

Satiko Nanya - Oyama

Estudo de Cromossomos Politênicos e da
Síntese Proteica Sob Efeito de Choques de
Temperatura, em *Drosophila Mulleri*,
D. Arizonensis e Híbridos



1910000623



SATIKO NANYA-OYAMA

**ESTUDO DE CROMOSSOMOS POLITÊNICOS E DA
SÍNTESE PROTEICA SOB EFEITO DE CHOQUES
DE TEMPERATURA, EM *DROSOPHILA MULLERI*,
D. ARIZONENSIS E HÍBRIDOS**

Tese apresentada para a obtenção do
Grau de Doutor em Ciências (Área:
Genética), no Curso de Pós-Gradua-
ção em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Genética, do Insti-
tuto de Biociências, Letras e Ciên-
cias Exatas da Universidade Esta-
tural Paulista, UNESP.



623/93

São José do Rio Preto

1993





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) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

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) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Ao Akio,

pelo incentivo, compreensão,
carinho e paciência...

Ao finalizar este trabalho,

À Profa. Dra. Herdedico: Ily Melara
de Campos Bicudo, pelo exemplo de
vida, de dedicação ao trabalho e à
Ciência, sempre incentivando-me e
encorajando-me nos momentos mais
difíceis, nestes doze anos de
agradável Ao Akio, convivência e
aprendendo pelo incentivo, compreensão,
carinho e paciência...

O meu Muito Obrigado.

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara
de Campos Bicudo, pelo exemplo de
vida, de dedicação ao trabalho e à
Ciência, sempre incentivando-me e
encorajando-me nos momentos mais
difíceis, nestes doze anos de
agradável descoberta convivência e
aprendizado.

O meu Muito Obrigado.



ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. Espécies Utilizadas	19
2. Estádios do Desenvolvimento e Temperaturas de Experimentação	19
3. Obtenção de Larvas de <i>Drosophila mulleri</i> e <i>D. arizonensis</i>	21
4. Obtenção de Larvas Híbridas F1	22
5. Preparações Citológicas	23
5.1. Procedimentos de incubação	23
5.2. Preparo das lâminas	24
5.3. Medidas de área dos pufes	25
6. Eletroforese Descontínua Utilizando Géis de Poliacrilamida Contendo SDS (SDS-PAGE)	25
6.1. Preparo dos géis	28
6.2. Condições de eletroforese	33
6.3. Preparação das amostras	34
6.4. Procedimentos de incubação de glândulas salivares e larvas para eletroforese e autorradiografia	34
6.5. Secagem dos géis	36
6.6. Determinação do peso molecular	37
6.7. Densitometria	40
7. Fotomicrografias e Fotografias dos Géis	40
III. RESULTADOS	41
1. Temperatura e Desenvolvimento, em <i>Drosophila mulleri</i> e <i>D. arizonensis</i>	41
2. Padrão de Pufes no Cromossomo Salivares Substituídas a Anomalias Resfriamento	42
2.1. <i>Drosophila mulleri</i>	45
2.2. <i>Drosophila arizonensis</i>	49
2.3. Híbridos <i>D. mulleri</i> / <i>D. arizonensis</i>	52
3. Padrão de Bandas de Proteína Total de Larvas de <i>D. mulleri</i> , <i>D. arizonensis</i> e híbridos	63
3.1. Eletroforese em SDS-PAGE a 10%	67
3.2. Eletroforese em SDS-PAGE em gradiente linear de 7 a 10%	73

"A Ciência não é um mecanismo, mas um progresso humano, e não uma série de descobertas, mas a procura das mesmas".

Jacob Bronowski

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. Espécies Utilizadas	19
2. Estádios do Desenvolvimento e Temperaturas de Experimentação	19
3. Obtenção de Larvas de <i>Drosophila mulleri</i> e <i>D. arizonensis</i>	21
4. Obtenção de Larvas Híbridas F1	22
5. Preparações Citológicas	23
5.1. Procedimentos de incubação	23
5.2. Preparo das lâminas	24
5.3. Medidas de área dos pufes	25
6. Eletroforese Descontínua Utilizando Géis de Poliacrilamida Contendo SDS (SDS-PAGE)	25
6.1. Preparo dos géis	28
6.2. Condições de eletroforese	33
6.3. Preparação das amostras	34
6.4. Procedimentos de incubação de glândulas salivares e larvas para eletroforese e autorradiografia	34
6.5. Secagem dos géis	36
6.6. Determinação do peso molecular	37
6.7. Densitometria	40
7. Fotomicrografias e Fotografias dos Géis	40
III. RESULTADOS	41
1. Temperatura e Desenvolvimento, em <i>Drosophila mulleri</i> e <i>D. arizonensis</i>	41
2. Padrão de Pufes no Cromossomo 2 em Glândulas Salivares Submetidas a Aquecimento e Resfriamento	42
2.1. <i>Drosophila mulleri</i>	45
2.2. <i>Drosophila arizonensis</i>	49
2.3. Híbridos <i>D. mulleri</i> / <i>D. arizonensis</i>	54
3. Padrão de Bandas de Proteína Total de Larvas de <i>D. mulleri</i> , <i>D. arizonensis</i> e híbridos	63
3.1. Eletroforese em SDS-PAGE a 10%	67
3.2. Eletroforese em SDS-PAGE em gradiente linear de 7 a 15%	73

1. Padrão de Bandas de Proteína Total de Glândulas Salivares Submetidas a Eletroforese em SDS-PAGE em Gradiente Linear de 7 a 15%	79
4.1. Incubação em meio Grace	79
4.2. Incubação em meio Grace e metionina - ³⁵ S	82
IV. DISCUSSÃO	86
V. RESUMO E CONCLUSÕES	101
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS	105
VII. BIBLIOGRAFIA	109
VIII. AGRADECIMENTOS.....	127

Os conhecimentos que se tem hoje sobre os pufes resultam da soma dos dados de muitos autores, incluindo desde as observações de BALBIANI (1881), em *Chironomus*, e os trabalhos de HEITZ & BAUER (1933) em *Bibio*, HEITZ (1935) em *Sciara*, BRIDGES (1935) e BAUER (1936) em *Drosophila*, BREUER & PAVAN (1955) em *Rhynchosciara*, BEERMANN (1956) em *Chironomus*, entre outros, até observações mais recentes envolvendo técnicas de isolamento e sequenciamento do DNA dessas regiões e análises mais sofisticadas de seus produtos proteicos (por exemplo, BURRIS et al., 1990; THUMMEL et al., 1990; ASHBURNER, 1990).

Desde a década de 1950, sabe-se que o padrão de pufes em tecidos larvais, por exemplo, de *Chironomus*, *Drosophila* ou *Rhynchosciara*, muda de maneira regular durante o desenvolvimento (BECKER, 1959; PAVAN & BASILE, 1966). Essas mudanças na atividade dos pufes são controladas pelo mesmo hormônio esteroide que controla o desenvolvimento dos insetos, a ecdisona (BECKER, 1959; CLEVER &

I. INTRODUÇÃO

ASHBURNER & RICHARDS, 1976). Sabe-se também que pufes tardios podem estar sob o controle de pufes precoces, cujos produtos, Em *Drosophila*, como em outras espécies de dípteros, vários pufes podem ser observados ao longo dos cromossomos politênicos de larvas e em alguns tipos de células dos adultos. Os pufes são visíveis como dilatações de algumas regiões dos cromossomos, que resultam do acúmulo de RNA e proteínas. Cada um desses pufes inclui uma secção do DNA do genoma, da qual o RNA é transcrito. A transcrição do DNA cromossômico pode ser considerada como a expressão da atividade dos genes, e o padrão dos pufes em tipos particulares de células pode, assim, representar o padrão de seus genes ativos (BERENDES, 1972).

Os conhecimentos que se tem hoje sobre os pufes resultaram da soma dos dados de muitos autores, incluindo desde as observações de BALBIANI (1881), em *Chironomus*, e os trabalhos de HEITZ & BAUER (1933) em *Bibio*, METZ (1935) em *Sciara*, BRIDGES (1935) e BAUER (1936) em *Drosophila*, BREUER & PAVAN (1955) em *Rhynchosciara*, BEERMANN (1956) em *Chironomus*, entre outros, até observações mais recentes envolvendo técnicas de isolamento e sequenciamento do DNA dessas regiões e análises mais sofisticadas de seus produtos proteicos (por exemplo, BURTIS et al., 1990; THUMMEL et al., 1990; ASHBURNER, 1990).

Desde a década de 1950, sabe-se que o padrão de pufes em tecidos larvais, por exemplo, de *Chironomus*, *Drosophila* ou *Rhynchosciara*, muda de maneira regular durante o desenvolvimento (BECKER, 1959; PAVAN & BASILE, 1966). Essas mudanças na atividade dos pufes são controladas pelo mesmo hormônio esteróide que controla o desenvolvimento dos insetos, a ecdisona (BECKER, 1959; CLEVER &

KARLSON, 1960; ASHBURNER & RICHARDS, 1976). Sabe-se também que pufes tardios podem estar sob o controle de pufes precoces, cujos produtos, em alguns casos, hoje estão identificados como proteínas de ligação ao DNA (minirevisão em ASHBURNER, 1990). Assim, verificou-

As mudanças na atividade de pufação durante o desenvolvimento normal foram descritas para várias espécies de *Drosophila*, como *D. melanogaster* (ASHBURNER, 1970a, b, 1972a), *D. hydei* (BERENDES, 1972), *D. pseudoobscura* (STOCKER & KASTRITSIS, 1972), *D. subobscura* (FRUTOS & LATORRE, 1982; PASCUAL et al., 1985) e *D. guanche* (MOLTÓ et al., 1988). al., 1945). Verificou-se que a

Em adição às mudanças na atividade gênica correspondentes ao padrão normal do desenvolvimento, há mudanças que ocorrem como consequência do efeito de uma variedade de injúrias ambientais como, por exemplo, tratamento com altas temperaturas. A descoberta da indução de um conjunto específico de pufes por choque de temperatura (RITOSSA, 1962) contribuiu para a análise da estrutura e função gênicas em *Drosophila*. O trabalho de RITOSSA mostrou que o padrão de pufes pode ser bastante perturbado por influência do ambiente externo. *hydei* é uma exceção segundo LEENDERS & BECKERS, 1972). O

Em 1964, RITOSSA ampliou o conhecimento dos agentes que poderiam efetuar mudanças na pufação e especulou que essas mudanças resultam de "alguma modificação química associada com o desligamento da fosforilação oxidativa". *hydei* (ASHBURNER & BONNER, 1979).

Depois do estudo de RITOSSA (1962), muitos trabalhos foram publicados a respeito da indução de pufes por choques de temperatura (para revisão ver, por exemplo, BERENDES & HOLT, 1964; ASHBURNER & BONNER, 1979; PASCUAL & FRUTOS, 1986).



O conhecimento dos fatos citológicos relacionados a esse fenômeno resultou também de vários outros trabalhos (RITOSSA, 1963, 1964a; BERENDES et al., 1965; BREUGEL, 1966; ASHBURNER, 1970a; ELLGAARD, 1972; LEWIS et al., 1975, entre outros). Assim, verificou-se que, se as larvas de *Drosophila* ou os seus tecidos excisados são submetidos a um breve choque de temperatura (por exemplo, 40 minutos a 37°C, sendo a temperatura normal de cultura 25°C), os pufes são induzidos em poucos sítios específicos. Por exemplo, em *D. melanogaster* há nove pufes induzidos pelo calor (ASHBURNER, 1970a) e em *D. hydei* há seis (BERENDES et al., 1965). Verificou-se que a indução dos pufes, em *Drosophila*, *in vivo*, é muito rápida, ocorrendo dentro de um minuto do aumento na temperatura, embora os pufes continuem a aumentar no tamanho, regredindo em seguida. O tamanho máximo dos pufes induzidos nesse gênero foi encontrado em função da severidade da temperatura de choque, pelo menos até a temperatura letal. A indução requer RNA, mas não a síntese de proteínas. Mas, na ausência da síntese de proteínas, os pufes induzidos não conseguem regredir, a menos que a temperatura retorne ao normal (o pufe 48BC de *D. hydei* é uma exceção segundo LEENDERS & BECKERS, 1972). O prolongamento da temperatura de choque (por exemplo, por mais de uma hora), resulta em mudanças adicionais na atividade dos pufes; a mais notável é o fato de que todos os outros pufes, os pufes ativos antes do choque de temperatura, regredem (ASHBURNER & BONNER, 1979).

A indução dos pufes de choque de temperatura em órgãos isolados de *Drosophila* demonstrou que a resposta não requer o organismo intacto e que não é específica do tecido nem do estágio (SCHLESINGER et al., 1982).



TISSIÈRES et al. (1974) mostraram que o choque de temperatura resulta na indução da síntese "de novo" de um conjunto de proteínas específicas, denominadas hsp's (heat shock proteins). Quanto à síntese de RNA e das proteínas específicas, em resposta ao choque de temperatura, todos os tecidos de *Drosophila* a apresentam, incluindo linhagens celulares em culturas de tecido permanentes (ASHBURNER & BONNER, 1979).

Não apenas *Drosophila*, mas todos os organismos já estudados, unicelulares e multicelulares, respondem ao calor de forma semelhante. A resposta é conhecida como um sistema genético altamente conservado, existindo desde a arqueobactéria até à eubactéria, nas plantas e nos animais (LINDQUIST & CRAIG, 1988).

Embora certos fatos da resposta variem de organismo para organismo, muitos são universais ou quase universais. As proteínas mais conservadas são aquelas codificadas pelas famílias de genes HSP 70 e HSP 90, em resposta a temperaturas elevadas (LINDQUIST & CRAIG, 1988).

Como já foi mencionado, uma resposta similar à do choque de temperatura é induzida por uma variedade de outros agentes causadores de estresse (ATKINSON & WALDERN, 1985; LINDQUIST, 1986; SCHLESINGER, 1986). Em células de eucariotos, as hsp's foram induzidas pelo dióxido de carbono (BARETTINO et al., 1988), pelo etanol (LI, 1983), por arsenito (VINCENT & TANGUAY, 1982), por anoxia (SACHS et al., 1980; ROPP et al., 1983; ; BONORINO & VALENTE, 1990), pelo cádmio (COURGEON et al., 1984; KEYSE & EMSLIE, 1992) e pelo peróxido de hidrogênio (COURGEON et al., 1988). Embora os indutores efetivos variem um pouco de organismo para organismo, esses agentes mencionados induzem a síntese de proteínas em quase



todas as células. Além disso, as próprias hsp's ou parentes muito próximas das mesmas estão presentes em todos os organismos, às temperaturas normais, e desempenham papéis vitais na função celular normal. Este achado forneceu informações importantes sobre a função molecular específica das hsp's (LINDQUIST & CRAIG, 1988).

Uma suposição colocada precocemente e persistente ainda sobre a resposta ao choque de temperatura é que as hsp's protegem as células dos efeitos tóxicos do calor e outros tipos de estresse, suposição para a qual existe um bom suporte (VELASQUES & LINDQUIST, 1984; LINDQUIST & CRAIG, 1988). Em todos os organismos, a indução das hsp's é extraordinariamente rápida e intensa o que está de acordo com a noção de uma resposta emergencial. Além disso, há uma forte relação entre a temperatura de indução e o ambiente do organismo. Em diferentes organismos, a resposta é induzida em temperaturas que podem ser muito diferentes. Assim, em *Drosophila melanogaster*, a indução ocorre entre 33 e 37°C, temperaturas comuns em dias quentes de verão (LINDQUIST, 1980). Em bactérias termófilas que crescem a 50°C, as proteínas são induzidas quando a temperatura é elevada para 60°C (DANIELS et al., 1984), em mamíferos, por temperaturas de febre (LI & LASZLO, 1985) e, em feijão soja, são induzidas nos campos de plantação, em dias de muito sol (KIMPEL & KEY, 1985).

LINDQUIST & CRAIG (1988) citam um exemplo interessante, dado por uma variedade de patógenos dimórficos cujo ciclo de vida ocorre, parte em temperaturas frias e parte em temperaturas quentes, nos mamíferos hospedeiros. Esta mudança na temperatura é acompanhada pela indução das hsp's.

Um argumento muito forte na indicação de que as hsp's têm função protetora é dado pela correlação entre sua indução e a



indução de termotolerância. Experimentos de termotolerância com delineamento semelhante e mesmo resultado foram realizados em cultura de células e uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos, plantas de feijão soja, moscas de fruta e camundongos. A observação básica é que um grupo de células ou organismos morre rapidamente quando mudado diretamente de sua temperatura normal para altas temperaturas, enquanto um grupo ao qual foi dado um pré-tratamento com calor produz hsps e morre muito mais devagar. Além disso, o pré-tratamento induz tolerância para outras formas de estresse e outras formas de estresse induzem tolerância ao calor. Assim, aparentemente, as proteínas de choque de temperatura induzidas por estresses moderados protegem o organismo de estresses mais severos. Porém, há circunstâncias em que a indução da termotolerância não se correlaciona com a indução de proteínas de choque de temperatura. Por outro lado, como já foi mencionado, as hsps, ou proteínas relacionadas, produzidas à temperatura normal, possuem função vital em células normais. Seus papéis na função celular normal fornecem dados importantes para esclarecer sua suposta função na termotolerância (revisão em LINDQUIST & CRAIG, 1988).

