *D. arizonensis* foi previamente analisada nas glândulas salivares, utilizando a associação morfológica entre os nucléolos e os cromossomos e a hibridação *in situ* com RNA ribossômico marcado por isótopo radioativo (BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1981).

A técnica de coloração pela prata, originariamente descrita por GOODPASTURE & BLOOM (1975), que tem sido muito eficiente para marcar regiões organizadoras nucleolares em muitos organismos, foi ineficaz para as espécies do complexo Mulleri, em várias tentativas anteriores, mesmo utilizando muitas variações da técnica original (BICUDO, 1979,1982).

No presente trabalho foram feitas novas tentativas de aplicá-la aos cromossomos mitóticos dos gânglios ce-

rebrais, também sem resultado positivo. A técnica, aplicada a esses cromossomos, corou apenas a heterocromatina centromérica de todos os cromossomos, o Y e os microcromossomos, em algumas células das duas espécies e seus híbridos.

Apesar da grande quantidade de estudos das RONs, descritos na literatura, baseados no uso da coloração pela prata, até hoje a verdadeira natureza citoquímica desse processo de coloração é incerta. De acordo com SCHWARZACHER *et alii* (1978) o material que se cora pela prata poderia ser as proteínas ácidas que se acumulam em torno das RONs. Suas conclusões foram baseadas em várias provas indiretas, tais como quantidade de proteínas não-histônicas e digestão com RNase. Outros autores também atribuíram às proteínas associadas ao RNAr recém-transcrito a colorabilidade das RONs pelo nitrato de prata (por exemplo, HOWELL, 1977 e HOWELL & HSU , 1979). OCHS & BUSCH (1984), entre outros, atribuiram à fosfoproteína C23 a especificidade dessa coloração. Entretanto , trabalhos recentes têm colocado em dúvida essas indicações (CLAVAGUERA *et alii*, 1983, 1984). Conforme o primeiro desses trabalhos, baseado na afinidade dos íons de prata pelos diferentes constituintes da cromatina (DNA, RNA, histonas, proteínas não-histônicas totais etc.), a colorabilidade das RONs pelos mesmos não pode ser atribuída a um componente isolado da cromatina, pois todos eles se ligam a esses íons, sendo a ligação mais forte com o DNA. A utilização de enzimas proteolíticas e nucleases, no segundo trabalho, não impediu a coloração das RONs. Ambos os resultados levaram os autores a sugerir que a coloração diferencial das RONs pela prata está relacio-

nada com a descondensação diferencial da cromatina.

É difícil saber por que as RONs das espécies do complexo Mulleri não se coram com essas técnicas específicas que usam prata, mesmo porque a marcação foi conseguida em *D. nasuta*, utilizando tratamento ácido combinado com a coloração Ag-AS (HÄGELE & RANGANATH, 1983). Essa modificação da técnica foi também utilizada no presente trabalho, sem sucesso. A dificuldade na explicação dessas observações em *D. mulleri* e *D. arizonensis* aumenta mais pelo fato de não se conhecer, com certeza, o mecanismo da coloração pela prata.

As células interfásicas dos gânglios cerebrais de *D. mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos, porém, forneceram informações sobre a atividade organizadora nucleolar, com o uso da coloração pela prata, pois esta cora os nucléolos fortemente, destacando-os, e permitindo uma análise mais detalhada dos mesmos.

Quanto ao número de nucléolos, os resultados mostraram predominância de indivíduos cujas células interfásicas dos gânglios cerebrais apresentam um só nucléolo, nas duas espécies e nos híbridos, embora ocorram também indivíduos com algumas células portadoras de dois a quatro nucléolos. Esses resultados conferem com os previamente obtidos para as células das glândulas salivares das mesmas espécies e híbridos (BICUDO, 1979, 1982). Entretanto, nas glândulas salivares dos híbridos, a freqüência de larvas e células por larva contendo nucléolos adicionais é maior do que nas espécies parentais. O mesmo não foi encontrado nos gânglios cerebrais dos híbridos, sugerindo que não

há alteração substancial da atividade organizadora nucleolar nessas células,em decorrência da hibridação, que seja detectável ao nível das observações realizadas.

A posição dos nucléolos, predominantemente periférica nos nucléos das células dos gânglios cerebrais pode estar relacionada ao fenômeno de associação entre membrana nuclear e nucleólo que tem sido descrita em alguns organismos . Por exemplo, em núcleos de fígado de rato os nucléolos permanecem no interior da membrana nuclear apesar da expulsão do conteúdo nuclear, indicando uma firme ligação desses nucléolos. Ao nível ultraestrutural foi observado um pedículo ligando o nucléolo à membrana nuclear. Esse pedículo parece estar envolvido não apenas na ancoragem do nucléolo, mas também no suporte do DNA nucleolar (HUBERT *et alii*, 1984).

A técnica de coloração pela prata foi também utilizada para analisar aspectos da atividade organizadora nucleolar das células da região 1 do tecido adiposo de *D. mulleri*, em cinco fases do desenvolvimento, abrangendo desde larva do terceiro estádio inicial até a fase de pupa jovem.

Em insetos, o tecido adiposo é um sítio ativo do metabolismo intermediário, constituindo um acúmulo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Com base no seu papel funcional, o corpo gorduroso dos insetos tem sido comparado com o fígado dos vertebrados. Além disso, como já foi mencionado anteriormente neste trabalho, em *Drosophila* o corpo gorduroso modifica-se na metamorfose, de tal modo que, nas larvas, esse tecido origina-se do mesoderma do embrião, enquanto que no adulto origina-se de células diferenciadas durante a pupação.

As células do corpo gorduroso larval desaparecem geralmente dentro de dois dias após a emergência do adulto, graças à lise enzimática (revisão em RIZKI, 1978).

Essas características do tecido adiposo sugerem que o mesmo seja bastante adequado a um estudo da atividade organizadora nucleolar. De fato, o estudo da mesma mostrou aspectos que se pode considerar interessantes e que estão basicamente resumidos no gráfico apresentado na figura 7 deste trabalho. O primeiro deles é a observação de que ao longo dos cinco estádios analisados, desde larva do terceiro estádio precoce até pupa jovem de *D. mulleri*, as fêmeas apresentam áreas nucleolares médias significativamente maiores do que os machos.

Não há indicações de que as células adiposas dos machos sejam menores ou apresentem graus de politenia menores do que as fêmeas, apesar de que estas apresentam um número de células maior do que aquelas (RIZKI, 1978). Portanto, não se pode atribuir a esses aspectos da diferenciação a causa da diferença das médias entre os sexos. Uma hipótese é a de que o nível metabólico das fêmeas seja maior do que o dos machos, em conseqüência de seu maior tamanho e seu papel na produção de óvulos, exigindo, assim, uma atividade de síntese mais elevada.

Vale a pena destacar, ainda, que as medidas das áreas nucleolares médias obtidas por BICUDO (1982), na análise das glândulas salivares, também mostram para *D. mulleri*, no terceiro estádio adiantado (o único analisado no trabalho), valores mais altos em fêmeas do que em machos, embora a autora não tenha dado destaque a essa observação.

Um outro aspecto observado no presente trabalho é a diferença verificada entre as médias nucleolares dos cinco estádios. A variação dessas médias obedece a um mesmo padrão

de diminuição e aumento ao longo do desenvolvimento, em fêmeas e em machos, embora em níveis diferentes, pois, como já foi destacado anteriormente, as médias nucleolares das fêmeas são maiores do que as dos machos em todos os estádios. Esse padrão mostra um decréscimo das médias entre larvas de terceiro estádio inicial e pré-pupas e apresenta novo aumento em pupas jovens. É interessante observar que as médias nucleolares são mais elevadas no terceiro estádio inicial, cujas células são menores do que as do terceiro estádio tardio (BUTTERWORTH *et alii*, em RIZKI, 1978).

Os dados do presente trabalho mostraram também um alto grau de variabilidade quanto às áreas nucleolares, entre células de um mesmo indivíduo, tanto em fêmeas como em machos, em qualquer dos estádios analisados. Essa variabilidade intraindividual foi maior em larvas do terceiro estádio inicial e decresceu com o avanço do desenvolvimento. No terceiro estádio larval precoce e tardio as células das fêmeas apresentaram variabilidade maior que as dos machos.

Um alto grau de variabilidade foi também constatado entre as áreas nucleolares médias dos indivíduos incluídos em cada estádio do desenvolvimento, tanto em fêmeas como em machos. Com o avanço do desenvolvimento, essa variabilidade interindividual decresceu entre larvas de terceiro estádio inicial e puparium e sofreu aumento crescente a partir de pré-pupas. Nos três primeiros estádios, os valores dos coeficientes de variação das fêmeas e dos machos foram similares, mas divergiram a partir de pré-pupas.

Uma tentativa de explicar, pelo menos parte dessa variabilidade interindividual seria atribuí-la aos graus de

sincronização dos indivíduos nos diferentes estádios. A sincronização é maior nos estádios de curta duração, como puparium e pré-pupas, e maior em larvas do terceiro estádio tardio do que em larvas de terceiro estádio inicial e pupas jovens, pois, as larvas de terceiro estádio tardio apresentam uma característica morfológica bastante nítida que é a coloração marrom dos espiráculos anteriores. Portanto, embora o grau de sincronização possa explicar a diminuição da variabilidade de L3A a P1, não explica o seu aumento em pré-pupas e nem a divergência entre os dois sexos em pré-pupas e pupas jovens.

Assim, é possível que a variabilidade detectada no tecido adiposo possa ser atribuída a requerimentos específicos dos diferentes estádios do desenvolvimento e dos dois sexos ao longo deles, dentro do esquema de funcionamento baseado na autonomia individual e celular, já mencionada na INTRODUÇÃO deste trabalho.

Observou-se também, neste estudo, que o tecido adiposo caracteriza-se pela presença de gotas de gordura e grânulos ou glóbulos no citoplasma. Cada uma dessas estruturas tem também o seu padrão próprio de comportamento ao longo dos estádios. As gotas de gordura, presentes desde o terceiro estádio inicial, são de tamanho variável, aparecendo, muitas vezes, também no interior do nucléolo ou na sua periferia, deformando às vezes o contorno nucleolar. Grandes gotas de gordura no citoplasma são mais freqüentes nos estádios mais adiantados (pré-pupa e pupa jovem), parecendo resultar da reunião de gotas menores. A presença das gotas de gordura no interior dos nucléolos pode decorrer da penetração desta em es-

paços da estrutura nucleolar, no preparo das lâminas por esmagamento. Outras técnicas deverão ser utilizadas para testar esta hipótese.

Quanto aos grânulos, visualizam-se a partir do terceiro estádio adiantado, crescendo em tamanho e aparentemente diminuindo em número à medida que o desenvolvimento progride.

Na tentativa de obter maiores informações sobre esses materiais citoplasmáticos, foram utilizadas duas técnicas de coloração específicas. Uma delas é a técnica do Sudan Black B, específica para lipídeos e que se baseia no fato de que o Sudan Black dissolve-se mais facilmente nos lipídeos do que no álcool 70% (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983). O resultado da aplicação dessa técnica foi que as gotas de gordura coraram-se de preto. Segundo JUNQUEIRA & JUNQUEIRA (1983) essa coloração é indicativa de presença de colesterol e seus ésteres e triglicerídeos.

A segunda técnica específica empregada foi a do PAS, sozinho ou na combinação Azul de Alcian - PAS sendo, a primeira modalidade, específica para polissacarídeos que apresentam ligações 1-2 glicol e frequentemente utilizada para localização do glicogênio e certas glicoproteínas. Baseia-se na capacidade do ácido periódico de oxidar as ligações carbono-carbono das seqüências 1-2 glicol dos hidratos de carbono, produzindo aldeídos. Estes são revelados pelo reagente de Schiff que reage com os grupamentos aldeído, produzindo um composto corado e insolúvel de cor vermelha (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

Por sua vez, a aplicação do Alcian em combinação com o PAS permite detectar polissacarídeos ácidos, que se coram com o Alcian em azul celeste e os polissacarídeos neutros com agrupamento 1-2 glicol que se coram pelo PAS em vermelho (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

Os resultados obtidos no presente trabalho com a aplicação das duas técnicas de PAS indicaram a presença, no citoplasma das células em estudo, de polissacarídeos neutros, uma vez que a coloração rósea apareceu nos dois casos, corando principalmente os contornos das gotas de gordura (PAS) e os grânulos ou glóbulos citoplasmáticos (Azul de Alcian -PAS).

A literatura referente ao conteúdo citoplasmático das células adiposas mostra que, de fato, ele sofre alterações com a idade (revisão em RIZKI, 1978). BUTTERWORTH *et alii* (1965, em RIZKI, 1978) determinaram a porcentagem da área citoplasmática ocupada por lipídeos, glicogênio e proteínas em larvas do terceiro estádio inicial, médio e tardio, encontrando, respectivamente, 32%, 68% e 0% desses materiais no início do terceiro estádio, a 49 horas; a 72 horas, a quantidade relativa das inclusões foi, respectivamente, 49,2%,10,8% e 0,5% e a 95 horas, 32,6%, 8,7% e 22,7% .