Além de seu papel protetor, já mencionado, foi postulado também que as proteínas de choque de temperatura têm um papel importante durante o desenvolvimento embrionário (BENSAUDE et al., 1983), na indução hormonal em *D. melanogaster* (IRELAND & BERGER, 1982) e no crescimento normal das células (ZIMMERMAN et al., 1983). Entretanto, sua função celular precisa permaneceu obscura até recentemente, como veremos mais adiante.

verificaram que o puf 57A em ambas as espécies é devido à expansão

As relações dos genes de choque de temperatura com as bandas dos cromossomos politênicos foram analisadas por GAUSZ *et al.* (1979), SEMESHIN *et al.* (1982), MOHLER & PARDUE (1982, 1984) entre outros. A organização molecular dos genes de choque de temperatura foi analisada por JUDD *et al.* (1972) mostraram para uma pequena região do cromossomo X que cada grupo de complementação genética pode ser mapeado em uma só banda. Embora tenham sido encontradas exceções a esta situação, LEFEVRE (1974) admitiu que na maioria dos casos deve haver correspondência entre bandas e grupos de complementação. GAUSZ *et al.* (1979) analisaram uma região de deficiência de nove bandas do cromossomo 3 de *D. melanogaster*, estendendo de 87C1 (região do grande pufe de choque de temperatura 87C1) a 87C9 inclusive. Foram identificados cinco grupos de complementação entre as bandas 87C4-5 e 87C9, sendo um grupo de complementação por banda, com exceção do grupo A que está localizado em 87C4-5. Por meio da análise de mutações, verificou-se que cada grupo de complementação deve representar um único loco funcional. A incapacidade de induzir mutações no loco do pufe 87C1 foi considerada consistente com a idéia de que os pufes 87A7 e 87C1 são devidos a uma duplicação das mesmas sequências codificadoras. Também o loco do pufe de choque de temperatura 93 D de *D. melanogaster* foi analisado por meio de deficiências superpostas (MOHLER & PARDUE, 1982). Os dados permitiram mapear esse pufe entre os pontos de quebra Df(3R)e^{GP4} e Df(3R)GC14. Já SEMESHIN *et al.* (1982) estudaram por microscopia eletrônica as regiões que correspondem aos pufes de choque de temperatura 87A e 87C em *D. melanogaster* e *D. simulans*, e verificaram que o pufe 87A em ambas as espécies é devido à expansão



de quatro bandas finas (87A6-9). Na formação do pufe 87C, porém, há participação de quatro bandas em *D. melanogaster* (87B13-15, C1), e de apenas três em *D. simulans* (87B13-15). *separadora produz o tipo secundário* A organização molecular dos genes de choque de temperatura foi analisada, entre outros, por HOLMGREN *et al.* (1979), ISH-HOROWICZ *et al.*, (1979), ISH-HOROWICZ & PINCHIN (1980), VOELLMY *et al.* (1981) e SOUTHGATE *et al.* (1983). Muitos desses trabalhos foram baseados em estudos de deleções.

HOLMGREN *et al.* (1979) clonaram DNA dos locos de choque de temperatura 63BC e 95D que codificam respectivamente as proteínas de choque de temperatura de 83.000 e 68.000 daltons. Essas sequências ocorrem uma só vez no genoma haplóide. Sequências complementares ao RNA mensageiro da proteína de choque de temperatura de 70.000 daltons, que estão presentes nos sítios 87A e 87C, estão representadas cinco vezes, duas no primeiro e três no segundo desses locos. Os autores verificaram que as cópias de 87A e 87C diferem em uma região de algumas centenas de pares de bases, próxima da extremidade 5' do RNA mensageiro, e que as duas classes de RNA mensageiro são encontradas nos polissomos depois do choque de temperatura. Uma homologia considerável foi encontrada entre as sequências para a hsp de 68.000 daltons presente no loco 95D e a sequência para a hsp de 70.000 daltons localizada nos locos 87A e 87C, e entre estas sequências e um sítio em 87D. *região codificadora de prote*

ISH-HOROWICZ *et al.* (1979) e ISH-HOROWICZ & PINCHIN (1980) analisaram o DNA ausente em um ou outro dos locos 87A7 e 87C1 para determinar a organização genômica das sequências que codificam a hsp 70, em ambos. Foi verificado que o loco 87A7 tem dois genes HSP 70 em orientação divergente, com cerca de 1.700 pares de bases entre

eles. O loco 87C1 é muito grande, contendo um gene HSP 70 separado de dois outros genes HSP 70, em tandem, por uma região de cerca de 38.000 pares de bases. Essa região separadora produz o tipo secundário de transcritos alfa e beta induzidos pelo calor, encontrados no sítio 87C1, cuja função não é conhecida e que talvez não sejam traduzidos em proteínas. As sequências alfa, beta e hsp 70 presentes no loco 87C1, estão contidas em dois fragmentos de restrição Eco RI. *ndo proteína e RNA (ARRIGO et al., 1985).*

VOELLMY et al. (1981) analisaram um segmento de DNA isolado do sítio cromossômico 67B de *D. melanogaster*, verificando que esse sítio contém quatro genes de choque de temperatura fortemente ligados. Os quatro genes codificam RNAs mensageiros induzidos pelo choque. Encontram-se agrupados em um segmento de 11 kilobases (Kb) e são separados por espaçadores de 1,0 - 4,7 Kb. Três desses genes exibem polaridade alternadas, indicando que apesar de estarem bastante próximos, provavelmente os quatro genes são organizados como unidades de transcrição individuais.

SOUTHGATE et al. (1983) analisaram o sequenciamento dos quatro genes para proteína hsp agrupados no loco 87B de *D. melanogaster*. Mais de 6.250 nucleotídeos, incluindo as regiões 5' e 3' desses genes, foram determinados juntamente com a sequência de aminoácidos esperada. Cada gene possui os elementos de sequências 5' e 3' característicos dos eucariotos e uma única região codificadora de proteína não-interrompida. Os quatro polipeptídeos codificados (19,7, 20,6, 23 e 23,6 kilodaltons) têm um segmento homólogo de 108 resíduos de aminoácidos, representando 51% a 62% dos seus comprimentos. Esta região é ladeada por sequências cujo comprimento e composição de ácidos aminados são diferentes. *las de morfologia*

As hsp's predominantemente induzidas podem ser, geralmente, classificadas em três grupos principais, com base nos seus tamanhos moleculares: de 80 a 90, de 65 a 75 e de 20 a 30 kD. O último grupo, o das hsp's de baixo peso molecular, está bem caracterizado em células de *Drosophila* (MARTINS DE SÁ et al., 1989).

Verificou-se que as pequenas hsp's existem como complexo no citoplasma, formando uma banda característica no gradiente de densidade, incluindo proteína e RNA (ARRIGO et al., 1985).

Pensou-se que algumas hsp's estivessem primariamente associadas com o núcleo durante o choque de temperatura (KLOETZEL & BAUTZ, 1983). Porém, outros dados indicaram que as hsp's estão associadas com os filamentos intermediários do citoplasma e que sob o choque de temperatura esses elementos do citoesqueleto associam-se à membrana nuclear. Assim, parece que as pequenas hsp's existem essencialmente no citoplasma e não no núcleo, como previamente suposto com base no fato de que após grande estresse elas são co-isoladas com o núcleo (LEICHT et al., 1986).

O grupo mais heterogêneo de hsp's é constituído pelas pequenas proteínas de 20 a 30 kD, as quais formam um padrão característico em gel de eletroforese mono e bidimensional. Após a verificação da similaridade entre este padrão de proteínas e aquele do subgrupo citoplasmático de ribonucleoproteínas mensageiras (RNPsm) que mais tarde foram identificados como pertencentes aos prossomos, foi dada atenção à possível inter-relação dos dois tipos de pequenos complexos citoplasmáticos de RNP, as hsp's e os prossomos (VINCENT et al., 1983 e SCHMID et al., 1984).

Os prossomos são um tipo de RNP citoplasmático ubíquo e subcomplexos de RNPm livres. Essas partículas de morfologia

característica foram observadas primeiramente por microscopia eletrônica em frações de RNP de células HeLa e mais tarde identificadas como sendo uma entidade bioquímica. Os prossomos são compostos de 85% de proteínas e 15% de RNA (RNAP) (SPOHR et al., 1970 e SCHMID et al., 1984).

Os prossomos constituem uma classe uniforme morfológica e biofisicamente, de partículas com 12 nanômetros de largura e forma de framboesa, variáveis na composição de proteínas e RNA, em função do tipo celular, e quanto à população de RNAm com a qual estão associados. Um mínimo de 25 proteínas prossômicas e aproximadamente o mesmo número de RNAs foram observados em vários tipos de células e espécies. Algumas das proteínas dos prossomos são fosforiladas, ADP-ribosiladas ou glicosiladas, tendo algumas, atividade de protease. O uso de anticorpos monoclonais específicos dos prossomos (MAbs) revelou que os antígenos prossômicos podem também ser observados no núcleo, onde eles se associam com os cromossomos transcritos e a matrix nuclear. Além disso os prossomos (e desse modo o RNPM) foram encontrados nos filamentos intermediários do citoesqueleto (revisão em MARTINS de Sá et al., 1989).

Ao nível da síntese de RNA, há pelo menos três respostas distintas ao choque de temperatura em tecidos de *Drosophila*: a indução da síntese de uma classe de RNAs (RNAs de choque de temperatura) alguns dos quais (não todos) são traduzidos em hsp's; a supressão da síntese da maioria dos outros RNAs mensageiros (não se incluem aqui aqueles que codificam para histonas ou aqueles codificados pelo genoma mitocondrial); e a interrupção do processamento normal do produto de transcrição primária dos cistrons

de RNA ribossômico 5S e 18S + 28S (revisão em ASHBURNER & BONNER, 1979). No do pufe (BERENDES, 1968; ELLGAARD & CLEVER, 1971; HOLT & KUIJPERS, 1970). As mudanças na síntese de RNA, resultantes do choque de temperatura, podem ser constatadas de vários modos. Autorradiografia de cromossomos politênicos, após incorporação da uridina - H^3 no RNA, mostra que os pufes de choque de temperatura são sítios de síntese de RNA induzido recentemente, e que como consequência do choque de temperatura, pufes preexistentes param de incorporar o precursor (RITOSSA, 1964b; TISSIÈRES et al., 1974; BONNER & PARDUE, 1976). 1977) e por MCKENZIE (1976). A taxa de acúmulo da maioria dos RNAs de

A mudança no padrão de transcrição resultante do choque de temperatura está refletida na mudança da distribuição da RNA polimerase II e outras proteínas cromossômicas, detectadas por imunquímica ou interferometria. Há uma migração acentuada desses componentes para os sítios de pufe de choque de temperatura (por exemplo, HOLT, 1970; PLAGENS et al., 1976; SILVER & ELGIN, 1977; JAMRICH et al., 1977a, GREENLEAF et al., 1978; MAYFIELD et al., 1978; SPRUILL et al., 1978).

O choque de temperatura resulta também na diminuição da RNA polimerase II de regiões cromossômicas que não formam pufes de choque de temperatura e no aumento do nível de coloração fluorescente para esta enzima no nucleoplasma (JAMRICH et al., 1977b). (ER & BONNER, 1979).

O acúmulo de sequências de RNA específicas do choque, nos sítios dos pufes, foi demonstrado por hibridização citológica de sequências de DNA complementares ao RNA do pufe (LIVAK et al., 1978). Consequentemente, inibidores da síntese de RNA, como por exemplo a actinomicina D ou a alfa-amanitina, bloqueiam a indução

dos pufes de choque de temperatura e a migração da RNA polimerase II do sítio do pufe (BERENDES, 1968; ELLGAARD & CLEVER, 1971; HOLT & KUIJPERS, 1972; COMPTON & MCCARTHY, 1978).

Em células de cultura de tecidos, os RNAs de choque foram analisados por eletroforese (SPRADLING et al., 1977) e por hibridização citológica de cromossomos politênicos (McKENZIE et al., 1975; SPRADLING et al., 1975; HENIKOFF & MESELSON, 1977; LUBSEN et al., 1978).

A cinética da síntese de RNA foi estudada por SPRADLING et al. (1977) e por McKENZIE (1976). A taxa de acúmulo da maioria dos RNAs de choque aumentou com o aumento da severidade do choque com um máximo dependente do meio de cultura dos tecidos e das condições do crescimento celular (SPRADLING et al., 1977).

O RNA polissômico de células submetidas ao choque de temperatura inclui mensageiros para os polipeptídeos de choque. RNA polissômico poliadenilado de células em cultura de tecidos, submetidas ao choque, foi fracionado em duas classes principais em gradiente de densidade de sacarose, sendo uma de 20S e outra de 12S. Essas sequências de RNA estão ausentes, ou presentes em baixa concentração, em RNA polissômico de células controle. Posteriormente, o fracionamento do RNA polissômico de choque foi realizado por eletroforese sob condições de desnaturação (revisão em ASHBURNER & BONNER, 1979).

Entre os RNAs 20S de *D. melanogaster*, a maior espécie (A_1) hibridiza, *in situ*, preferencialmente com o pufe 63BC, o segundo em tamanho (A_2), com os pufes 87A e 87C e o menor (A_3), com o pufe 95D. A menor espécie (A_4) hibridiza com os pufes 87A e 87C, embora quatro vezes mais com o segundo que com o primeiro. A resolução



eletroforética dos RNAs 12S provavelmente inclui sequências complementares do pufe 67B. Os cinco pufes mencionados são os maiores pufes induzidos pelo calor em *D. melanogaster*. Até agora, as sequências que hibridizam com os menores pufes de choque de temperatura dessa espécie (33B, 64F e 70A) não foram claramente identificadas, talvez por ser a concentração, desses RNAs, relativamente baixa (SPRADLING et al., 1977).

Recentemente, tem sido atribuída a várias proteínas de choque de temperatura, a função de chaperonas moleculares (ELLIS, 1990).

Chaperonas moleculares são proteínas que mediam o dobramento de outros polipeptídeos e, em alguns casos, sua associação em estruturas oligoméricas. Um aspecto importante da definição é que a chaperona não participa da estrutura finalizada (HIGHTOWER, 1991).

A família proteica de choque de temperatura hsp 90 é a mais abundante expressa em células normais dos eucariotos, sendo altamente fosforilada nas serinas e treoninas e localizada no compartimento citoplasmático das células. Uma pequena fração dessa proteína migra para o núcleo depois do choque de temperatura (SCHLESINGER, 1990).

A proteína hsp 90 participa na maturação de outras proteínas, da modulação da atividade proteica, no caso dos receptores de esteróides livres de hormônio (hsp 90 liga-se com receptores de glicocorticóides que assim são mantidos em uma conformação inativa até serem ativados pelo hormônio), e do transporte intracelular de algumas quinases recém-sintetizadas (SCHLESINGER, 1990; WIECH et al., 1992).

Uma característica de todos esses processos dos quais a hsp 90 participa é a dependência da estrutura proteica. Essa proteína é uma chaperona molecular envolvida na manutenção de proteínas celulares na forma inativa, sendo portanto, capaz de reconhecer e se ligar a proteínas não-ativas, dessa forma influenciando o seu dobramento no estado nativo. A ação da hsp 90 não depende da presença de nucleosídeos trifosfatos, de modo que ela deve usar outro mecanismo molecular na ajuda do dobramento molecular *in vivo* (WIECH, et al., 1992).

Assim, estudos recentes sugerem um papel central para proteínas de choque de temperatura e suas partes constitutivas na mediação de interações proteína-proteína, no dobramento das proteínas e no transporte de proteínas através das membranas.

Segundo HIGHTOWER (1991) existe evidência de uma agregação de proteínas desnaturadas com a proteína cognata de choque de temperatura de 70 kD (Hsc 70) (Cognatos são membros constitutivos de famílias de proteínas de estresse que funcionam na fisiologia celular normal). Isto indica que a proteína hsp 70 deve participar do "salvamento" das proteínas desnaturadas, solubilizando-as e facilitando seu redobramento, ou talvez "chaperonando-as" a um sistema degradativo. Segundo esse autor, essas proteínas migram para os nucléolos danificados de células de mamíferos submetidas ao choque de temperatura, e a recuperação morfológica dos nucléolos correlaciona com o retorno da hsp 70 ao citoplasma, quando o reparo foi completado.

Alguns trabalhos indicaram que a adaptação térmica ao nível celular está associada com mudanças na resposta ao choque de temperatura, sugerindo a possibilidade de que a adaptação ao

estresse pelas células em cultura e pelos organismos no ambiente, podem requerer mudanças nas chaperonas.

A síntese das hsp's está sujeita a controle em dois níveis, transcricional e pós-transcricional, nas células de eucariontes (CRAIG, 1985; LINDQUIST, 1986).

A transcrição induzida pelo choque de temperatura é mediada por um elemento de controle positivo, o elemento "heat shock" (HSE), definido como três repetições (*in vivo* podem ser complexos maiores) de um módulo de cinco nucleotídeos (nGAAn, sendo n, nucleotídeos menos fortemente conservados) arranjados em orientação alternada. Cópias múltiplas do HSE ocorrem à montante ("upstream") de todos os genes de choque (CLOS *et al.*, 1990).