Os glóbulos de proteínas começam, portanto, a se acumular no corpo gorduroso durante o terceiro estádio médio. Há alguma diferença regional entre as células do corpo gorduroso com relação ao tempo de sua formação. Por exemplo, as células das regiões 1 a 4 precedem ligeiramente as células das regiões 5 e 6. Variações no tempo de aparecimento dos glóbulos ocorrem também entre linhagens mutantes. O tamanho

dos glóbulos em células de um mesmo indivíduo também mostra considerável variabilidade. Em termos de quantidade absoluta do conteúdo citoplasmático, as células do corpo gorduroso devem perder cerca da metade dos glóbulos de proteínas, enquanto mantêm os níveis de lipídeos e glicogênio, durante o período pupal.

Uma descrição detalhada dos glóbulos de proteínas de células do corpo gorduroso de *Drosophila* foi feita por VON GAUDECKER (1963, em RIZKI, 1978) e a partir dessa descrição, bem como das observações de BUTTERWORTH *et alii* (já citado) tornou-se claro que essas inclusões são agregados heterogêneos. Ao nível da microscopia eletrônica, os glóbulos foram descritos, no primeiro trabalho, como estruturas compostas, consistindo de mitocôndrias degeneradas, porções do retículo endoplasmático rugoso, algum glicogênio, grande número de vesículas pinocíticas, lisossomos e elementos vesiculares de origem desconhecida. Esses conteúdos empacotados em unidades de membrana sugerem que eles são corpos citolisossômicos ou autofágicos. Estudos histoquímicos ainda de BUTTERWORTH *et alii* confirmaram a natureza composta dos glóbulos, mostrando reações positivas para proteínas e polissacarídeos. A marcação histoquímica dos lisossomos com fosfatase ácida, foi também demonstrada nesses glóbulos (BUTTERWORTH *et alii*,1972, em RIZKI, 1978).

A natureza lisossômica das inclusões sugere que elas desempenham um papel na lise das células do corpo gorduroso larval.

RUEGG (1968, em RIZKI, 1978) estudou a síntese

protéica no corpo gorduroso isolado de larvas de *D. melanogaster*. Esse autor observou que a síntese protéica (medida pela incorporação de aminoácidos marcados com isótopo radioativo) declinou rapidamente na última metade do terceiro estádio até tornar-se quase nula à época da formação do puparium. Usando métodos imunológicos, BOAVIDA & ROBERTS (1975, também em RIZKI, 1978) sugeriram que a maior parte das proteínas do soro nas larvas do terceiro estádio poderiam ter sido sintetizadas pelo corpo gorduroso.

PASTEUR & KASTRITSIS (1971, em RIZKI, 1978) examinaram proteínas e enzimas de vários órgãos e de homogeneizados totais durante o desenvolvimento de *D. pseudoobscura*. Três bandas de proteínas, G, H e M foram encontradas na hemolinfa em larvas de idade precoce (96 h) e essas bandas não apareceram no corpo gorduroso antes de atingidas 120 horas ou mesmo mais. A idade larval de 108 horas correspondeu ao terceiro estádio médio, nesse estudo, e os autores sugeriram que as bandas G, H e M podem representar proteínas secretadas pelo corpo gorduroso na hemolinfa e somente mais tarde, no desenvolvimento, estocadas no mesmo tecido. Esse período corresponde ao período em que os glóbulos protéicos começam a se acumular nas células do corpo gorduroso.

Em conclusão, a origem dos glóbulos de proteínas no corpo gorduroso larval é um aspecto interessante da diferenciação celular neste tecido e a anatomia funcional dessas estruturas pode ser vista como um sistema de interação confinado dentro de uma unidade de membrana (RIZKI, 1978).

A concentração citoplasmática de lipídeos e glicogênio, nas células do corpo gorduroso larval, permanece

relativamente uniforme através do terceiro estádio, mas o conteúdo total desses componentes na célula aumenta, pois o tamanho celular aumenta mais que o dobro nesse período (BUTTERWORTH *et alii*, 1965, em RIZKI, 1978). Nos adultos jovens, as células adiposas larvais contêm grandes gotas de gordura e acúmulos periféricos de glicogênio, bem como, depósitos de glicogênio em filamentos citoplasmáticos dispersos entre outros glóbulos citoplasmáticos.

Uma tentativa de correlacionar os dados obtidos no presente trabalho quanto à atividade organizadora nucleolar, envolvida na síntese protéica, e os dados mencionados, existentes na literatura, mostra que as médias nucleolares mais elevadas, constatadas no terceiro estádio larval precoce, coincidem com a fase de início da síntese protéica, quando as necessidades de ribossomos e conseqüentemente, de RNA ribossômico, são maiores. As médias das áreas nucleolares diminuem progressivamente a partir do terceiro estádio larval tardio, paralelamente ao declínio da síntese protéica medida pela incorporação de ácidos aminados e também paralelamente a uma provável redução das necessidades de RNA ribossômico.

Verifica-se também uma superposição das observações deste trabalho com os dados da literatura quanto ao fato de que os grânulos começaram a se tornar visíveis a partir do terceiro estádio adiantado, quando, segundo outros autores, começa a estocagem das proteínas no corpo gorduroso. Admitimos que os grânulos corados pelo PAS sejam os próprios grânulos de proteína, tendo em vista os vários dados da literatura que demonstram que esses grânulos coram-se também com coran-

tes para polissacarídeos.

Não fica clara, à luz dos dados da literatura, a causa do aumento das médias nucleolares constatado, no presente trabalho, no estádio de pupa jovem. O fato da amostra analisada nesse estádio ter sido menor, por uma questão de dificuldade técnica na manipulação do material, não invalida esses resultados, pois fêmeas e machos foram concordantes quanto a eles.

A variabilidade das médias das áreas nucleolares das células de mesmo indivíduo, bem como entre indivíduos talvez encontre um paralelismo com as variações no tempo de aparecimento e no tamanho dos glóbulos, descritos entre linhagens mutantes e em células de um mesmo indivíduo.

No que se refere às gotas de gordura, os resultados contidos em RIZKI (1978) mostram valores relativamente constantes no decorrer do terceiro estádio, dados que concordam com as observações aqui apresentadas , de que as gotas de gordura estão presentes desde o terceiro estádio inicial . Por outro lado, a presença de grandes gotas de gordura nos últimos estádios do desenvolvimento analisados neste trabalho , concordam com a observação, de grandes gotas desse material presentes nos adultos, nas células adiposas larvais neles remanescentes, descrita na literatura.

Finalmente, no presente trabalho, para melhor caracterizar os cromossomos metafásicos de *D. mulleri* e *D. arizonensis* e detectar possíveis modificações estruturais ocorridas no processo evolutivo, foram realizadas colorações específicas para bandamentos C e G. Apesar da pequena diferenciação morfológica detectada entre as espécies, ao nível da

morfologia dos cromossomos politênicos (WASSERMAN, 1954; BICUDO, 1979), pareceu-nos válida essa tentativa tendo em vista dois aspectos fundamentais: 1º) A não politenização das regiões heterocromáticas, nas glândulas salivares, que faz com que cromossomos metafásicos e politênicos apresentem às vezes, morfologia cromossômica diferente, causada pela presença de grandes extensões coráveis por bandamento C nos primeiros cromossomos; 2º) A utilização ainda restrita das bandas G, especialmente em *Drosophila*.

Os resultados obtidos neste trabalho, pela aplicação da técnica de bandas C, mostraram coloração das regiões centroméricas de todos os cromossomos, do cromossomo Y inteiro e dos microcromossomos. Essa marcação foi idêntica à produzida pelo uso das técnicas de coloração pela prata.

É preciso destacar os resultados obtidos quanto aos microcromossomos de *D. mulleri* e *D. arizonensis*, que se coram indicando presença de heterocromatina C e são portadores de RON (BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1981). Nos microcromossomos de *D. tumiditarsus*, também portadores de RONs, SINIBALDI & CUMMINGS (1981) não conseguiram detectar heterocromatina. Segundo os autores, este é o primeiro caso conhecido de locos autossômico sub-replicado (DNAr) que não está localizado em blocos heterocromáticos, sugerindo que o controle diferencial da duplicação do DNAr nas glândulas salivares não é dependente de uma associação com blocos de heterocromatina, como havia sugerido HENNIG & MEER (1971).

Quanto ao bandamento G de *D. mulleri* e *D. arizonensis*, este mostrou um padrão característico de bandas pa

ra cada par de cromossomos acrocêntricos. Esse padrão, entretanto, pode variar em função do grau de condensação cromossômica. As espécies não diferem quanto a esses padrões, ao nível de nossas análises.

Embora diferentes técnicas de banda G tenham sido utilizadas e várias modificações tenham sido introduzidas com o objetivo de obter padrões nítidos de bandamento G, entendemos que esses resultados não podem ser considerados precisos. O tamanho reduzido dos cromossomos mitóticos dessas espécies dificulta muito esse tipo de trabalho. A importância desses dados, porém, talvez esteja em que, ao que nos consta, este é o segundo trabalho que estuda padrão de bandas G em *Drosophila*, com algum sucesso e o primeiro que descreve o padrão obtido.

V. RESUMOS E CONCLUSÕES

No presente trabalho pretendeu-se, basicamente: 1) ampliar os conhecimentos relativos à atividade organizadora nucleolar de *D. mulleri* e *D. arizonensis* pelo estudo das células dos gânglios cerebrais de ambas as espécies e das células do tecido adiposo da primeira, no decorrer do desenvolvimento e 2) detectar possíveis diferenciações cromossômicas entre as duas espécies pelas técnicas de bandamentos C e G.

Os resultados obtidos foram fundamentalmente apresentados a seguir:

1) As técnicas de coloração pela prata, utilizadas em muitos organismos para marcar RONs ativas, mais uma vez, não foram eficientes nos cromossomos mitóticos das espécies de *Drosophila* do complexo Mulleri. Com essas técnicas conseguiu-se, em algumas células, corar apenas a heterocromatina centromérica de todos os acrocêntricos, o cromossomo Y e os microcromossomos, em ambas as espécies. Por estudos anteriores, envolvendo a associação entre cromossomos politênicos e nucléolos e a hibridação *in situ* nos cromossomos das glândulas salivares, sabe-se, entretanto, que a região proximal do cromossomo X e os microcromossomos são portadores de cístrons ribossômicos, nessas espécies.

2) Os nucléolos das células interfásicas dos gânglios cerebrais corados com nitrato de prata mostraram resultados semelhantes aos previamente obtidos em glândulas sa

livares, no que se refere à predominância de células com um único nucléolo em *D. mulleri* e *D. arizonensis*. Também como nas glândulas salivares, algumas células dos gânglios cerebrais de alguns indivíduos apresentaram mais de um nucléolo e mais frequentemente dois nucléolos. Entretanto, não ocorreu, nos gânglios cerebrais dos híbridos, um aumento da freqüência de células portadoras de mais de um nucléolo, fato observado nas glândulas salivares, sugerindo que a hibridação não altera esse aspecto da atividade organizadora nucleolar nas células ganglionares.

3) Nos núcleos das células dos gânglios cerebrais foi encontrada posição predominantemente periférica dos nucléolos, que pode estar relacionada ao fenômeno de associação morfológica entre membrana nuclear e nucléolo, descrita em alguns organismos.

4) As medidas das áreas nucleolares das células do tecido adiposo em cinco fases do desenvolvimento, de larva do terceiro estádio inicial a pupa jovem mostraram que:

a) as médias das áreas nucleolares das fêmeas são maiores do que as dos machos nos cinco estádios analisados;

b) as médias das áreas nucleolares diferem entre os cinco estádios, obedecendo a um mesmo padrão de diminuição e aumento em fêmeas e em machos embora em níveis diferentes, em decorrência de (a). As médias decrescem entre larvas do terceiro estádio inicial e pré-pupas e sofrem aumento

no estádio de pupa jovem;

c) um alto grau de variabilidade foi detectado entre as medidas das áreas nucleolares das células de cada indivíduo, tanto em fêmeas como em machos, em qualquer dos estádios analisados;

d) um alto grau de variabilidade das médias das áreas nucleolares foi também detectado entre as fêmeas e entre os machos de mesmo estádio, em todas as fases do desenvolvimento.

A correlação desses resultados quanto às medidas nucleolares com dados da literatura sobre a síntese protéica no tecido adiposo mostra que as médias nucleolares são mais elevadas no terceiro estádio larval inicial, quando a síntese protéica se inicia nesse tecido, e que o declínio das médias nucleolares acompanha o declínio da síntese protéica. Quanto às variabilidades intercelular e interindividual, das medidas nucleolares de fêmeas e machos, talvez possam ser atribuídas a requerimentos específicos dentro do esquema baseado em uma certa autonomia individual e celular.

5) O citoplasma do tecido adiposo apresentou gotas de gordura e grânulos ou glóbulos. As gotas de gordura estavam presentes desde o terceiro estádio larval inicial, aparecendo com maiores diâmetros nos estádios de pré-pupa e pupa jovem. Os grânulos tornaram-se visíveis a partir do terceiro estádio larval adiantado. Foram aplicadas técnicas específi-

cas de coloração para gorduras (Sudan Black B) e para polissacarídeos (PAS e Azul de Alcian combinado com PAS). As duas técnicas deram resultados positivos. As observações sobre esses materiais citoplasmáticos são concordantes com dados da literatura.