In vitro um ativador transcricional chamado fator "heat shock" (HSF) liga-se aos HSEs e ativa a transcrição dos genes de choque de temperatura. A sequência dos HSE mostra alta conservação no processo evolutivo, enquanto os HSF purificados de *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila* e células humanas diferem quanto ao tamanho molecular, sendo de respectivamente 150, 110 e 83 kD. A clonagem dos HSF de *Drosophila* e *S. cerevisiae* mostrou que suas sequências são altamente divergentes, exceto nas regiões importantes para ligação ao DNA e para oligomerização. *S. cerevisiae* e os eucariotos superiores diferem também na regulação da atividade dos HSF. No primeiro organismo o HSF está ligado constitutivamente e aparentemente estimula a transcrição quando é fosforilado sob choque de temperatura. Na *Drosophila* e células de vertebrados, o HSF é incapaz de se ligar ao HSE fora das condições de choque de temperatura. Contudo, o HSF de células humanas também se torna altamente fosforilado após o choque de temperatura. Verificou-se

também que em células de *S. pombe* o HSF só se liga ao DNA após o choque de temperatura, não sendo, portanto, esta, uma característica diferenciadora de eucariotos inferiores e superiores (minirevisões em CLOS et al., 1990; SORGER, 1991). híbridos. a fim de detectar possíveis CLOS et al. (1990) mostraram que o HSF de *Drosophila* tem uma afinidade intrínseca pelo DNA a qual é reprimida quando não está sob condições de choque de temperatura *in vivo*, estando assim sob controle negativo. fisiológico (WASSERMAN, 1962a), quanto ao isolamento

reprodutiva. As observações sugerem que nas células animais a ativação do fator de choque de temperatura (HSF) envolve dois passos distintos: primeiro, a indução da ligação ao DNA para formar um complexo entre o fator e os promotores dos genes de choque de temperatura e, segundo, a fosforilação do fator para criar um complexo com alta atividade transcricional. Em *S. cerevisiae* a indução pelo choque de temperatura envolve só o segundo passo (mini-revisão em SORGER, 1991). todas nos aspectos analisados, abrindo boas

perspectivas. Os trinta anos que decorreram desde que RITOSSA (1962) fez a sua primeira observação sobre os pufes de choque de temperatura, permitiram assim, acumular uma vasta literatura, descrevendo os fenômenos que ocorrem em resposta a esse tipo de estresse. Aplicando técnicas tão variáveis quanto observações ao microscópio comum e eletrônico, medidas cristalográficas de raios-X, estudos físico-químicos e análise molecular, muitos conhecimentos foram obtidos. Só agora, porém, inicia-se o conhecimento do verdadeiro papel da resposta ao choque de temperatura, seu controle e a verificação de que sua importância pode refletir-se inclusive na própria evolução dos organismos. Isto parece justificar a extensão do estudo dessa resposta a outros organismos. Com esse objetivo, no presente

trabalho procuramos analisar ao nível da síntese proteica e do padrão de pufes nas glândulas salivares, a resposta a choque de aquecimento e resfriamento em duas espécies relacionadas, *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis* e seus híbridos, a fim de detectar possíveis diferenciações estabelecidas entre elas no decorrer da evolução.

Essas duas espécies foram previamente analisadas quanto ao polimorfismo cromossômico (WASSERMANN, 1962a), quanto ao isolamento reprodutivo e diferenças no desenvolvimento (CROW, 1942; PATTERSON, 1947; BICUDO & RICHARDSON, 1977, 1978; BICUDO, 1979), quanto ao padrão de esterases (CERON, 1988) e quanto à presença de mecanismos reguladores relacionados aos processos de amplificação gênica e dominância no controle da atividade organizadora nucleolar (BICUDO & RICHARDSON, 1977; BICUDO, 1979, 1981a, b, c, 1982, 1983). Todos esses estudos mostraram que as duas espécies apresentam características diferenciadas nos aspectos analisados, abrindo boas perspectivas para a abordagem pretendida no presente trabalho.

A manutenção das espécies, em laboratório, tem sido feita em garrafas de 1/4 de litro, contendo meio de cultura de banana e agar-agar, e à temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2. Estádio do Desenvolvimento e Temperaturas de Experimentação

No presente trabalho, foram utilizadas larvas de 3^o estágio tardio de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos F_1 , cuja temperatura de desenvolvimento foi de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para os tratamentos foram utilizadas as temperaturas de 16°C , 20°C



II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Espécies Utilizadas

As espécies *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis* (atualmente *D. arizonae*, RUIZ et al., 1990), 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 está ligada à 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 1976.

A manutenção das espécies, em laboratório, tem sido feita em garrafas de 1/4 de litro, contendo meio de cultura de banana e agar-agar, e à temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2. Estádio do Desenvolvimento e Temperaturas de Experimentação

No presente trabalho, foram utilizadas larvas de 3º estágio tardio de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos F_1 , cuja temperatura de desenvolvimento foi de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para os tratamentos foram utilizadas as temperaturas de 10°C , 20°C



(controle) e 37°C. As larvas assim tratadas foram utilizadas para preparações cromossômicas de glândulas salivares e para eletroforese. Nas preparações citológicas foi utilizada a metade posterior das glândulas salivares e nas preparações para eletroforese, as glândulas inteiras e também as larvas inteiras.

Os choques de temperatura foram aplicados em Estufa de Cultura modelo 002 CB-FANEM Ltda, regulada a 37°C e Estufa Incubadora para B.O.D. - FANEM Ltda, regulada a 10°C.

As incubações para os choques de temperatura foram realizadas de várias maneiras, procurando obter-se os melhores resultados, em cada caso.

A escolha da fase do desenvolvimento e das temperaturas foi precedida de observações sobre o desenvolvimento de ovos e larvas das duas espécies, submetidas continuamente ao resfriamento (10°C) ou aquecimento (37°C), como segue:

- a) ovos, com idades que variaram de 0 a 24 horas;
- b) larvas recém-nascidas, com $\pm$ 35 horas decorridas após a oviposição;
- c) larvas de 1º estágio (L1) com até aproximadamente 45 horas, com grande capacidade de movimentação sobre o meio e espiráculos anteriores ainda não visíveis;
- d) larvas de 2º estágio (L2) com aproximadamente 100 horas, apresentando movimentação sobre o meio e espiráculos anteriores pouco desenvolvidos;
- e) larvas 3º estágio inicial (L3A) com aproximadamente 155 horas, muito móveis, preferencialmente imersas no meio, com espiráculos anteriores brancos;



f) larvas de 3º estágio tardio (L3B) com aproximadamente 220 horas, com espiráculos anteriores amarronzados, pouco móveis e, em geral, localizadas nas paredes dos frascos de cultura.

A incubação dos ovos e larvas de diferentes idades foi feita em placas de Petri plásticas, contendo meio de cultura de banana e agar-agar, previamente aquecidas a 37°C ou resfriadas a 10°C conforme o caso. Neste procedimento, incubamos cinco placas de Petri de cada fase larval, sendo que em cada uma das placas eram colocadas dez larvas. Cada uma das placas era observada três vezes ao dia.

As larvas eram separadas, em tubos, até a idade de sete a dez dias quando então, eram reunidas nas caixas de população. As caixas de população eram feitas de acrílico incolor, tendo aberturas na base.

3. Obtenção de Larvas de *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis*

As larvas de 3º estágio tardio das espécies parentais eram obtidas de garrafas de 1/4 de litro e também de cruzamentos em tubos e caixas de população, mantidos a 20°C $\pm$ 1°C. Elas eram coletadas entre as que já haviam abandonado o meio de cultura e permaneciam imóveis nas paredes dos vidros. À medida em que as larvas iam sendo coletadas, eram colocadas em vidros de relógio contendo algumas gotas de solução fisiológica de Demerec (DEMEREK & KAUFMANN, 1945). Em seguida, eram observadas ao microscópio estereoscópico (Wild Heerbrugg - modelo M8) e as larvas de 3º estágio tardio, que se caracterizam por apresentar espiráculos anteriores amarelos, eram imediatamente submetidas ao choque de temperatura.

Do Rio Preto, este procedimento tornou-se mais viável por exigir menos manipulação das espécies parentais, permanecendo por mais tempo (uma semana) nas garrafas, após o que eram transferidas. Para aumentar a

4. Obtenção de Larvas Híbridas F1 garrafas simultaneamente.

As larvas híbridas F1 foram produzidas pelo cruzamento de fêmeas de *M. mulleri* e machos de *M. arizonensis*. Esses híbridos foram, inicialmente, obtidos pelo processo de cruzamentos "em massa", preparados em caixas de população, seguindo a técnica descrita por BICUDO & RICHARDSON (1978).

Cada cruzamento "em massa" envolveu o uso de aproximadamente 200 casais, por caixa. As fêmeas virgens e os machos permaneciam separados, em tubos, até a idade de sete a dez dias quando então, eram reunidos nas caixas de população. As caixas de população eram de acrílico incolor, tendo duas aberturas na base, às quais adaptavam-se, com auxílio de fita adesiva, placas de Petri plásticas, contendo meio de cultura. As placas eram trocadas, no presente experimento, em intervalos de 48 horas. Quando as larvas híbridas atingiam a fase de 3º estágio tardio, eram utilizadas para as incubações nas três temperaturas, seguida de preparação de lâminas ou eletroforese. O sexo dos 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 (BICUDO & RICHARDSON, 1978).

Outro procedimento para a obtenção das larvas híbridas F1 envolveu o cruzamento "em massa" utilizando-se garrafas de 1/4 de litro e aproximadamente 100 casais, por garrafa. Em virtude de nossas viagens semanais entre Maringá e São José do Rio Preto, este procedimento tornou-se mais viável por exigir menos manipulação: as espécies parentais permaneciam por mais tempo (uma semana) nas garrafas, após o que eram transferidas. Para aumentar a



produtividade, eram preparadas várias garrafas simultaneamente.

ul de meio Grace (meio de cultura para insetos, GRACE, 1942). A

dissecção das glândulas salivares foi feita no próprio meio

5. Preparações Citológicas

pares de glândulas salivares e o tempo de incubação era de uma

5.1. Procedimentos de incubação

preparadas 360 lâminas de cada uma das espécies, sendo 60 lâminas

de cada. Para o estudo citológico utilizamos três procedimentos de

incubação:

a. incubação das glândulas salivares em lâminas escavadas contendo solução fisiológica de Demerec, nas três temperaturas já mencionadas. Em cada escavação da lâmina eram colocados, de um a três pares de glândulas salivares, e o tempo de incubação era de uma hora.

b. incubação de larvas inteiras em placas de Petri de vidro, com aproximadamente 5,5 cm de diâmetro, contendo papel de filtro embebido em solução fisiológica de Demerec e já previamente mantidas nas temperaturas de choque ou controle. Em cada placa eram colocadas várias larvas e o tempo de incubação era de uma hora. Após esse tempo, era feita a dissecção das larvas para extração das glândulas salivares, utilizando-se lâminas e solução fisiológica de Demerec também submetidos às temperaturas de 10°C, 20°C (controle) ou 37°C, conforme o tratamento a que as larvas seriam submetidas. Com este procedimento foram preparadas 720 lâminas de *M. mulleri* e o mesmo número de *M. arizonensis*, sendo 120 lâminas por sexo e por tratamento. De larvas híbridas foram preparadas 180 lâminas, sendo 60 por tratamento.

fotográfico MC - 63 automático acoplado (OHP) - Processo

c. incubação de glândulas salivares em lâminas escavadas contendo 40 μ l de meio Grace (meio de cultura para insetos, GRACE, 1962). A dissecação das glândulas salivares foi feita no próprio meio Grace. Em cada escavação da lâmina eram colocados de um a cinco pares de glândulas salivares e o tempo de incubação era de uma hora, em câmara úmida. Seguindo esse procedimento, foram preparadas 360 lâminas de cada uma das espécies, sendo 60 lâminas de cada sexo e de cada um dos tratamentos. Das larvas híbridas F₁ foram preparadas 90 lâminas, sendo 30 de cada um dos tratamentos.

5.2. Preparo das lâminas

As glândulas salivares eram isoladas e a metade posterior das mesmas era transferida para a lâmina contendo uma gota de ácido acético (solução aquosa a 45%), aí permanecendo por um minuto. Em seguida, o excesso de fixador era retirado com papel absorvente e procedia-se à coloração com orceína lacto-acética, por 5 minutos. Posteriormente, a orceína era substituída por ácido láctico (solução aquosa a 50%), permanecendo por 8 a 10 minutos, e então, a lâmina era coberta com lamínula e submetida ao esmagamento conforme ATHERTON & GALL (1972). As lâminas e lamínulas empregadas nessas preparações citológicas eram previamente lavadas cuidadosamente (NANYA, 1986). Após o esmagamento, a lutagem era realizada com esmalte incolor.

As lâminas eram guardadas no Freezer e analisadas no fotomicroscópio II, Zeiss (Doação FAPESP - Processo Biológicas nº 70/562), e no microscópio Zeiss Standard Junior (883), com sistema fotográfico MC - 63 automático acoplado (doação CNPq - Processo



ng 40049/80).

5.3. Medidas de área dos pufes

Os pufes foram medidos, em fotografias, quanto à sua área por meio de um planímetro de compensação OTT, marca Elphor (Bender & Hobein - Alemanha).

A medida é feita seguindo com a agulha do planímetro, no sentido horário, a linha da borda da figura, que no caso é o pufe. O rotor graduado gira e fornece a medida da área. A volta completa do rotor corresponde a 4.000 mm². Cada uma das suas 100 subdivisões corresponde, portanto, a uma área de 40 mm². Com o auxílio do nônio determina-se o décimo de um intervalo de divisão. Para se determinar o valor da área multiplica-se o valor encontrado por 4.

6. Eletroforese Descontínua Utilizando Géis de Poliacrilamida Contendo SDS (SDS - PAGE)

O princípio básico do gel de poliacrilamida é a formação de uma "malha" entre o monômero acrilamida e seu comonômero de ligação cruzada, a N, N' metilenobisacrilamida (BIS), numa reação de polimerização vinílica. A polimerização é realizada com o uso de catalisadores, como o persulfato de amônio e o TEMED (N, N, N', N' tetrametilenodiamina). As qualidades mecânicas do gel e o tamanho dos poros da "malha" são determinados pela relação de acrilamida/bisacrilamida. O gel pode ser preparado em tubos (gel em cilindro), ou entre duas placas de vidro (gel em placa).



As características de um gel de poliacrilamida são dadas, de acordo com HJERTEN (1962) pelas relações:

$$T = \frac{a + b}{V} \times 100 \quad C = \frac{b}{a + b} \times 100$$

onde:

T= concentração percentual total de ambos os monômeros;

C= porcentagem de ligações cruzadas;

a= peso de acrilamida, em gramas;

b= peso de bisacrilamida, em gramas;

V= volume da solução final em ml.

A eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida foi descrita inicialmente por ORNSTEIN (1964) e DAVIS (1964). Esta técnica consiste na separação de proteínas devida à descontinuidade de tampão, de pH e tamanho dos poros do gel. Nesse sistema, o suporte em que ocorre a eletroforese é formado de dois géis de composições diferentes: o gel de empilhamento ou espaçamento ("stacking gel"), onde ocorre a concentração da amostra em uma zona de 1-100 um de espessura (WHITAKER, 1967; GORDON, 1969), e o gel de separação ou de corrida ("running gel"), onde a amostra se separa em seus componentes de acordo com o peso molecular, forma e carga das proteínas individuais. O gel de empilhamento, que possui poros grandes, é colocado sobre o gel de separação, de poros menores e com concentração diferente de tampão.

Os géis de poliacrilamida podem ser feitos em condições que preservem a conformação nativa das proteínas ou em condições desnaturantes rompendo-se as interações hidrofóbicas e as pontes



dissulfeto (pontes S-S) das proteínas, com o uso de detergentes, como o SDS (dodecil-sulfato de sódio) e agentes redutores de pontes S-S como o beta mercaptoetanol. na eletroforese descontínua é preparada SHAPIRO et al. (1967) e posteriormente WEBER & OSBORN (1969) demonstraram que os pesos moleculares de polipeptídeos podem ser determinados em sistema descontínuo de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, usando-se o SDS e agentes redutores. Nessas condições, esses autores mostraram, que o logaritmo do peso molecular ($\log PM$) de um polipeptídeo é proporcional à sua mobilidade relativa (RM) em relação a um corante (em geral, o Azul de Bromofenol), num gel de poliacrilamida de concentração conhecida. acrilamida/bisacrilamida modificada (solução

)). Sabe-se hoje que a interação das cadeias polipeptídicas com o SDS resulta na formação de complexos SDS-proteína, que apresentam formas de elipsóides prolatos (em formas de bastão), no qual esse detergente liga-se firmemente à cadeia de proteína na razão de 1,4 gramas de SDS por grama de proteína (o que dá aproximadamente uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos). A carga negativa das moléculas do SDS mascara a carga intrínseca das proteínas, fazendo com que os complexos de SDS - proteínas tenham todos a mesma relação carga/massa e a mesma forma. Consequentemente, a migração eletroforética de polipeptídeos complexados com o SDS depende unicamente do peso molecular dos mesmos. Esse método permite a avaliação de pesos moleculares de polipeptídeos com uma acurácia em torno de 5% (VOET & VOET, 1990).

substituído, em muitos experimentos, por persulfato de potássio, que não é higroscópico.



6.1. Preparo dos géis

O primeiro passo na eletroforese descontínua é a preparação dos géis. Neste trabalho foram preparados géis em placa (STUDIER, 1973).

As soluções e tampões empregados foram adaptados dos trabalhos de DAVIS (1964) e LAEMMLI (1970) e são descritos a seguir:

- Solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (solução a): acrilamida a 30% e bisacrilamida a 0,8%. Essa solução deve ser guardada em geladeira, em frasco escuro. A acrilamida deve ser manuseada com cuidado por se tratar de uma neurotoxina.
- Solução estoque de acrilamida/bisacrilamida modificada (solução a'): acrilamida a 30% e bisacrilamida a 1,6%. Esta solução deve ser mantida em geladeira, em frasco escuro.
- Tampão do gel de separação + SDS (tampão b 4x): Tris (Tri-hidroximetilaminometano) 1,5 M ajustado a pH 8,8 com HCl 6 M e SDS a 0,4%. Deve ser mantido na geladeira, em frasco escuro.
- Tampão do gel de empilhamento + SDS (tampão c 4x): Tris 0,5 M ajustado a pH 6,8 com HCl 6 M e SDS a 0,4%. Deve ser mantido na geladeira, em frasco escuro.
- Solução de persulfato de amônio a 2%, preparada na hora de usar. O persulfato de amônio em pó deve ser armazenado em dessecador para evitar sua hidratação. O uso de persulfato de amônio hidratado ocasiona a formação de géis irregulares ou impede a sua polimerização. Neste trabalho, o persulfato de amônio foi substituído, em muitos experimentos, por persulfato de potássio, que não é higroscópico.

- f. TEMED com aproximadamente 99% de pureza: este deve ser o último componente adicionado à solução, dando início à polimerização.
- g. Tampão de amostra: Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS a 2%, glicerol a 10%, azul de bromofenol a 0,005%, Fluoreto de metil fenil sulfonila (PMSF, um inibidor de proteases) a 1 mM e beta-mercaptoetanol a 1% (para redução de pontes dissulfeto). Deve ser guardado no congelador.
- h. Tampão de corrida: Tris a 0,025 M, glicina a 0,192 M contendo 0,1% de SDS, ajustado a pH 8,3 com HCl 6 M.

Na Tabela 1 estão sumarizados os volumes de água e soluções-estoque necessários para o preparo dos géis de separação nas concentrações indicadas. Na Tabela 2 estão sumarizados os volumes de água e soluções-estoque necessários para o preparo dos géis de empilhamento na concentração indicada.

A polimerização dos géis era realizada entre duas placas de vidro de 15x17x0,5 cm, havendo um espaço entre elas de um milímetro de espessura formado pela introdução de espaçadores de acrílico, colocados nos lados e no bordo inferior, e presos por garras. Para vedação, passava-se uma camada de vaselina entre os espaçadores e as placas. Uma das placas apresentava um recorte com dois centímetros de profundidade, no qual era adaptado um pente de acrílico, com 14 ou 15 dentes, para formação dos poços de aplicação das amostras.

Nas preparações dos géis de concentração a 10% (C=2,6%), as placas eram mantidas na posição vertical, e o espaço entre as mesmas era preenchido com a solução de polimerização do gel de separação até a altura de 2,5 cm abaixo do limite superior da placa



Tabela 1. Volumes de água e soluções-estoque para o preparo dos géis de separação de diferentes concentrações (volume final de 10 ml; C= 2,6%).

Componentes	Volumes (ml)		
	Concentração do gel (T%)		
	7	10	15
Água	5.07	4.30	2.40
Solução a	2.33	3.32	5.00
Tampão b (4x)	2.50	2.50	2.50
Persulfato de amônio a 2%	0.15	0.15	0.15
TEMED	0.01	0.01	0.01

Tabela 2. Volumes de água e soluções-estoque para o preparo de géis de empilhamento a 3% (volume final de 10 ml, C= 5,0%).

Componentes	Volume (ml)
Água	6.34
Solução a'	1.00
Tampão c (4x)	2.50
Persulfato de amônio a 2%	0.15
TEMED	0.01

recortada. Em seguida, era acrescentada uma fina camada de água destilada para impedir o contato do oxigênio atmosférico com a solução de polimerização. As placas eram mantidas na mesma posição, por mais ou menos 45 minutos, para a formação do gel de separação. As placas eram, então, invertidas para se retirar a água. Adicionava-se a solução do gel de empilhamento a 3% ($C=5\%$) sobre o gel de separação e adaptava-se um pente de acrílico para a confecção dos poços de aplicação das amostras. Após uma hora, para a formação do gel de empilhamento, o pente e o espaçador inferior eram retirados e as placas eram transferidas e adaptadas por garras, numa cuba de acrílico vertical. As amostras eram aplicadas, e os reservatórios superior e inferior da cuba eram preenchidos com o tampão de corrida. O modelo da cuba possibilitava a corrida de dois géis ao mesmo tempo, permitindo a aplicação e análise simultânea de 28 a 30 amostras (14 a 15 amostras por gel).

espátula, usada como alavanca. Na preparação de géis em gradiente de 7 a 15% utilizamos um misturador de gradiente colocado sobre um agitador magnético, no qual eram adicionadas as soluções de polimerização de 15% e 7% em compartimentos separados. A mistura das soluções e seu bombeamento para a placa de vidro eram realizadas com o auxílio de uma bomba peristáltica, conectada por tubo ao compartimento contendo a solução a 15%. Após a mistura das soluções de polimerização em gradiente linear de 7 até 15%, adicionava-se uma fina camada de água destilada. Após a polimerização do gel que durava mais ou menos uma hora, a água era eliminada e o espaço era preenchido com o gel de empilhamento e o pente de acrílico era adaptado, da mesma forma que nas preparações de géis a 10%. Após mais uma hora, o pente e o espaçador inferior eram retirados e as placas eram adaptadas à cuba



de acrílico, como já descrito. O conservante (ácido acético a 7,5% e glicerol a 1,5%), por no mínimo duas horas.

6.2. Condições de eletroforese

6.3. Preparação das amostras

Tanto para géis a 10%, como para géis em gradiente, as eletroforeses eram realizadas por mais ou menos 4 horas, a uma voltagem constante de 100 Volts, utilizando-se, para o enchimento dos compartimentos superior e inferior da cuba, o tampão de corrida Tris a 0,0025M, glicina a 0,192M contendo 0,1% de SDS (DAVIS, 1964). Utilizamos o Azul de Bromofenol a 0,005%, como corante. A eletroforese era interrompida quando a marca do Azul de Bromofenol ficava a 1 cm da borda inferior do gel.

Após a corrida, as placas eram removidas da cuba e os espaçadores laterais eram retirados. As placas de vidro eram separadas introduzindo-se lateralmente uma espátula, usada como alavanca. Em seguida, os géis eram submetidos ao seguinte tratamento:

- fixação do gel em TCA (Ácido tricloroacético) 10% por uma hora a 4°C;
- lavagem com água destilada, por oito a dez vezes, para retirar o TCA e o SDS;
- coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,2%, ácido acético a 7% e metanol a 50% (filtrado após a preparação), por uma noite à temperatura ambiente;
- descoloração em solução descorante para Coomassie (ácido acético glacial a 7,5% e metanol a 5,0%), quantas vezes fossem necessárias;

e. conservação do gel em solução conservante (ácido acético a 7,5% e glicerol a 1,5%), por no mínimo duas horas. consequentemente a uma baixa resolução das bandas no gel.

6.3. Preparação das amostras

As amostras para a eletroforese eram maceradas a 0°C, em 20 µl do tampão de amostra contendo 2% de SDS (item 6.1), com auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, aquecidas em banho-maria à 100°C por 3 minutos para desnaturação e complexação do SDS às proteínas, e centrifugadas a 2.000 rpm, por 2 minutos. Volumes de 10 µl dos sobrenadantes eram, então, aplicados nos géis. Nas eletroforeses de glândulas salivares incubadas em meio Grace, utilizamos um macerado de 20 glândulas, por amostra. Nas eletroforeses de larvas inteiras incubadas em Demerec, utilizamos amostras individuais (uma larva por poço do gel).

6.4. Procedimentos de incubação de glândulas salivares e larvas para eletroforese e autorradiografia

Para este fim, foram testados 4 procedimentos.

Em um primeiro, as glândulas salivares de larvas de 3º estágio tardio foram dissecadas utilizando-se lâminas e solução fisiológica de Demerec à temperatura de 20°C (controle). Em seguida, as glândulas eram incubadas em tubos de centrifuga contendo solução fisiológica de Demerec, previamente mantidas a 10°C, 20°C (controle) ou 37°C. Em cada tubo eram colocados três pares de glândulas salivares de larvas de mesmo sexo e o tratamento era feito por um período de uma hora. Nesse procedimento houve dificuldade em

substituir a solução fisiológica pelo tampão de amostra após o choque, levando a uma diluição das amostras e consequentemente a uma baixa resolução das bandas no gel.

Outra tentativa foi a incubação direta das larvas por uma hora em tubos de centrífuga contendo solução fisiológica de Demerec, previamente mantidas na temperatura de choque, e posteriormente a dissecação e a utilização de três pares de glândulas salivares para a preparação das amostras. Neste procedimento, a maioria das larvas morria durante a incubação, dificultando a obtenção do número apropriado de glândulas salivares para cada amostra.

Numa tentativa de evitar a morte das larvas e a diluição das amostras, testamos um procedimento no qual as larvas eram incubadas diretamente em placas de Petri de vidro, com 5,5 cm de diâmetro, contendo papel de filtro embebido em solução fisiológica de Demerec, previamente mantido na temperatura de choque (item 5.1. b). Em cada placa eram colocadas várias larvas e o tratamento era de uma hora ou duas horas à temperatura de 10°C, 20°C (controle) e 37°C. Neste procedimento as larvas permaneciam vivas e eram então, após o tratamento, individualmente maceradas em tampão de amostra, e eram utilizadas para eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% e também em géis em gradiente de 7 a 15%, ambos contendo SDS. Diante dos resultados, este procedimento foi adotado.

Outro procedimento adotado foi a dissecação das glândulas salivares de larvas de 3º estágio tardio em meio Grace à temperatura de 10°C, 20°C (controle), e 37°C, e a incubação das mesmas em vidros de relógio contendo 40 µl do mesmo meio, em câmara úmida, por duas horas. Em seguida, as glândulas de dez indivíduos eram utilizadas para a preparação das amostras para eletroforese em gradiente de 7 a

15%, utilizando-se, portanto, vinte glândulas de larvas de mesmo sexo por amostra. Esse mesmo procedimento foi utilizado para a incubação de glândulas salivares de larvas de 3º estágio tardio com metionina - ^{35}S . Neste caso, vinte glândulas, sendo dez de cada sexo eram incubadas em vidros de relógio contendo 40 μl do meio Grace, mais 2 μl de metionina - ^{35}S (atividade específica de 10 uci/ μl), em câmara úmida, nas três temperaturas, por duas horas. Após o período de incubação, as glândulas salivares eram utilizadas para eletroferese em gel de poliacrilamida em gradiente de 7 a 15% contendo SDS. Em seguida, os géis eram corados e secos conforme descrito no item 6.5., e submetidos à autorradiografia.

6.5. Secagem dos géis

A secagem dos géis foi realizada conforme CERON et al. (1992), com algumas modificações. Após os géis permanecerem na solução conservante (ácido acético 7,5% e glicerol 1,5%), por duas horas, estes eram banhados numa solução de gelatina incolor a 5%, feita a partir de produto comercial (Royal ou Anglo), e em seguida, prensados entre duas folhas de papel celofane umidecido, utilizando-se bastidores. Os bastidores eram, então, fixados por garras, e deixados, à temperatura ambiente por três a quatro dias para a secagem. Neste procedimento os géis desidratam, transformando-se em uma fina película entre as folhas de celofane que podem ser recortadas e guardadas para análise posterior.

Após a secagem dos géis contendo as amostras que foram incubadas com metionina - ^{35}S , estes foram expostos a filmes de raios-X Kodak X-OMAT, por três e sete dias, em câmara escura, à



temperatura ambiente. Em seguida, o filme de raios-X foi revelado, visualizando-se as bandas de proteínas que incorporaram a metionina -35s.

6.6. Determinação do peso molecular

Os pesos moleculares (PM) de alguns polipeptídeos das larvas de 3º estágio tardio de *M. mulleri* e *M. arizonensis* e seus híbridos foram determinados, em gel de poliacrilamida a 10% e em gradiente de 7 a 15%, ambos contendo SDS, por comparação da migração de proteínas de pesos moleculares conhecidos, utilizadas como padrões. As seguintes proteínas foram utilizadas: miosina (PM. 205 kilodaltons= 205 kD), beta galactosidase (116 kD), fosforilase b (97,4 kD), soroalbumina (66 kD), ovoalbumina (45 kD), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kD), anidrase carbônica (29 kD), inibidor de quimotripsina (20,1 kD), calmodulina (17 kD) lisozima (14,3 kD), e citocromo C (11,7 kD). Esses padrões eram da Sigma Chemical Co., exceto a lisozima que era da Merck. O inibidor de quimotripsina foi isolado e purificado a partir de sementes da leguminosa *Schizolobium parahyba* no Laboratório de Biofísica da Universidade de Brasília.

Os gráficos relacionando o logaritmo do peso molecular (log PM) com a migração relativa (MR) dessas proteínas em géis de poliacrilamida a 10% e em gradiente linear de 7 a 15%, ambos contendo SDS, são apresentados respectivamente, nas figuras 1 e 2.



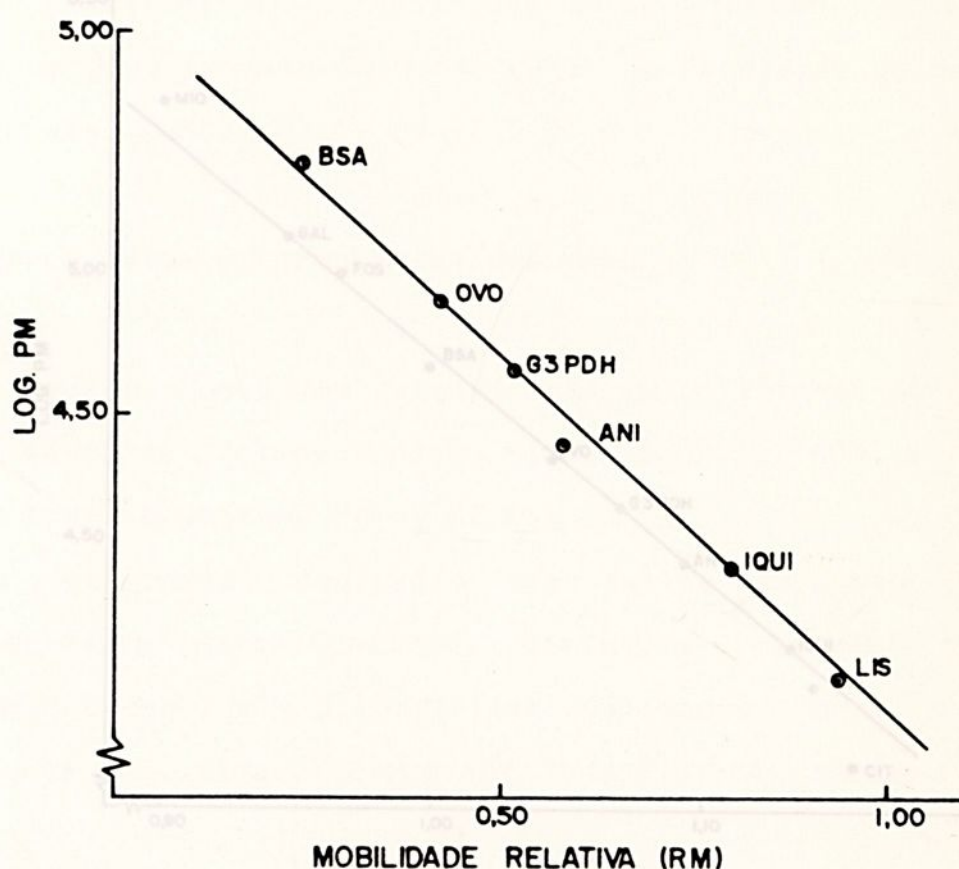


Figura 1. Distribuição das proteínas-padrão de pesos moleculares conhecidos em SDS-PAGE a 10%. BSA = soroalbumina, PM. 66 kD; OVO = ovoalbumina, PM. 45 kD; G3PDH = gliceraldeído 3 - fosfato desidrogenase, PM. 36 kD; ANI = anidrase carbônica, PM. 29 kD; INIQ = inibidor de quimotripsina, PM. 20,1 kD e LIS = lisozima, PM. 14,3 kD.

CAL = calmodulina, PM. 17 kD e CIT = citocromo C, PM. 11,7 kD.