Os dados obtidos e a revisão da literatura mostram que o tecido adiposo, graças a seu padrão de diferenciação e à sua fisiologia é um excelente sistema para estudo da fisiologia gênica e seu controle.

6) Foi realizado ainda um estudo comparativo dos cromossomos mitóticos de *D. mulleri* e *D. arizonensis*, utilizando as técnicas de bandamento C e G.

Com a técnica de bandamento C, ocorreu marcação na região centromérica de todos os autossomos e cromossomos X, em todo o cromossomo Y e nos microcromossomos. Ao nível de nossas observações, as duas espécies não diferem quanto à localização das bandas C.

Com a técnica de banda G foi obtido um padrão característico de bandas para cada par de cromossomos. Entretanto, esse padrão, pode variar conforme o grau de condensação dos cromossomos. As espécies não diferem quanto a esse padrão, ao nível de nossas observações.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

In order to obtain additional information related to the nucleolar organizing activity of *D. mulleri* and *D. arizonensis*, cells of the larval brains of both species and cells of the fatty body of *D. mulleri* in five different developmental stages were examined. Besides, a comparison of both species using C and G banding techniques was performed with the intention of detecting differences between them at the chromosomal level.

The results showed basically that:

1. The Ag staining techniques used in several organisms for detecting active NORs once again were not effective in mitotic chromosomes of *Drosophila* species in the Mulleri complex. The single pattern obtained using those techniques was the staining of heterochromatic regions of the chromosomes, including the centromeres, the entire Y and the microchromosomes. However, previous studies based on the association between polytene chromosomes and nucleoli and on the in situ hibridization technique have shown that NORs are located in the proximal region of the X chromosome and in the microchromosomes of *D. mulleri* and *D. arizonensis*.

2. In the Ag stained cerebral ganglions, cells with a single nucleolus predominated, while cells and individuals with two to four nucleoli were scarce. These results were similar to those previously obtained in the salivary

gland cells of both species but differed from them in that in hybrids of both species the frequency of cells bearing more than one nucleolus increased in salivary glands but not in brains. These findings indicated that hybridization does not affect the numerical aspect of nucleoli in brains of the species studied.

3. Peripheric position of nucleoli was predominantly found in nuclei of brain cells and may be related to the phenomenon of morphological association between nuclear menbrane and nucleolus described in some organisms.

4. Measurements of nucleolar areas in cells fatty tissue in five phases of development, from early third instar larvae to young pupae showed that:

a) Mean nucleolar areas of females are greater that the ones of males, in the five stages analyzed;

b) Mean nucleolar areas of the five stages are different from each other, following the same pattern of decreasing and increasing in males and females, although in different levels as a consequence of (a). The values decrease from early third instar larvae to prepupa and increase in young pupae;

c) A high degree of variability was found among measurements of nucleolar areas of cells from a single individual, in males as in females, in every analyzed stage ;

d) A high degree of variability of nucleolar

areas was also found among individuals from the same stage, in males and females, in every analyzed stage.

A comparison of these results on the nucleolar areas with data in the literature concerned with protein synthesis in fatty bodies shows that the greatest nucleolar means were found in the early third instar larvae when protein synthesis begins. It also showed that the decreasing of nucleolar means follows the decreasing of protein synthesis.

In relation to the intercell and interindividual variabilities of nucleolar measures in males and female of every stage analysed, they are probably reflecting specific requeriments following the known pattern of cell autonomy.

5. The cytoplasm of cells of fatty tissue showed fatty droplets and grains or globules. The fatty droplets were present from early third instar till young pupae, showing the greatest diameters predominantly in the late stages analyzed, that is, prepupa and young pupae. The globules appeared firstly in the late third instar.

Specific techniques for fat (Sudan Black B) and for polyssacarides (PAS and combined Alcian Blue-PAS)were used with positive results.

The observations on these cytoplasmatic materials were in accord with data in the literature.

In conclusion, all these results on nucleolar areas and cytoplasmic materials and the differentiation and synthesis patterns known from data in the literature show that fatty bodies are an excelent system for studies on gene

function and its control.

6. This study also involved a comparative analysis of mitotic chromosomes of *D. mulleri* and *D. arizonensis* submitted to the C and G banding techniques.

C-banding technique marked centromeric regions of all chromosomes, the entire Y and microchromosomes. At the level of our observations the mentioned species do not differ as to this pattern.

G-banding technique showed a specific pattern for each chromosome. However this pattern varies according to the degree of chromosome condensation. In this case the two species also do not show detectable specific variation.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.J.C. & CHU, T.S. Regiões organizadoras de nucléolo em quatro espécies do gênero *Oryzomys* (Cricetidae, Rodentia). *Ciênc. e Cult., 37* (7 Supl.): 745, 1985.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. & TOLEDO FILHO, S.A. Complex sex chromosome system in *Eigenmannia sp.* (Pisces, Gimnotiformes). *Genetica, 64*:165-69, 1984.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F. & FORESTI, F. As regiões organizadoras do nucléolo em peixes. *Ciênc. e Cult., 37*:448-53, 1985.

ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics, 10*:81-6 , 1971.

ASSIS, M.F.L. *Regiões organizadoras de nucléolos em Akodon arviculoides* e *Akodon sp* (Cricetidae, Rodentia). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1980, 104 p.

ATHERTON, D. & GALL, J. Salivary gland squashes for in situ nucleic acid hybridization studies. *Drosophila Inf. Serv., 49*:131-33, 1972.

BECK, M. Localization of constitutive heterochromatin in the chromosomes of *Drosophila virilis*. *Cytologia, 42*:53-55 , 1977.

BEDO, D.G.C. Q and H-banding in the analysis of Y chromosome rearrangements in *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Chromosoma, 77* : 299-308, 1980.

BERNHARD, W. Ultrastructural aspects of the normal and pathological nucleolus in mammalian cells. *National Cancer Institute Monographs, 23*: 18-38, 1966.

BICUDO, H.E.M.C. Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo mulleri (Grupo Repleta), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar (Tese de Livre-Docência) - IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, 1979.

BICUDO, H.E.M.C. Nucleolar organizer activity and its regulatory mechanisms in *Drosophila* species of the "Mulleri" complex and their hybrids. *Caryologia, 34*(2):231-53, 1981a.

BICUDO, H.E.M.C. Further observations on the nucleolar organizing activity in salivary gland cells of *Drosophila mulleri, D. arizonensis* and their hybrids. *Biol. Zbl 100*: 597-612, 1981b.