4.7. Densitometria

As análises densitométricas dos padrões de bandas de proteínas das amostras de larvas de 3º estágio tardio de *B. mellari*, *B. arizonensis* e híbridos, foram feitas num densitômetro modelo "Scanning Densitometer GS 300" da HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, no Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

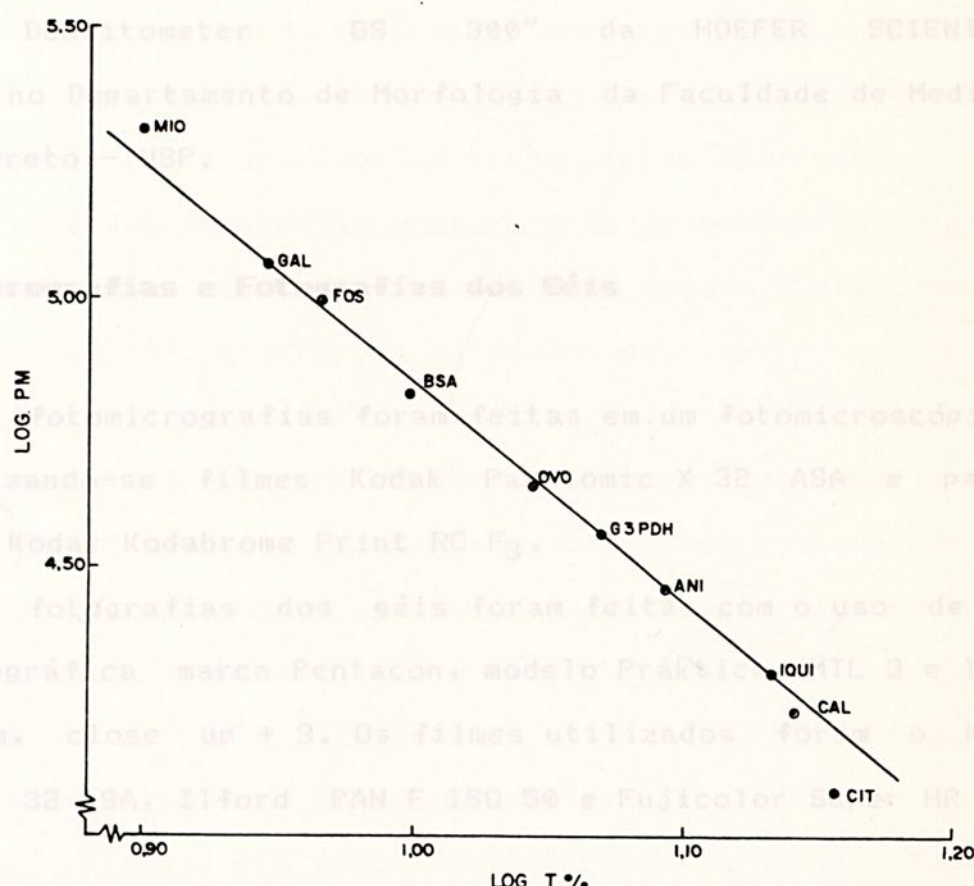
7. Fotomicrografias e Fotomicrografias dos Géis

As fotomicrografias foram feitas em um fotomicroscópio II Zeiss, utilizando-se filmes Kodak Panatomic X 32 ASA e papéis fotográficos Kodak Kodabrome Print RC Fg.

As fotografias dos géis foram feitas com o uso de uma máquina fotográfica marca Pentacon, modelo Praktic TL-3 e lente focal 49 mm, close up + 3. Os filmes utilizados foram o Kodak Panatomic X 32 ASA, Ilford PAN F ISO 50 e Fujicolor 35 HR 100 ASA.

Os filmes Kodak Panatomic X 32 ASA e Ilford PAN F ISO 50

Figura 2. Distribuição das proteínas-padrão de pesos moleculares conhecidos em SDS-PAGE em gradiente de 7 a 15%. MIO = miosina, PM. 205 kD; GAL = beta galactosidase, PM. 116 kD; FOS = fosforilase b, PM. 97,4 kD; BSA = soroalbumina, PM. 66kD; OVO = ovoalbumina, PM. 45 kD; G3PDH = gliceraldeído 3 - fosfato desidrogenase, PM. 36 kD; ANI = anidrase carbônica, PM. 29 kD; INIQ = inibidor de quimotripsina, PM. 20,1 kD; CAL = calmodulina, PM. 17 kD e CIT = citocromo C, PM. 11,7 kD.



6.7. Densitometria

1. As análises densitométricas dos padrões de bandas de proteínas das amostras de larvas de 3º estágio tardio de *D. mulleri*, *D. arizonensis* e híbridos, foram feitas num densitômetro modelo "Scanning Densitometer GS 100 300" da HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, no Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, que levaram às seguintes observações:

1) Ovos das espécies *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis*, coletados

7. Fotomicrografias e Fotografias dos Géis

temperaturas de 10°C e 37°C não se desenvolveram.

2) Larvas As fotomicrografias foram feitas em um fotomicroscópio II Zeiss, utilizando-se filmes Kodak Panatomic X 32 ASA e papéis fotográficos Kodak Kodabrome Print RC F3, todas a temperatura de 10°C.

3) As fotografias dos géis foram feitas com o uso de uma máquina fotográfica marca Pentacon, modelo Práktica, MTL 3 e lente focal 49 mm, close up + 3. Os filmes utilizados foram o Kodak Panatomic X 32 ASA, Ilford PAN F ISO 50 e Fujicolor Super HR 100 ASA. larvas do 2º estágio, com aproximadamente 100 horas de idade, das

duas Os filmes Kodak Panatomic X 32 ASA e Ilford PAN F ISO 50 foram revelados e as fotos 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. 4 (6%) de *D. mulleri* e 3 (4%) de *D. arizonensis*,

passaram para o estágio seguinte, no qual cessaram o desenvolvimento.

4) Larvas de 3º estágio inicial, com aproximadamente 135 horas de idade, das espécies *D. mulleri* e *D. arizonensis*, postas a 10°C,



III. RESULTADOS

1. Temperatura e Desenvolvimento, em *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis*

Em um experimento preliminar para verificar o efeito da temperatura no desenvolvimento das moscas das duas espécies foram realizados alguns testes que levaram às seguintes observações:

- 1) Ovos das espécies *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis*, coletados logo após a oviposição ou 24 horas depois, colocados às temperaturas de 10°C e 37°C não se desenvolveram.
- 2) Larvas de 1º estágio recém-nascidas, e aquelas com aproximadamente 35 horas ou 45 horas de idade, das espécies *D. mulleri* e *D. arizonensis*, quando colocadas à temperatura de 10°C, sobreviveram durante aproximadamente oito dias, não evoluindo para os estádios seguintes. Quando colocadas para se desenvolver à temperatura de 37°C, sobreviveram apenas três dias, não passando, também, para os estádios seguintes.
- 3) Larvas do 2º estágio, com aproximadamente 100 horas de idade, das duas espécies, colocadas para se desenvolver à temperatura de 10°C, sobreviveram por aproximadamente sete dias, não passando para os estádios seguintes. A 37°C, em sua maioria, permaneceram vivas por aproximadamente três dias apenas, mas, entre 50 larvas de cada espécie, 4 (8%) de *D. mulleri* e 3 (6%) de *D. arizonensis*, passaram para o estágio seguinte, no qual cessaram o desenvolvimento.
- 4) Larvas de 3º estágio inicial, com aproximadamente 155 horas de idade, das espécies *D. mulleri* e *D. arizonensis*, postas a 10°C,



sobreviveram por aproximadamente três dias. A 37°C, larvas de mesma idade sobreviveram por aproximadamente 24 horas, sendo que quatro das 50 larvas das duas espécies (8%) atingiram a fase de puparium.

5) Larvas de 3º estágio tardio, com aproximadamente 220 horas de idade, postas a 10°C, sobreviveram por cerca de 24 horas. Três das 50 larvas de *D. mulleri* (6%) e quatro das 50 larvas de *D. arizonensis* (8%) passaram para a fase de puparium. A 37°C, sobreviveram também por cerca de 24 horas, sendo que as mesmas porcentagens das duas espécies passaram para a fase de pupa jovem, mas não atingiram a fase adulta. Comparando-se o desenvolvimento dessas espécies a 20°C com o desenvolvimento às temperaturas de 10°C e 37°C, a 10°C é mais lento e a 37°C é mais acelerado.

2. Padrão de Pufes no Cromossomo 2 em Glândulas Salivares

Submetidas a Aquecimento e Resfriamento

Esta parte do presente trabalho, como as demais, foi desenvolvida utilizando-se as temperaturas de 10°C, 20°C (controle), e 37°C. Foram incubadas larvas inteiras ou apenas as glândulas salivares de fêmeas e machos de *D. mulleri*, *D. arizonensis* e híbridos, recém-dissecadas em condições consideradas adequadas. Foram utilizados dois meios para incubação: a solução fisiológica de Demerec, específica para insetos (DEMEREK & KAUFMANN, 1945) e o meio de Grace, específico para cultura celular de insetos (GRACE, 1962). Para incubação, as glândulas foram submersas na solução ou meio e as larvas inteiras foram colocadas sobre papel de filtro umedecido com



Demerec, colocado em placas de Petri.

A Figura 3 mostra algumas observações realizadas na comparação das lâminas preparadas a partir do material incubado nas diferentes situações mencionadas. Podem ser observadas, nessa figura, alterações cromossômicas estruturais que ocorrem nesses meios e temperaturas e que dão aos cromossomos um aspecto "desenovelado" (por exemplo 3 A, C e F) ou vacuolizado (3 E) ou uma mistura de ambos (3 B, D), afetando a definição do padrão de bandamento. Também houve dificuldade em obter cromossomos distendidos.

As observações realizadas mostraram que a incubação de glândulas salivares ou de larvas a 37°C provoca alterações mais drásticas nos cromossomos do que à 10°C. Quanto aos meios de cultura, porém, há diferenças entre a incubação de glândulas e de larvas. A incubação de glândulas na solução de Demerec, aparentemente causa mais dano aos cromossomos do que a incubação no meio Grace. Com relação às larvas, entretanto, quando incubadas em Demerec, seus cromossomos mostraram-se estruturalmente mais bem conservados que nas glândulas incubadas no meio Grace. Para fins desse tipo de estudo, portanto, a incubação de larvas no Demerec foi o método de melhores resultados sob o aspecto da estrutura e da distensão dos cromossomos.

Neste trabalho, optou-se por estudar apenas o cromossomo 2, dadas as dificuldades de reconhecimento e acompanhamento de alterações nos padrões de pufes, na ausência de marcadores radioativos e pela dificuldade de obter bons cromossomos para análise.

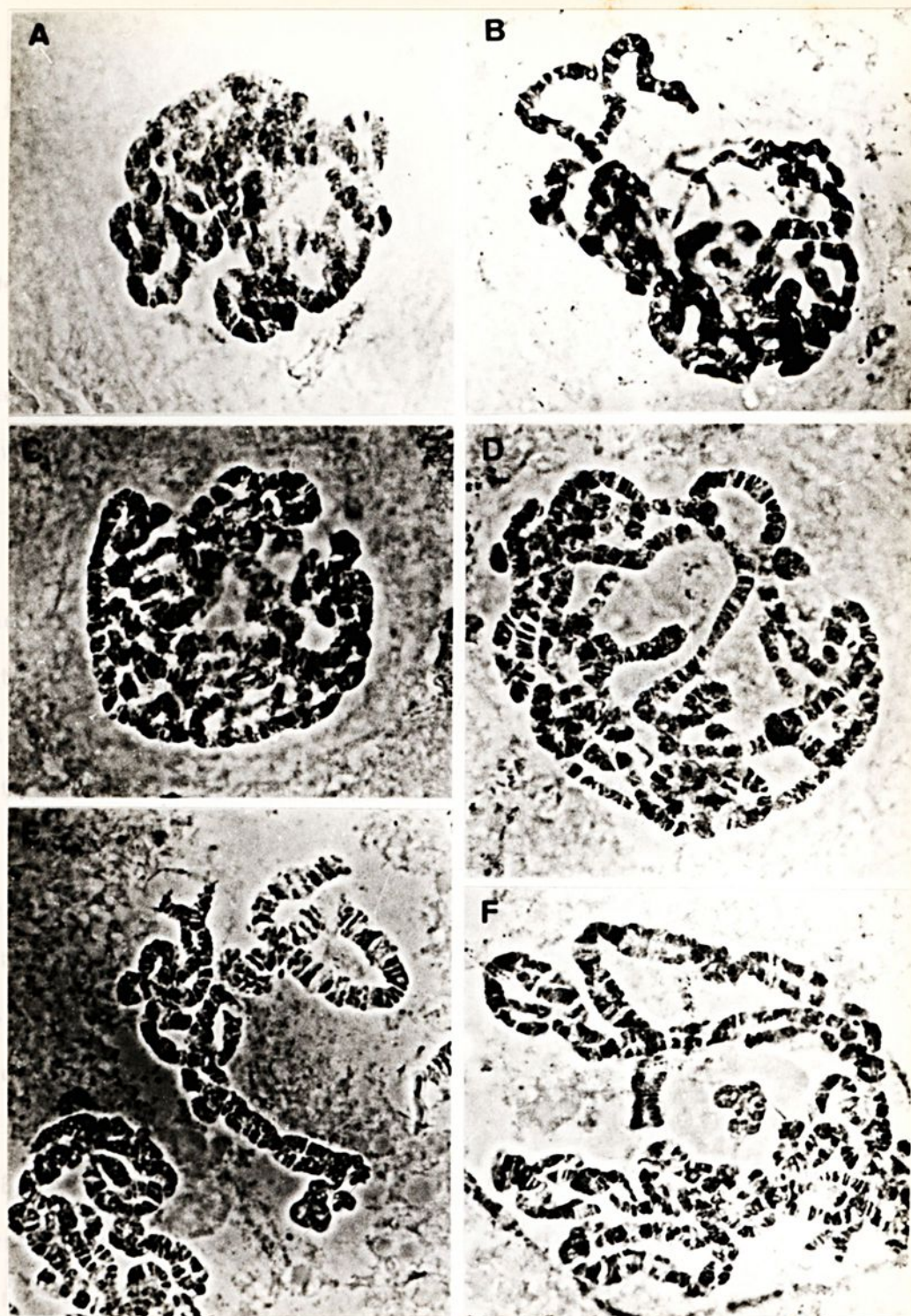


Figura 3 A-F. Alterações nos cromossomos, observadas nos diferentes meios de incubação utilizados neste trabalho. A,B. Glândula salivar de fêmea de *D. mulleri* incubada a 37°C, por uma hora, em meio Grace (A) e em Demerec (B); C,D. Glândula salivar de fêmea de *M. arizonensis* incubada em meio Grace, por uma hora, a 37°C (C) e a 10°C (D); E,F. Glândulas salivares de híbridos F_1 incubadas em meio Grace a 37°C, por uma hora. Observar nestas fotografias o aspecto "desenovelado" ou "vacuolizado" dos cromossomos. Aumento: 2.270x.

2.1. *Drosophila mulleri*

As Figuras 4 a 8 referem-se aos padrões de pufes do cromossomo 2 de *D. mulleri*.

A Figura 4 mostra o cromossomo 2 de uma larva fêmea e uma larva macho dessa espécie, incubadas em Demerec, por uma hora, a 20°C, apresentando, portanto, os padrões de bandas usados como controle. Pode-se verificar que não há, nesses indivíduos, grandes pufes ao longo do cromossomo. Destaca-se apenas o pufe presente na extremidade distal, no qual ainda é possível reconhecer algumas bandas terminais. Não se observam diferenças cromossômicas estruturais, aparentes, entre os dois sexos, nas condições do experimento.

A Figura 5 refere-se a cromossomos de *D. mulleri*, em que as glândulas salivares foram incubadas em meio Grace por uma hora, a 20°C. Aparentemente, não há diferenças detectáveis entre as duas condições de incubação, a não ser a melhor qualidade dos cromossomos na Figura 4.

As Figuras 6, 7 e 8 referem-se a cromossomos de *D. mulleri* em condições de aquecimento a 37°C, por uma hora, sendo que a Figura 6 foi preparada a partir de larvas incubadas em Demerec e as Figuras 7 e 8, a partir de glândulas salivares incubadas em meio Grace.

Na Figura 6 são observados dois padrões de pufação encontrados no cromossomo 2 em diferentes indivíduos. No primeiro (Figura 6 A), apenas o pufe da extremidade terminal aparece mais dilatado e com menor número de bandas visíveis em relação ao controle (Figura 4). No segundo (Figura 6 B), além desse pufe na

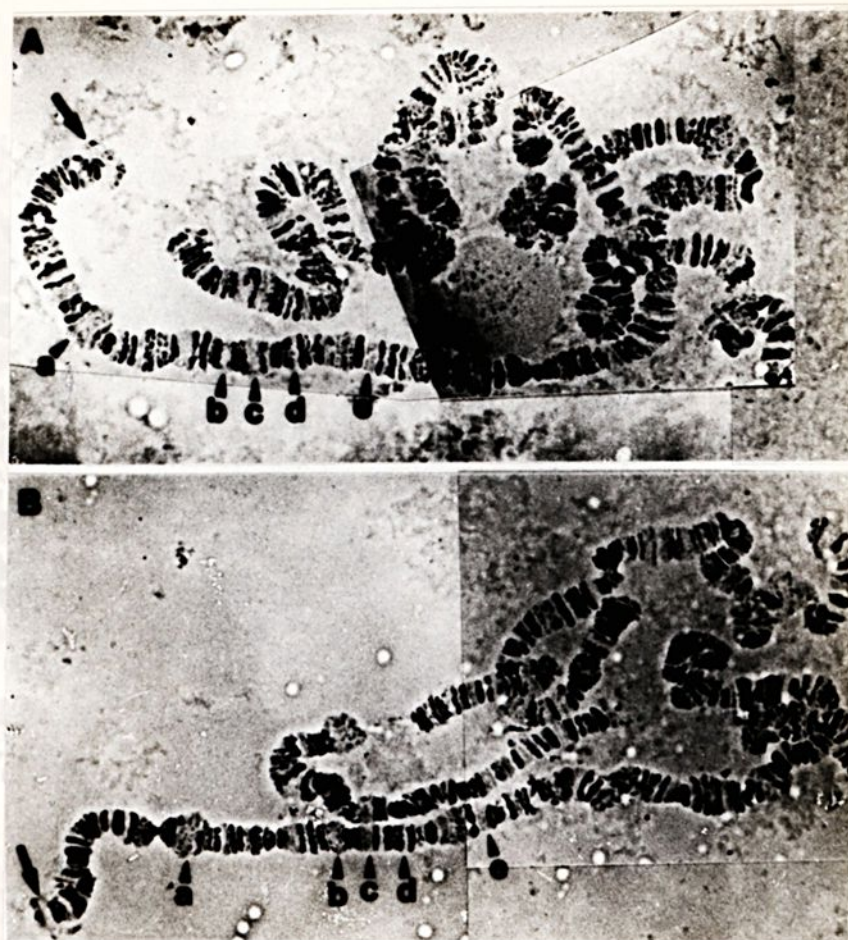


Figura 4 A, B. *M. mulleri*. A. Fêmea e B. Macho. Larvas de 3º estágio tardio incubadas em Demerec, por uma hora, a 20°C. As pontas de seta apontam as regiões do cromossomo 2 que irão mostrar os maiores pufes, na incubação a 37°C, e as setas apontam o pufe que caracteriza a extremidade distal desse cromossomo. Aumento: 2.060x.