BICUDO, H.E.M.C. Regulação da atividade organizadora Nucleolar em *Drosophila*. *Ciênc. e Cult. 34*(4): 465-69, 1982.

BICUDO, H.E.M.C. Evidence for gene amplification operating in dosage compensation in *Drosophila arizonensis*. *Biol. Zbl. 102*:685-95, 1983.

BICUDO, H.E.M.C. Organizadores de nucléolos em insetos. *Ciên. E Cult., 37*: 440-48, 1985.

BICUDO, H.E.M.C. & RICHARDSON, R.H. Gene regulation in *Drosophila mulleri, D. arizonensis*, and their hybrids. The nucleolar organizer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74*:3498-502, 1977.

BICUDO, H.E.M.C. & RICHARDSON, R.H. Morphological and developmental studies of *Drosophila mulleri, D.arizonensis* and their hybrids. *Biol. Zbl., 97*: 195-203, 1978.

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. IV* : 477-81, 1981.

BRAMWELL, M.E. & HANDMAKER, S. D. Ribosomal RNA synthesis in human-mouse hybrid cells. *Biochim. Biophys. Acta, 232*: 580-83, 1971.

BROWN, S.W. Heterochromatin. *Science, 151*:417-25, 1966.

BROWN, D.D.; WENSINK, P.C. & JORDAN, E. A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J. Mol. Biol. 63*:57-73, 1972.

BUCCI-INNOCENTI, S. ; RAGGHIANTI, M. & MANCINO, G. Chromosome and C-heterochromatin polymorphysms in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Chromosoma, 88*:208-15, 1983.

BUSBY, S.J. & REEDER, R.H. Spacer sequences regulate transcription of ribossomal gene plasmids injected into *Xenopus* embryos. *Cell, 34*: 989-96, 1983.

BUSCH, H. & SMETANA, K. *The Nucleolus*. New York, Academic Press, 1970.

CELLA, D. & FERREIRA, A. Estudos cromossômicos em *Schistocerca flavofasciata* (Orthoptera-Acrididae) através de coloração diferencial (Bandamento). *Ciênc. e Cult. 34* (7 Supl.): 775, 1982.

CLAVAGUERA, A.; QUEROL, E.; COLL, D.; GENESCA, J. & EGOZCUE, J. Cytochemical studies on the nature of NOR (Nucleolus organizer region) silver stainability. *Cellular & Molecular Biology*, *29*:255-59, 1983.

CLAVAGUERA, A.; QUEROL, E.; COLL, D. & EGOZCUE, J. In silver stainability on nucleolar organizer regions exclusively atributable to proteins? *Cellular and Molecular Biology*, *30*:175-77, 1984.

COMINGS, D.E.. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome strutcture. *Ann. Rev. Genet.*, *12*:25-46, 1978.

COMINGS, D.E.; AVELINO, E.; OKADA, T.A. & WYANDT, H.E. The mechanism of C - and G- banding of chromosomes. *Exp. Cell Res.*, *77*:469-93, 1973.

CURTIS, D.J. & HOROBIN, R.W. Staining banded human chromosomes with Romanowsky dyes: some practical consequences of the nature of the stain. *Humangenetik*, *26*: 99-104, 1975.

DEMEREC, M. & KAUFMANN, B.P. *Drosophila guide*. The Lord Baltimore Press, Baltimore, Maryland, 1945.

DEVICTOR, M,; HARTUNG, M. & STAHL, A. Distribuition of fibrilar centers and silver-stained components in the nucleolus of human Sertoli cells. *Biol. Cell*, *50*:103-06, 1984.

DITTES, J.; KRONE, W.; BROSS, K.; SCHMID, M. & VOGEL, W. - Biochemical and cytogenetic studies on the nucleolus organizer regions (NORs) of man. *Humangenetik* , *26*: 47-59,1974.

DRETS, M.E. & SHAW, M.W. Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68*:2073-77, 1971.

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

EIGENBROD, J. Differences in the number of nucleolus organizers in *Chironomus tepperi* shown by in situ hybridization. *Chromosoma, 67*: 63-6, 1978.

ELICEIRI, G.L. & GREEN, H. Ribosomal RNA synthesis in human - mouse hybrid cells. *J. Mol. Biol. 41*: 253-60, 1969.

ESTABLE, C. & SOTELO, J. R. Una nueva estructura celular: el nucleolonema. *Publ. Inst. Inv. Cien. Biol.,1*:105-26, 1951.

EVANS, H. J.; BUCKLAND, R. A. & PARDUE, M. L. Location of the genes coding for 18 S and 28 S ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma, 48*: 405-26, 1974.

FARAH, S. B. Organizadores nucleolares e alterações cromossômicas na espécie humana. *Ciênc. e Cult. 34*: 474-79, 1982.

FERGUSON- SMITH, M. A. & HANDMAKER, D. Observations on satellited human chromosomes. *Lancet, 1*: 638-40, 1961.

FLAVELL, R. B. & SMITH, D. B. Variation in nucleolar organizer rRNA gene multiplicity in wheat and rye. *Chromosoma. 47:* 327-34, 1974.

FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. & TOLEDO FILHO, S.A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell Genet.*, *31*:137-44, 1981.

GATTI, M.; PIMPINELLI, S. & SANTINI, G. Characteization of *Drosophila* heterochromatin: I. Staining and decondensation with Hoechst 33258 and quinacrine. *Chromosoma*, *57*:351-75, 1976.

GOESSENS, G. & LEPOINT, A. The fine structure of the nucleolus during interphase and mitosis in Ehrlich tumor cells cultivated "in Vitro". *Experimental Cell Research*, *87*: 63-72, 1974.

GOESSENS, G. & LEPOINT, A. The nucleolus-organizing region (NOR'S): recent data and hypotheses. *Biol. Cell.*, *35*: 211-220, 1979.

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

GUEST, W.C. Banding of the somatic chromosomes of *Drosophila virilis*. *The jornal of Heredity*, *71*: 357-58, 1980.

GUIMARÃES, M. C. &BICUDO, H.E.M.C. Yeast also increases the frequency of metaphases in *Drosophila* brain. *Brazil. J. Genetics*, *V*,*(2)*: 433-36, 1982.

HÄGELE, K. Characterization of heterochromatin in *Schistocerca gregaria* by C- and N-banding methods. Chromosoma, 70: 239-50, 1979.

HAGELE, K. & RANGANATH, H. A. The chromosomes of two *Drosophila* races: *D. nasuta nasuta* and *D. nasuta albomicans*. III. Localization of nucleolar organizer regions. *Genetica, 60*: 123-28, 1983.