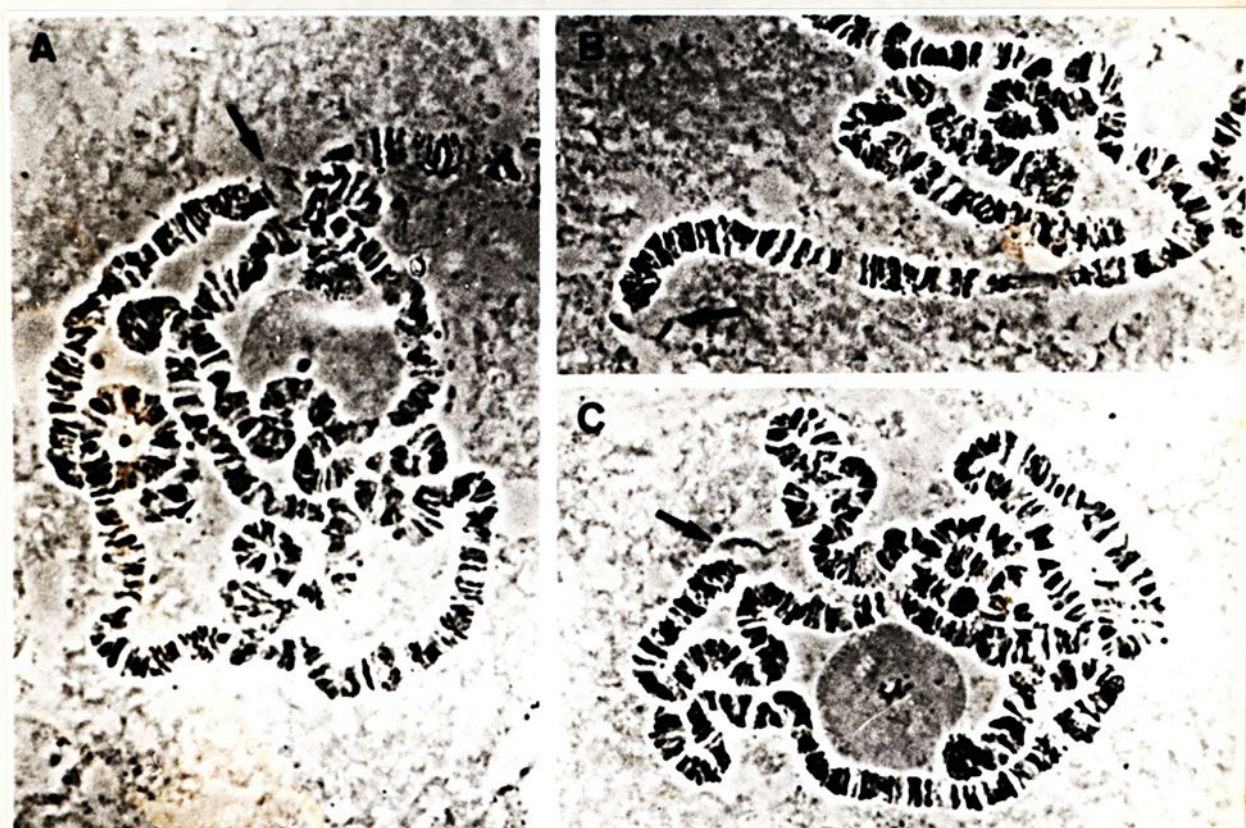


Figura 5 A-C. *D. mulleri*. Glândulas salivares de larvas macho de 3º estágio tardio, incubadas em meio Grace, por uma hora, a 20°C. As setas apontam o pufe terminal do cromossomo 2. Aumento: 2.580x.

Figura 6 A, B. *D. mulleri*. Glândulas salivares de larvas macho de 3º estágio tardio, incubadas em meio Grace, por uma hora, a 20°C. As setas apontam o pufe terminal do cromossomo 2. Aumento: 2.580x.



Figura 6 A, B. *D. mulleri*. Larvas macho de 3º estágio tardio incubadas em Demerec e aquecidas a 37°C, por uma hora. A, B. Dois padrões de pufes diferentes, observados no cromossomo 2 de indivíduos submetidos ao mesmo tratamento. Aumento: 2.660x.

extremidade distal, ocorrem cinco outros pufes de tamanho crescente na direção da extremidade distal para a extremidade proximal, a que denominamos **2a** e **2e**. Assim, o maior deles é o que denominamos **2e** e cuja localização no controle está assinalada na Figura 4.

A Figura 7 mostra duas células de glândulas incubadas em meio Grace. Observa-se que a estrutura cromossômica está ligeiramente alterada nesta Figura, comparada com a anterior. Nessas condições foram também observados os dois padrões de resposta já descritos na Figura 6. Em A destaca-se o pufe da extremidade distal e em B pode-se observar o grande pufe **2e**.

A Figura 8 mostra glândulas salivares incubadas em meio Grace, aquecidas a 37°C, por uma hora. São observados os pufes da extremidade distal e o grande pufe **2e**, cuja localização é indicada na Figura 8 D. A dificuldade em abrir e separar os conjuntos cromossômicos também é evidenciada nessas fotografias, juntamente com alterações estruturais.

A Figura 9 refere-se ao tratamento por resfriamento a 10°C, durante uma hora, de larva incubada em Demerec (Figura 9 A) e de glândula salivar incubada em meio Grace (Figura 9 B). Não foram observadas diferenças quanto ao padrão de resposta do cromossomo 2, nas duas condições, nem em relação ao padrão de pufes do controle. Apenas a qualidade dos cromossomos é melhor em A.

2.2. *Drosophila arizonensis*

As Figuras 10 a 13 referem-se a *D. arizonensis*.

A Figura 10 mostra o padrão de resposta do cromossomo 2 de larvas dessa espécie, incubadas em solução de Demerec a 20°C, por

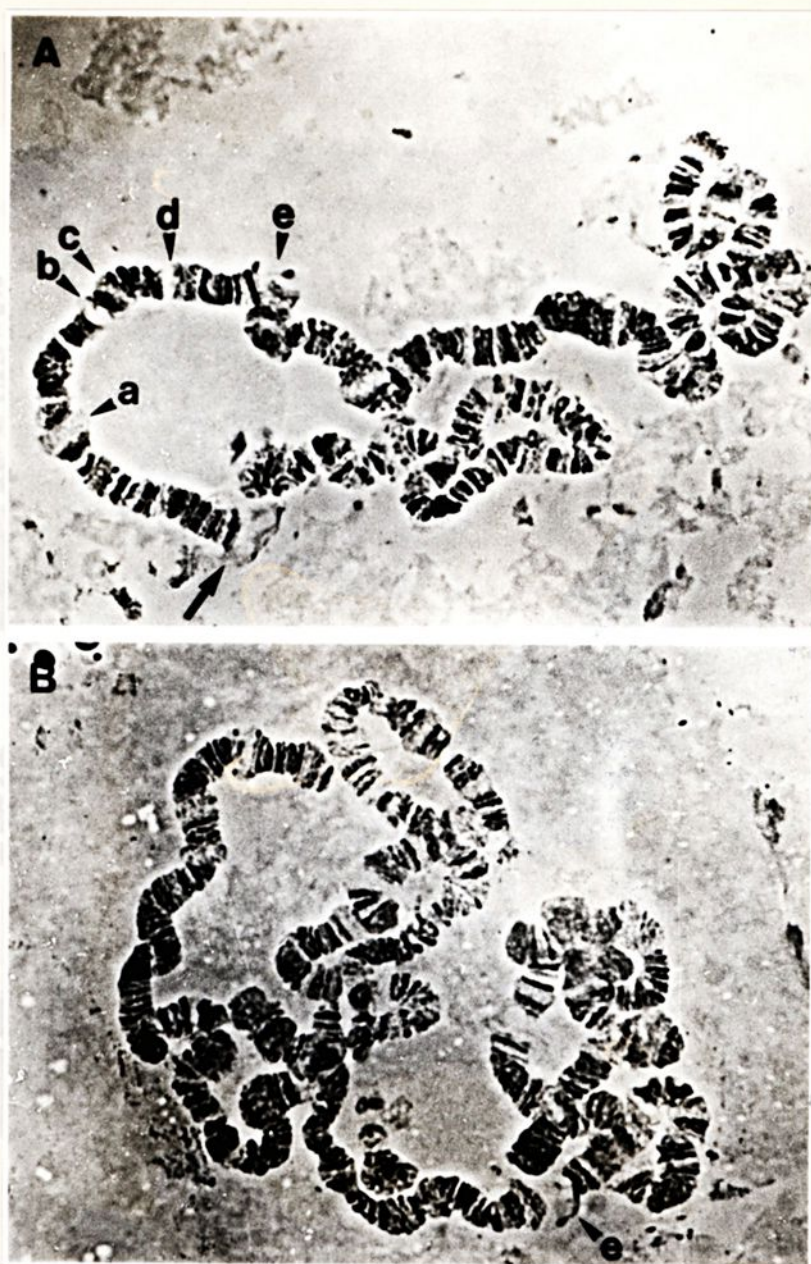


Figura 7 A, *E. D. mulleri*. Glândulas salivares de larvas macho de 3º estágio tardio, incubadas em meio Grace e aquecidas a 37°C, por uma hora. A. pufes terminal e do terço proximal do cromossomo 2. B. pufe 2e. Observar que a estrutura cromossômica mostra alguma alteração, nos dois indivíduos. Aumento: 2.650x.

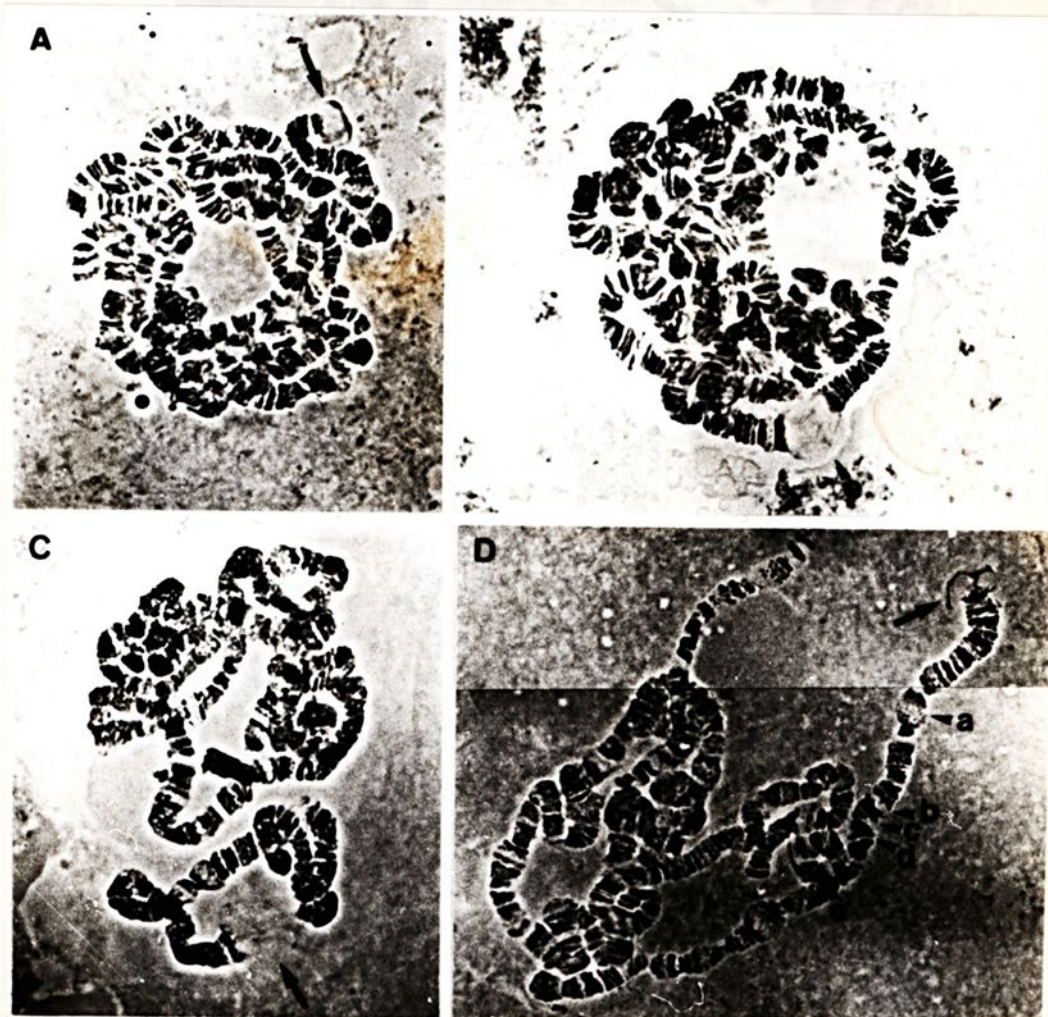


Figura 8 A-D. *D. mulleri*. Glândulas salivares de larvas fêmeas de 3º estágio tardio incubadas em meio Grace a 37°C, por uma hora. A, C. pufes da extremidade distal do cromossomo 2; B. pufe 2e; D. localização dos pufes da extremidade distal (seta) e do terço proximal (ponta de seta) do cromossomo 2. Aumento: 2.210x.

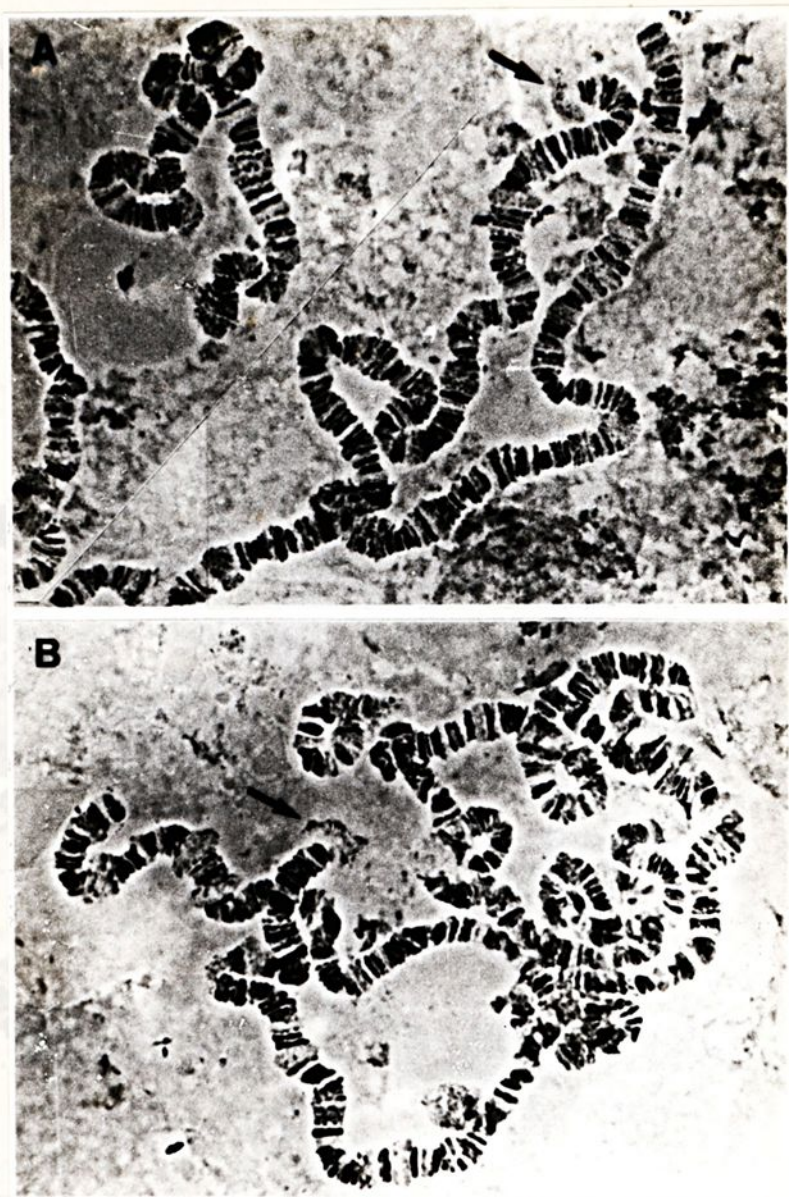


Figura 9 A, B. *B. D. mulleri*. Fêmeas resfriadas a 10°C , por uma hora.
 A. Larva incubada em Demerec; B. Glândula salivar incubada em meio Grace. Não se observam diferenças no padrão de resposta do cromossomo 2, nas duas condições. Aumento: 2.360x.

Fêmeas. As salivas incubadas em meio Grace. Aumento: 2.360x.