HALFER, C.; PRIVITERA, E. & BARIGOZZI, C. A study of spontaneous chromosome variations in seven all lines derived from *Drosophila melanogaster* stocks marked by translocations. *Chromosoma, 76*: 201-18, 1980.

HARTLEY, S. E. & HORNE, M. T. Chromosome polymorphism and constitutive heterocromatin in the Atlantic salmon *Salmo salar*. *Chromosoma, 89*:377-80, 1984.

HENNIG, W. & MEER, B. Reduced popyteny of ribosomal RNA cistrons in giant chromosomes of *Drosophila hydei*. *Nature New Biol., 233*:70-72, 1971.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolar organizer regions. *Biol. Cell, 49*: 191-202, 1983.

HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal gene activity:silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosome. *Chromosoma, 62*: 361-67, 1977.

HOWELL, W.M. & HSU, T. C. Chromosome core structure revealed by silver staining. *Chromosoma, 73*: 61-66, 1979.

HOWELL, W.M. & BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective coloidal developer: 1-step method. *Experientia, 36*: 1014-15, 1980.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

HSU, T. C. Heterochromatin pattern in metaphase chromosomes of *Drosophila melanogsster*. *J. Hered, 62*: 285-87, 1971.

HUBERT, J.; BUREAU, J. & BOUTEILLE, M. Anchorage of the nucleolus in the pore complex-lamina by a DNA-bearing structure masked *in situ* in rat liver nuclei. *Biol. Cell, 52*: 91-102, 1984.

HUTCHINSON, J. & MILLER, T.E. Comparison of the chromosomes of *Triticum timopheevi* with related wheats using the techniques of C- banding and *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet., 64*: 31-40, 1982.

JOHN, B. & KING, M. Heterochromatin variation in *Cryptobothrus chrysophorus*. III. Synthetic hybrids. *Chromosoma, 78*:165-86, 1980.

JOHN, B. & KING, M. Population cytogenetics of *Atractomorpha similis*. I. C-band variation. *Chromosoma, 88*: 57-68,1983.

JUNQUEIRA, L.C.U. & JUNQUEIRA, L.M.M.S. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. São Paulo, Livraria Santos Editora, 1983. 123p.

KASAHARA, S. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Chromosomal variability in *Akodon sp* (Rodentia, Cricetidae). *Cytologia, 47* : 317-24, 1982.

KASAHARA, S. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Sex-chromosome variability in *Zygodontomys lasiurus*(Rodentia, Cricetidae). *Cytologia, 48*: 569-576, 1983.

KENTON, A. Giemsa C-banding in *Gibasis* (Commelinaceae). *Chromosoma, 65*: 309-24, 1978.

LOENING, U. E.; JONES, K. W. & BIRNSTIEL, M. L. Properties of the ribosomal RNA precursor in *Xenopus laevis;* comparison to the precursor in mammals and in plants. *J. Mol. Biol., 45*: 353-66, 1969.

LONG, E. O. & DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem., 49*: 727-67, 1980.

MAIA-FURTADO, V. Padrão de bandas G, C e RONs em *Wiedomys Pyrrhorhinus* (Cricetidae, Rodentia). *Ciênc. e Cult., 38* (7 Supl.): 946, 1986.

MCCLINTOCK, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z. Zellforsch., 21*: 294-328, 1934.

MELLO, M. L. S. & VIDAL, B. C. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 1980. 69p.

MENGDEN, G. A. Linear differentiation of the C-band pattern of the W chromosome in snakes and birds. *Chromosoma, 83*: 275-87, 1981.

MILLER, L. & BROWN, D. D. Variation in the activity of nucleolar organizers and their ribosomal gene content. *Chromosoma, 28*: 430-44, 1969.

MILLER, L. & GURDON, J. B. Mutations affecting the size of the nucleolus in *Xenopus laevis*. *Nature, 227*: 1108-10, 1970.

MIRRE, C. & KNIBIEHLER, B. Quantitative ultraestructural analysis of fibrillar centers in the mouse: Correlation of their number and volume with nucleolar organizers - activity. *Protoplasma, 121*: 120-28, 1984.

MIRRE, C. & KNIBIEHLER, B. Ultraestructural and functional variations in the spermatid nucleolus during spermiogenesis in the mouse. *Cell Differentiation, 16*: 51-61, 1985.

MORIELLE, E.; VARELLA-GARCIA, M & TADDEI, V.A. RONs em Morcegos das subfamílias Phyllostominae e Glossophaginae (Chiroptera, Phylostomidae). Resumos do 12º CIP, São José do Rio Preto: 14, 1985.

MOTARA, M. A. Giemsa C-banding in four species of mosquitoes. *Chromosoma, 86*: 319-23, 1982.

MOTARA, M. A. & RAI, K. S. Giemsa C-banding patterns in *Aedes. (Stegomya)* mosquitoes. *Chromosoma, 70*: 51-58, 1978.

OCHS, R. L. & BUSCH, H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110 KD/p I 5,1) is the nucleolar silver staining protein. *Exp. Cell Res., 152*: 260-65, 1984.

ONISHI, T.; BERGLUND, C. & REEDER, R. H. On the mechanism of nucleolar dominance in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81*: 484-87, 1984.

PARDUE, M. L. & GALL, J. G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science, 168*: 1356-58, 1970.

PARDUE, M. L.; GERBI, S. A.; ECKHART, R.A. & GALL, J. C. - Cytological localization of DNAcomplementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. *Chromosoma, 29:* 268-90, 1970.

PEBUSQUE, M. J. & SEITE, R. Evidence of a circadian rythm in nucleolar components of rat superior cervical ganglion neurons with particular reference to the fibrillar centers : an utrastructural and stereological analysis. *J. Ultrastruct. Res., 77*: 83-92, 1981.

PIJNACKER, L. P. & FERWERDA, M. A. Giemsa C-banding of potato chromosomes. *Can. J. Genet. Cytol., 26*: 415-19, 1984.

PIMPINELLI, S., SANTINI, G. & GATTI, M. Characterization of *Drosophila* heterochromatin. II. C- and G- Banding. *Chromosoma, 57*: 377-86, 1976.

RECCO, S. M. *Contribuição ao estudo de heterocromatina em Drosophila nebulosa* (Dissertação de Mestrado). Instituto de Biologia da UNICAMP. Campinas, SP, 1980. 98p.

REEDER, R. H., ROAN, J. G. & DUNAWAY, M. Spacer Regulation on *Xenopus* ribossomal gene transcription: competition in oocytes. *Cell, 35*: 449-56, 1983,

RITOSSA, F.M. & SPIEGELMAN, S. Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 53*: 737-45, 1965.