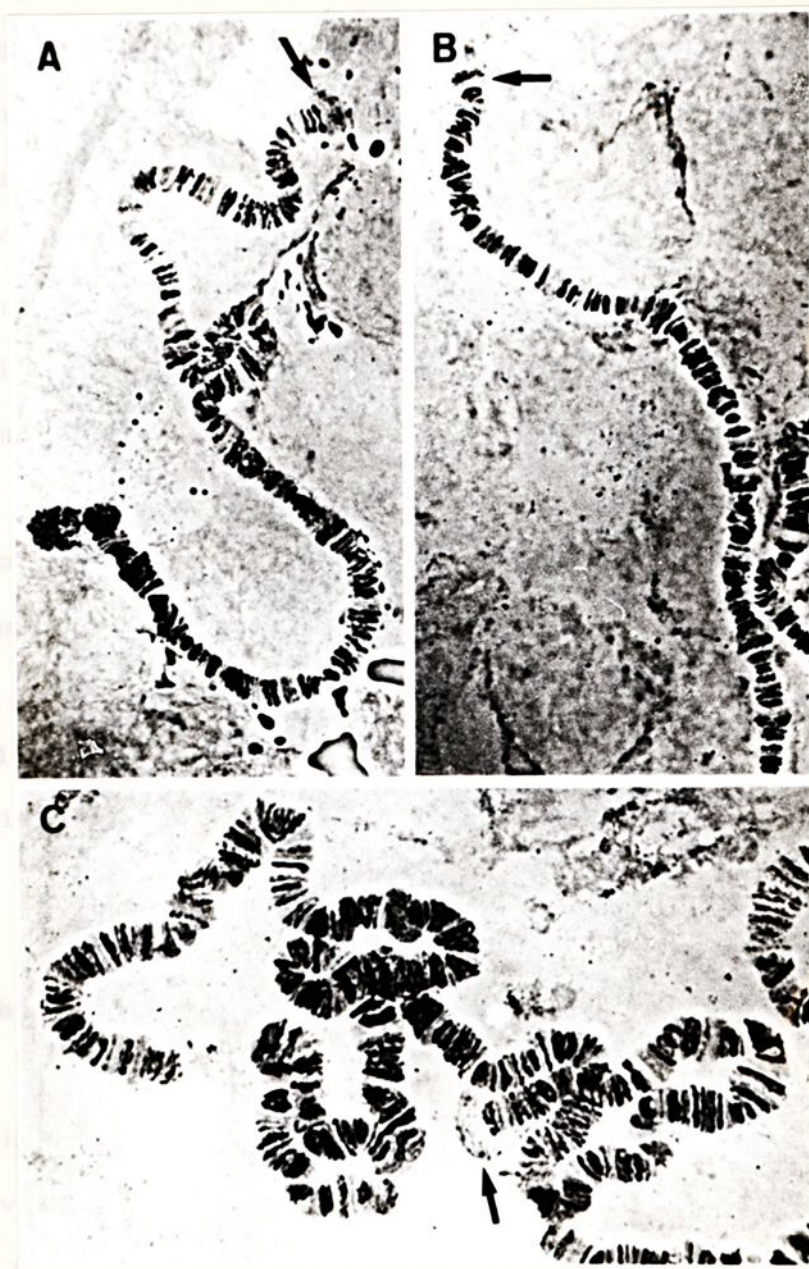


Figura 10 A-C. *D. arizonensis*. Larvas de 3º estágio tardio incubadas em Demerec a 20°C (controle), por uma hora. A. Macho; B, C. Fêmeas. As setas apontam o pufe da extremidade distal. Aumento: 2.600x.

uma hora. Trata-se, portanto, do padrão controle. Da mesma maneira que em *D. mulleri*, destaca-se nesses indivíduos o pufe da extremidade distal.

A Figura 11 refere-se a larvas incubadas em Demerec à temperatura de 37°C, por uma hora. Destaca-se, igualmente, nos dois indivíduos, a resposta acentuada do pufe da extremidade distal.

A Figura 12 mostra o cromossomo 2 de larvas incubadas em Demerec a 10°C, por uma hora. Como em *D. mulleri*, o padrão desse cromossomo aparentemente não difere do controle (Figura 10).

A Figura 13 refere-se a glândulas salivares de larvas incubadas em meio Grace, por uma hora, nas três temperaturas. Esta Figura mostra a dificuldade que foi encontrada na obtenção de bons cromossomos para análise quando foram incubadas glândulas de *D. arizonensis* em meio Grace. As melhores lâminas, nessas condições, embora, ainda não suficientemente adequadas, foram obtidas na incubação a 10°C (Figura 13 C, D). Neste caso, sempre que foi possível analisar os cromossomos, observa-se que o pufe que se destaca é o da extremidade distal do cromossomo 2.

2.3. Híbridos *D. mulleri*/*D. arizonensis*

Híbridos de *D. mulleri* e *D. arizonensis* mostram uma figura complexa de inversões no cromossomo 2. Provavelmente, segundo BICUDO (1979), esse complexo de inversões superpostas envolve pelo menos três rearranjos. As Figuras 14 a 17 referem-se aos padrões de pufes desse cromossomo, submetidos aos choques de temperatura a 10°C e a 37°C, e o controle a 20°C.





Figura 11 A, B. *D. arizonensis*. Larvas de 3º estágio tardio incubadas em Demerec a 37°C, por uma hora. A. Macho; B. Fêmea. Aumento: 2.210x.

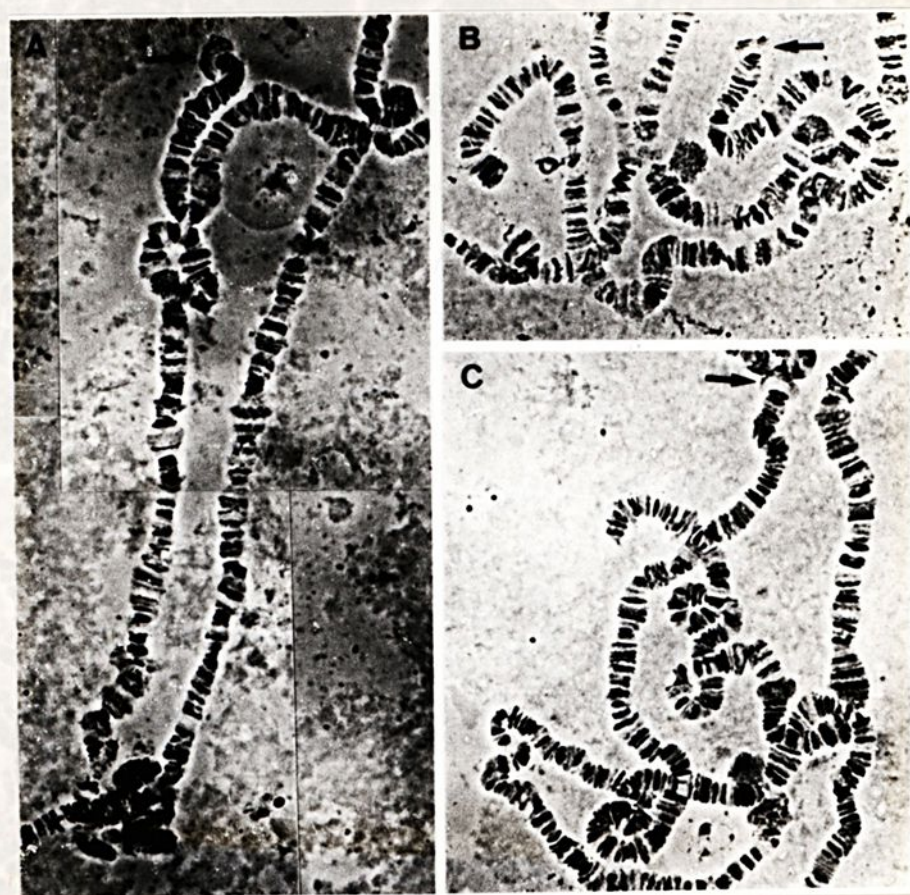


Figura 12 A-C. *M. arizonensis*. Larvas de 3º estágio tardio incubadas em Demerec a 10°C, por uma hora. A, B. Fêmeas; C. Macho. As setas apontam a extremidade distal do cromossomo 2. Aumento: 2.060x.

A Figura 14 mostra o cromossomo 2 de larvas híbridas incubadas em Demerec, por uma hora, nas três temperaturas.

Um aspecto evidente nos híbridos, é a diferença de tamanho entre os pufes da extremidade distal presentes nos cromossomos 2 de origem específica diferentes. Também é possível observar que essa diferença...

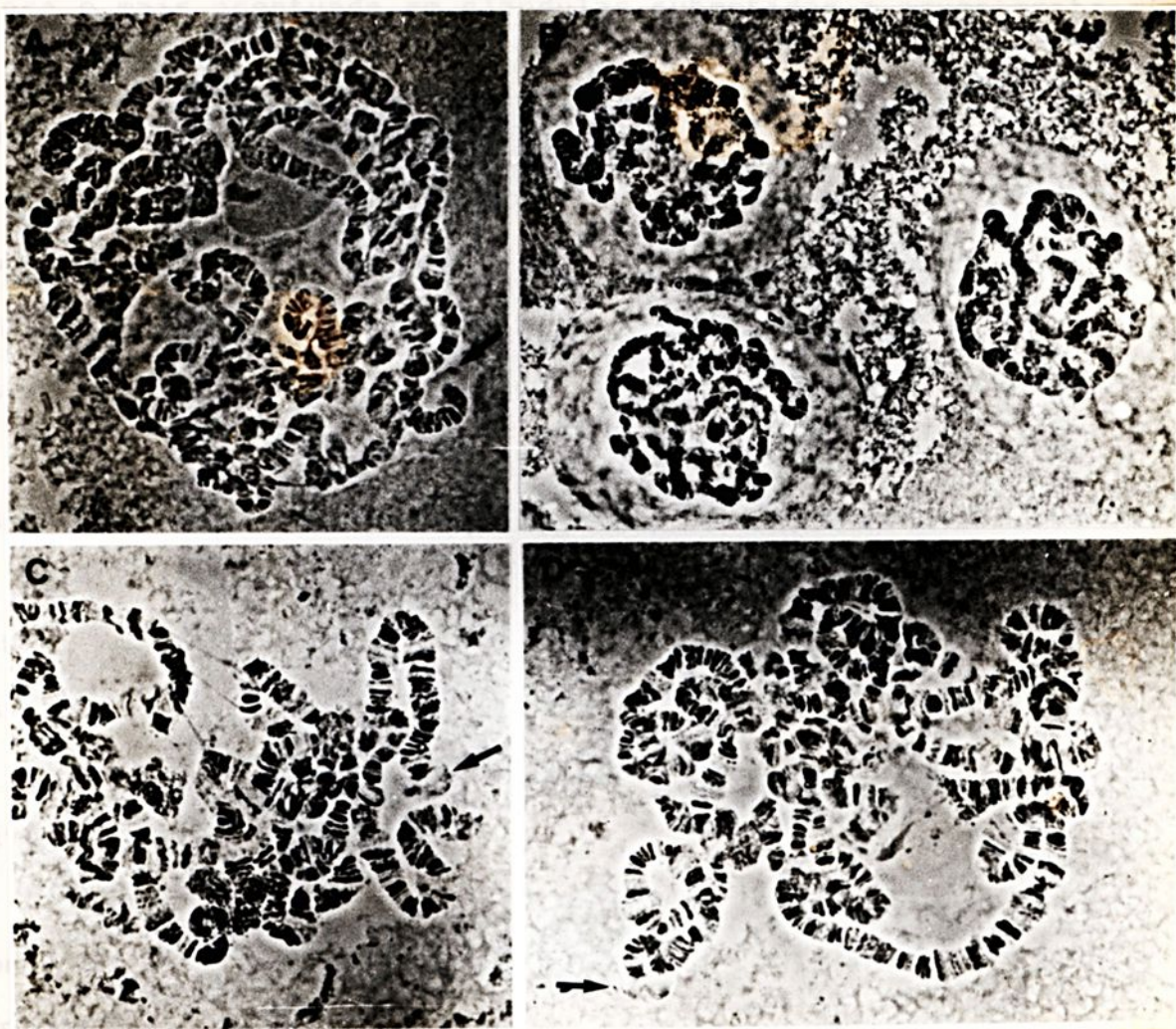


Figura 13 A-D. *D. arizonensis*. Glândulas salivares de larvas fêmea de 3º estágio tardio incubadas em meio Grace, por uma hora. A. a 20°C; B. a 37°C; C, D. a 10°C. As setas apontam a extremidade distal do cromossomo 2. Observar a impossibilidade de análise dos cromossomos em B, e a baixa qualidade dos cromossomos, para análise, nas demais figuras. Aumento: 2.130x.

A Figura 14 mostra o cromossomo 2 de larvas híbridas incubadas em Demerec, por uma hora, nas três temperaturas.

Um aspecto evidente nos híbridos, é a diferença de tamanho entre os pufes da extremidade distal presentes nos cromossomos 2 de origem específica diferentes. Também é possível observar que essa diferença é mais acentuada em glândulas submetidas a aquecimento.

A Figura 15 mostra, mais uma vez, o cromossomo 2 de larvas híbridas incubadas em Demerec, por uma hora, a 10°C e a 20°C . Também, neste caso, não parece haver diferenças detectáveis no padrão do cromossomo resfriado, comparado ao controle. Uma ligeira diferença de tamanho do pufe da extremidade distal é visível nestes cromossomos.

A Figura 16 refere-se a cromossomos de glândulas salivares incubadas em meio Grace, nas três temperaturas de experimentação. Neste caso, também se observa que na temperatura de 37°C há uma resposta mais acentuada dos pufes da extremidade distal do cromossomo 2.

A Figura 17 também mostra os cromossomos de glândulas salivares de híbridos, aquecidas a 37°C , por uma hora, em meio Grace. Também, nesta Figura, observa-se o grau acentuado de heteromorfismo de tamanho mostrado pelo pufe da extremidade distal do cromossomo 2. Não foi observada uma resposta acentuada de outros pufes, ao longo do cromossomo.

Na tentativa de quantificar as diferenças de tamanho observadas entre os pufes da extremidade distal do cromossomo 2, submetidos às diferentes temperaturas, foram tomadas medidas de área dos mesmos, utilizando-se um planímetro. Os resultados obtidos constam das Tabelas 3 e 4.





Figura 14 A-C. Híbridos *D. mulleri* x *D. arizonensis*. Larvas de 3º estágio tardio incubadas em Demerec, por uma hora. A. a 20°C (controle); B. a 10°C; C. a 37°C. Observar que a diferença de tamanho entre os pufes da extremidade distal do cromossomo 2 é mais acentuada em C. A seta delgada e a seta espessa mostram, respectivamente, os pufes menor e maior. Aumento: 2.270x.

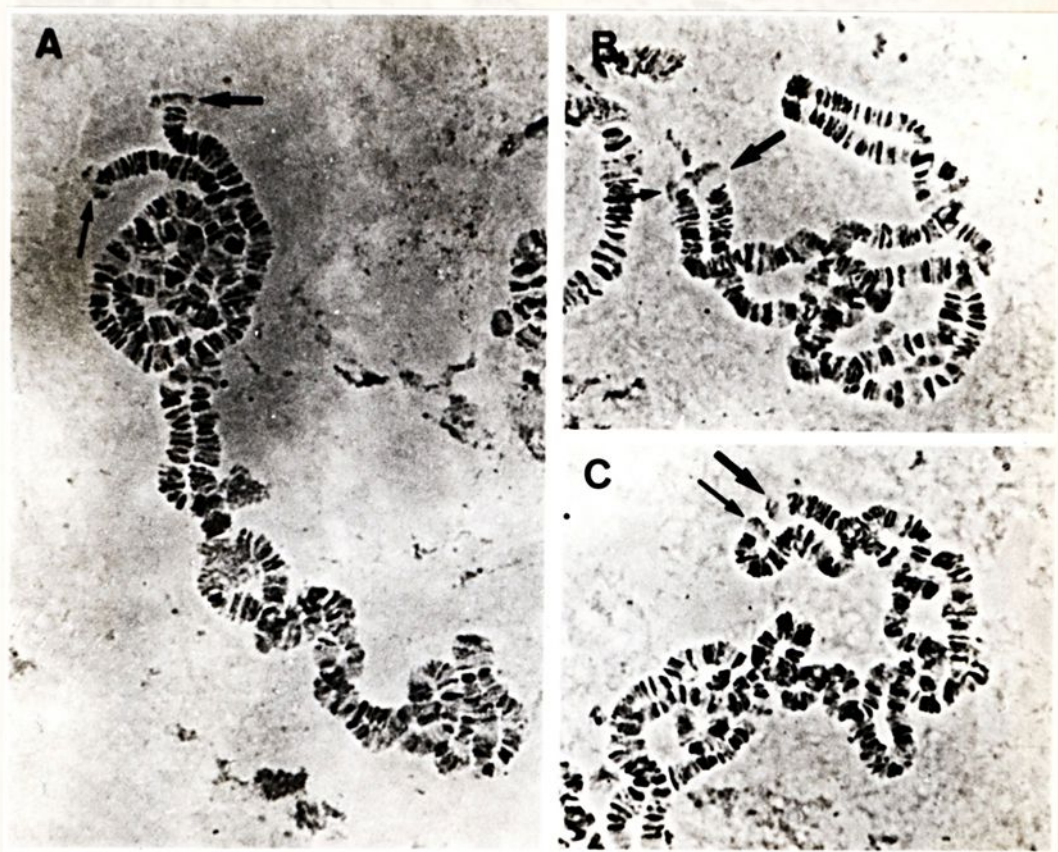


Figura 15 A-C. Híbridos *D. mulleri* x *D. arizonensis*. Larvas de 3º estágio tardio incubadas em Demerec, por uma hora. A. a 20°C (controle); B, C. a 10°C. As setas apontam os pufes da extremidade distal, nos quais é possível ver uma discreta diferença de tamanho. Aumento: 2.580x.