RITOSSA, F. M. ; ATWOOD, K. C. & SPIEGELMAN, S. A molecular explanation of the bobbed mutants of *Drosophila* as partial deficiences of "ribosomal" DNA. *Genetics, 54*: 819-34, 1966.

RIZKI, T.M. Fat body. In: ASHBURNER, M. & WRIGHT, T.R.F. - eds. *The genetics and biology of Drosophila*. London, Academic Press Inc., *2b*, 1978. p 561-601.

RUIZ, I. R. G. Organizadores nucleolares e evolução cariotípica em anfíbios poliplóides. *Ciênc. e Cult. 34*: 470-73, 1982.

SASAKI, K. & KENDALL, M. D. The morphology of the haemopoietic cells of the yolk sac in mice with particular reference to nucleolar changes. *J. Anat ., 140*: 279-95, 1985.

SASAKI, K.; MATSUMURA, G. & ITO, T. Morphometric analises of postnatal erythropoieses in the spleen and bone marrow of the mouse. *Archivum histologicum japonicum, 45*: 247-55, 1982.

SASAKI, K.; MATSUMURA, G. & ITO, T. A quantitative morphology of nucleoli of erythroblasts in the mouse spleen: an electron microscopic study. *Archivum histologicum japonicum, 47*:239-50, 1983.

SBALQUEIRO, I. J.; MATTEVI, M. S.; OLIVEIRA, L. F. B. & FREITAS, T. R. O. Homologias de bandas G em akodontinos de diferentes localidades do sul do Brasil. *Ciênc. e Cult.*, 36 (7 Supl.): 793, 1984.

SCHMID, M. ; OLERT, J. & KLETT, C. Chromosome banding in amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus. Chromosoma , 71*: 29-55, 1979.

SCHWARZACHER, H. G.; MIKELSAAR, A. V. & SCHNEDL, W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions . *Cytogenet. Cell Genet.*, *20*: 24-39, 1978.

SCOTT, M. D. S.; TRAJTENGERTZ, I. & BEÇAK, M. L. Variação no padrão de organizadores nucleolares e uniformidade no padrão de heterocromatina constitutiva em espécies do gênero *Bothrops* (serpentes). *Ciênc. e Cult.* 37(7 supl.): 711, 1985.

SEIXAS, R. B.; VARELLA-GARCIA, M. & TADDEI, V. A. Polimorfismo de heterocromatina constitutiva em *Vampyrops lineatus*. (Chiroptera, Phyllostomidae, Stenodermatidae). Resumos do 10º Colóquio de Incentivo à Pesquisa, São José do Rio Preto: 25, 1983.

SEN, P. & SHARMA, T. Characterization of G. banded chromosomes of the Indian muntjac and progression of banding patterns through different stages of condensation. *Cytogenet. Cell Genet.*, *39*:145-49, 1985.

SHARMA, A. K. & SHARMA, A. *Chromosome Techniques. Theory and Practice*. Third edition, Butterworths, 1980. 711p.

SINCLAIR, J. H. & BROWN, D. D. Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal deoxyribonucleic acid of eukaryotes and some of their physical characteristics. *Biochemistry*, *10*: 2761-69, 1971.

SINCLAIR, J. H. ; CARROLL, C. R. & HUMPHREY, R. R. Variation in r DNA redundancy level and nucleolar organizer length in normal and variant lines of the Mexican axolotl. *J. Cell Sci., 15*: 239-57, 1974.

SINIBALDI, R. M. & CUMMINGS, M. R. Localization and characterization of r DNA in *Drosophila tumiditarsus*. *Chromosoma, 81*: 655-71, 1981.

SOLA, L.; CAMERINI, B. & CATAUDELLA, S. Cytogenetics of Atlantic eels: C-and G- banding, nucleolus organizer regions, and DNA content. *Cytogenet. Cell Genet., 38*:206-10, 1984.

SOUZA, M. J. & YONENAGA-YASSUDA, Y. G- and C- band patterns and nucleolus organizer regions in somatic chromosomes of *Clyomys laticeps laticeps* (Rodentia, Echimyidae). *Experientia, 40*: 96-7, 1984.

SOZANSKII, O. A. & TEREKHOV, S. M. Clonal analysis of intercellular variability of nucleolar organizer activity in human chromosomes. *Bull. Exp. Biol. Med., 97*: 638-42 , 1984.

SOZANSKII, O. A., ZAKHAROV, A. F. & BENJUSH, V. A. Intercellular NOR-AG variability in man. I. Technical improvements and marker acrocentric chromosomes. *Hum. Genet., 68*: 299-302, 1984.

STACK, S. M. & COMINGS, D. E. The chromosomes and DNA of *Allium cepa*. *Chromosoma, 70*: 161-81, 1979.

STEEL, R.G.D.& TORRIE, J.H. *Principles and Procedures of statistics.* New York, Mc Graw-Hill Book Company, INC. 1960, 481p.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl.Cell Res., 75*:304-06, 1972.

SUMNER, A. T. Dye Binding mechanisms in G-banding of chromosomes. *Journal of microscopy, 119*: 394-406, 1980.

SUMNER, A.T.; EVANS, H.J. & BUCKLAND, R.A. New techinque for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol. 232*: 31-32, 1971.

VAGNER- CAPODANO, A.M. & STAHL, A. Numerical relationship between nucleolar organizer regions and fibrilar centres in porcine thyroid cells cultivated "in vitro". *Biol.Cell., 45*: 111, 1982.

WASSERMAN, M. Cytological studies of the Repleta group. *Univ. of Texas Publ., 5422*: 130-152, 1954.

WEBB, G. C.; WHITE, M. J. D.; CONTRERAS, N. & CHENEY, J. Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba* (formely *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome banding studies. *Chromosoma, 67*: 309-39, 1978.

WHARTON, L. T. Analysis of the metaphase and salivary chromosome morphology within the genus *Drosophila*. *Univ. of Texas Publ., 4313*: 282-319, 1943.

WHEELER, L.L.; ARRIGHI, F.; CORDEIRO-STONE, M. & LEE, C.S. Localization of *Drosophila nasutoides* satellite DNAs in metaphase chromosomes. *Chromosoma, 70*: 41-50, 1978.

WILKINSON, J. The cytology of Salix in relation to its taxonomy. *Annals of Botany*, *8*: 269-84, 1944.

YONENAGA-YASSUDA, Y. Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos nos roedores. *Ciênc. e Cult. 37*: 453-56, 1985.

YOSHIDA, M.C. & KODAMA, Y. C-band patterns of chromosomes in 17 strains of mice. *Cytogenet. Cell Genet.*, *35*: 51-56, 1983.

YUNIS, J. J.; SAWYER, J. R. & BALL, D. W. The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man. *Chromosoma*, *67*: 293-307, 1978.


cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19