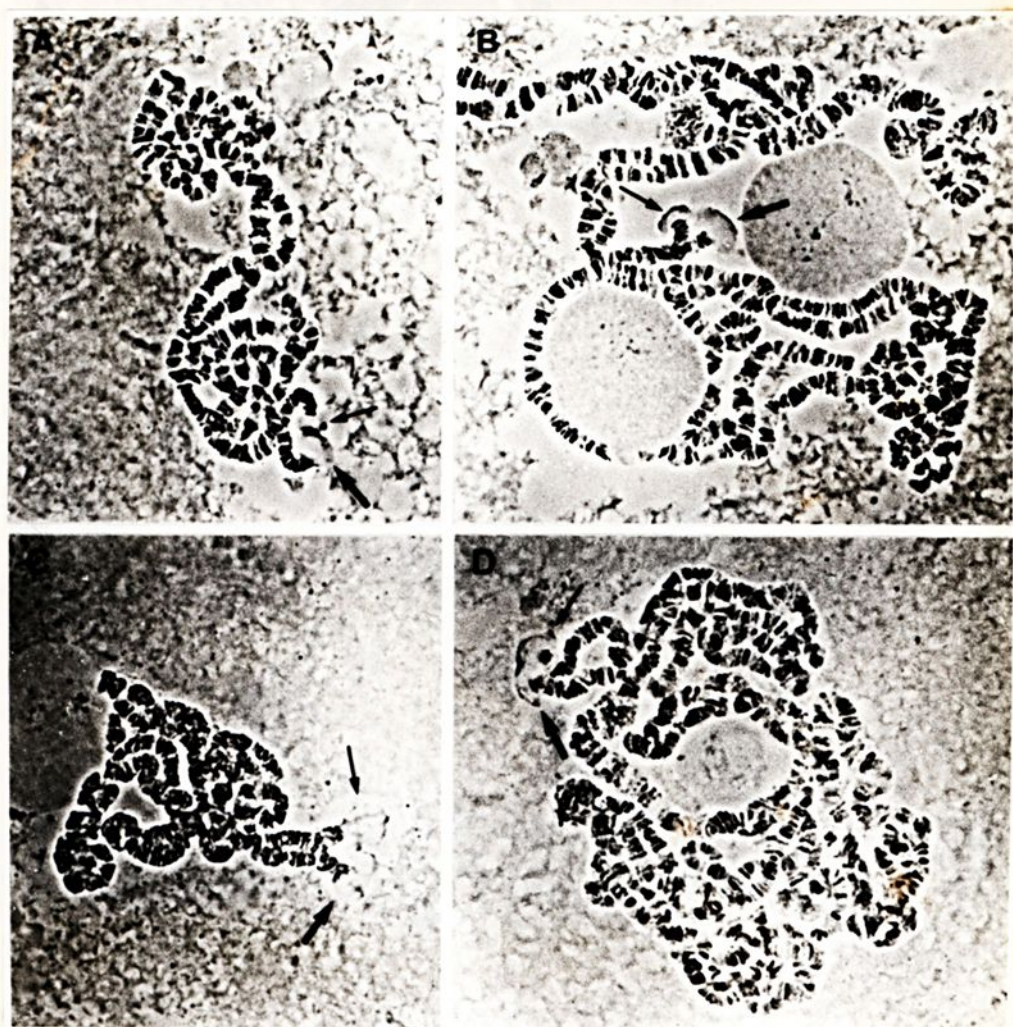


Figura 16

Figura 16 A-D. Híbridos *D. mulleri* x *D. arizonensis*. Glândulas salivares de larvas de 3º estágio tardio incubadas em meio Grace, por uma hora. A,B. a 20°C (Controle); C. a 37°C; D. a 10°C. Observar que a resposta dos pufes da extremidade distal do cromossomo 2 à incubação é mais acentuada em C. Aumento: 2.360x.

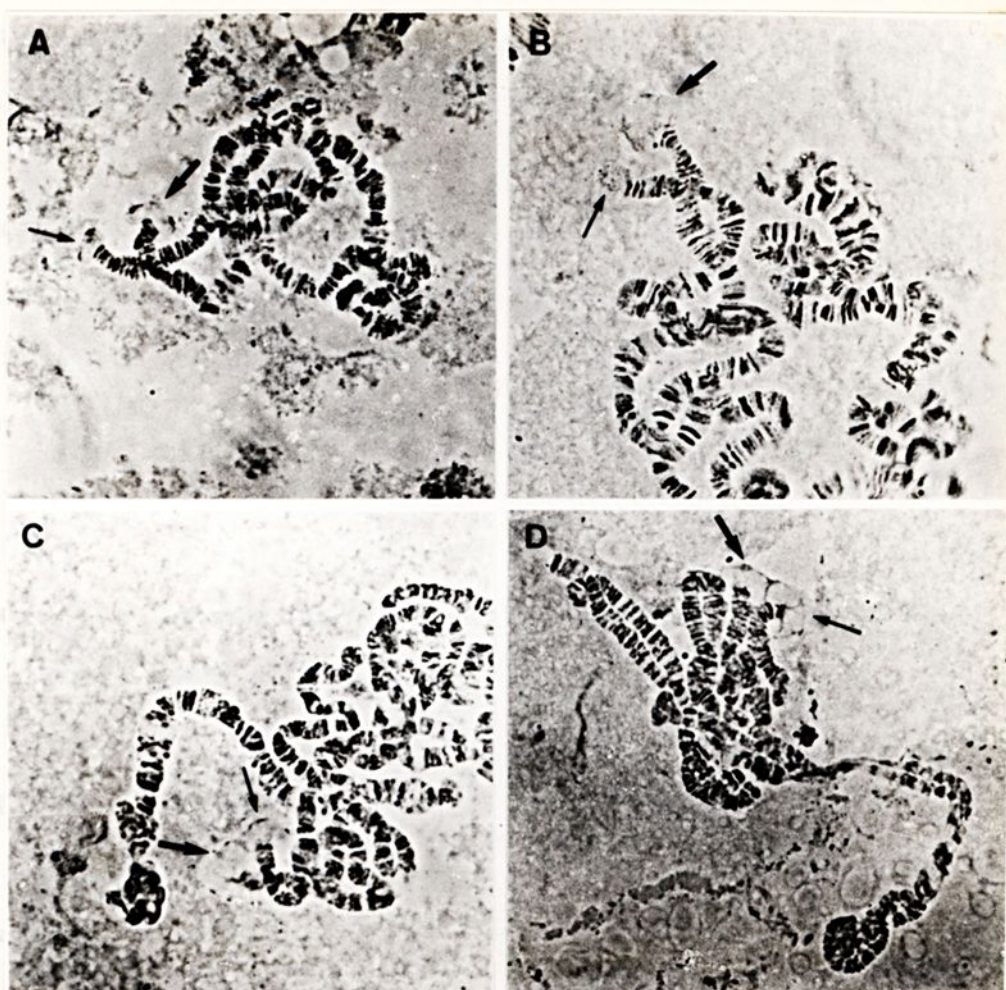


Figura 17 A-D. Híbridos *D. mulleri* x *D. arizonensis*. Glândulas salivares de larvas de 3º estágio tardio incubadas em meio Grace a 37°C, por uma hora. Observar os diferentes graus de heteromorfismo nos pufes da extremidade distal dos cromossomos 2 de diferentes origens. Observar também as alterações estruturais dos cromossomos, em C e D. Aumento: 2.060x.

Embora essa metodologia possa ser considerada imprecisa, os resultados estão de acordo com as observações visuais. Tanto em *D. mulleri* como em *D. arizonensis*, o pufe da extremidade distal do cromossomo 2 é maior sob condições de aquecimento (mais de duas vezes levando em conta a largura do cromossomo, em *D. mulleri*, e quase duas vezes em *D. arizonensis*, em comparação com o controle). Sob condições de resfriamento, o pufe é igual ou ligeiramente inferior ao controle, nas duas espécies (Tabela 3).

Quanto aos híbridos, observa-se uma situação semelhante a das espécies parentais, com resposta do pufe da extremidade distal dos cromossomos 2, mais acentuada sob condições de aquecimento (Tabela 4).

3. Padrão de Bandas de Proteína Total de Larvas de *D. mulleri*, *D. arizonensis* e Híbridos

Esse padrão foi analisado em dois experimentos. No primeiro, fêmeas e machos das duas espécies foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS (SDS - PAGE) a 10%, após incubação em Demerec a 10°C, a 20°C e a 37°C. No segundo, fêmeas e machos das duas espécies e híbridos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS (SDS - PAGE), em gradiente linear de 7 a 15%, após incubação em Demerec, às três temperaturas.

O número de larvas de 3º estágio tardio, analisadas em cada situação consta da Tabela 5.

Como mostra essa Tabela, no total foram analisadas 311 larvas de *D. mulleri* (178 fêmeas e 133 machos), 297 larvas de *D. arizonensis* (163 fêmeas e 134 machos) e 102 larvas híbridas. O sexo

Tabela 3. Medidas de área do pufe da extremidade distal dos cromossomos 2 de *D. mulleri* e *D. arizonensis*, submetidos à temperatura controle, a aquecimento e a resfriamento.

Espécie	Temperatura de tratamentos	Área dos pufes (mm ²)	Largura dos cromossomos (mm)
<i>D. mulleri</i>	20°C	3,2	4,5
		3,2	4,5
		4,0	6,0
		3,2	5,0
		$\bar{X} = 3,4$	$\bar{X} = 5,0$
	37°C	5,2	4,0
		5,6	3,5
		6,4	4,5
		16,0	5,0
		4,8	3,5
		4,0	2,5
		$\bar{X} = 7,0$	$\bar{X} = 3,8$
	10°C	3,6	5,0
		2,8	4,0
		3,2	5,0
		3,2	4,5
		$\bar{X} = 3,2$	$\bar{X} = 4,6$
<i>D. arizonensis</i>	20°C	5,2	6,0
		2,4	3,0
		3,6	4,0
		5,2	7,0
		3,6	5,5
		$\bar{X} = 4,0$	$\bar{X} = 5,1$
	37°C	5,6	5,0
		7,6	7,0
		6,0	4,0
		7,2	4,5
		9,6	6,5
		$\bar{X} = 7,2$	$\bar{X} = 5,4$
	10°C	2,8	4,0
		2,0	4,0
		2,8	3,5
		2,8	4,0
		$\bar{X} = 2,6$	$\bar{X} = 3,9$

Tabela 4. Medidas de área do pufe da extremidade distal dos cromossomos 2 de híbridos de *M. mulleri* e *M. arizonensis*, submetidos à temperatura controle, a aquecimento e a resfriamento.

Temperatura de tratamentos	Área dos pufes (mm ²)		Largura dos cromossomos (mm)
	pufe maior	pufe menor	
20°C	3,2 4,0 2,0 $\bar{X} = 3,0$	1,2 1,6 1,2 $\bar{X} = 1,3$	2,0 2,5 2,5 $\bar{X} = 2,3$
37°C	6,4 8,0 5,2 $\bar{X} = 6,5$	3,2 2,4 2,4 $\bar{X} = 2,7$	4,5 4,0 3,0 $\bar{X} = 3,8$
10°C	2,8 2,8 4,0 2,8 $\bar{X} = 3,1$	0,8 1,2 2,0 0,8 $\bar{X} = 1,2$	2,5 2,5 5,0 2,5 $\bar{X} = 3,1$

das larvas híbridas, como foi descrito por BICUDO & RICHARDSON (1978), não pode ser diferenciado.

3.1. Eletroforese em SDS-PAGE a 10%

Tabela 5. Número de larvas de 3º estágio tardio de *D. mulleri*, *D. arizonensis* e híbridos, utilizadas nos experimentos de eletroforese para proteína total. F= fêmeas, M= machos, TG= Total geral.

	Concen- tração do gel	Controle		Choque térmico										Total		TG		
		20°C		37°C						10°C								
				1 hora		2 horas		Subtotal		1 hora		2 horas		Subtotal				
		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M			
<i>D. mulleri</i>	10%	17	14	04	01	02	02	06	03	04	01	02	02	06	03	29	20	49
	Gradiente	54	37	30	21	18	17	48	38	29	21	18	17	47	38	149	113	262
	7 --> 15%																	
<i>D. arizonensis</i>	10%	17	14	08	06	-	-	08	06	07	05	-	-	07	05	32	25	57
	Gradiente	43	41	29	19	15	15	44	34	29	19	15	15	44	34	131	109	240
	7 --> 15%																	
Híbridos	Gradiente	34		18		16		34		18		16		34		-		102
	7 --> 15%																	

das larvas híbridas, como foi descrito por BICUDO & RICHARDSON (1978), não pode ser diferenciado.

3.1. Eletroforese em SDS-PAGE a 10%

A Figura 18 mostra os padrões de bandas obtidos de larvas de 3º estágio de *D. mulleri* e *D. arizonensis*, submetidas à eletroforese em géis a 10%. Essa Figura, além dos padrões obtidos para essas espécies, contém, para controle, os padrões dados pela amostra das proteínas soroalbumina, ovoalbumina, gliceraldeído - 3 fosfato desidrogenase (G-3PDH), anidrase carbônica, inibidor de quimotripsina, lisozima e citocromo C e uma coluna contendo a reunião de amostras de fêmeas das duas espécies.

A sequência das proteínas-padrão, na coluna, foi estabelecida individualmente em outros géis.

A análise dessa figura não mostra diferenças entre os dois sexos, tanto em *D. mulleri* como em *D. arizonensis*, no padrão geral de bandas.

Um aspecto que deve ser destacado é a variabilidade individual quanto ao padrão de bandas, no que se refere à intensidade de coloração. Na Figura 18, essa observação é particularmente visível com relação às bandas 6 e 8, de baixo peso molecular, de *D. mulleri*: as três fêmeas apresentam essas bandas mais intensamente coradas que os machos. Entretanto, em outros géis a situação pareceu inverter-se, isto é, os machos apresentaram essas bandas mais intensamente coradas ou ainda indivíduos de mesmo sexo apresentaram as duas condições, no mesmo gel. Essas variações podem ser resultantes de diferenças individuais reais, não dependentes do

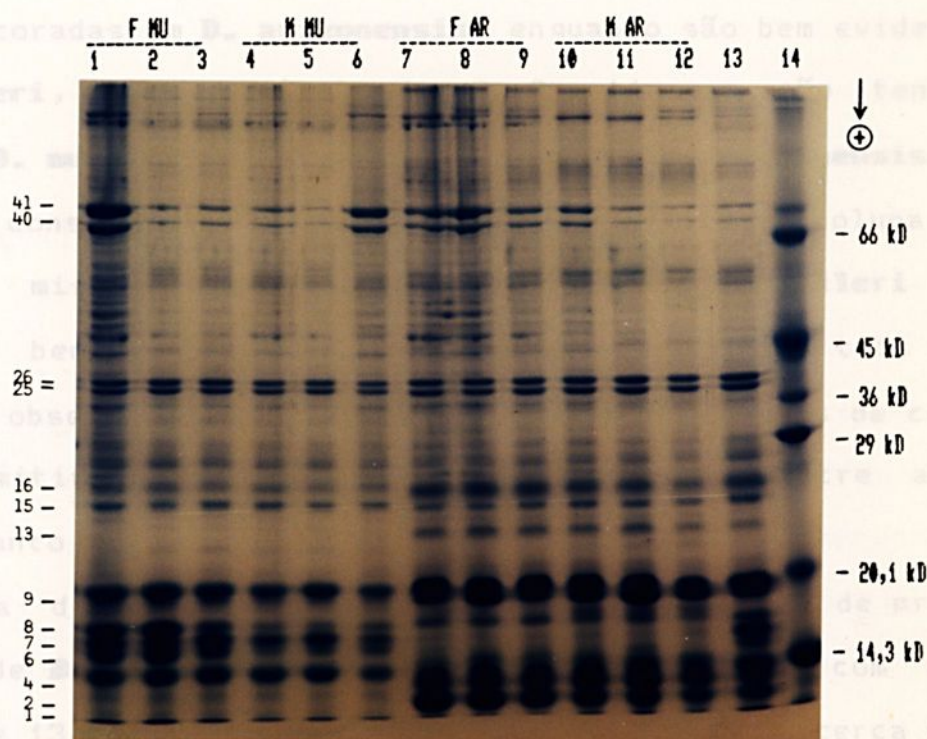


Figura 18. Padrões de bandas de proteínas de larvas de 3º estágio tardio de *D. mulleri* (MU) e *D. arizonensis* (AR), incubadas por uma hora a 20°C e separadas em SDS-PAGE a 10%. 1-3 e 4-6, fêmeas (F) e machos (M) de *D. mulleri*; 7-9 e 10-12 fêmeas (F) e machos (M) de *D. arizonensis*; 13 mistura de fêmeas *D. mulleri* e *D. arizonensis*; 14 padrão de P.M. Os números das principais bandas citadas no texto estão indicadas à esquerda do gel.

sexo, ou de diferenças na quantidade total de proteína aplicada no gel, de diferentes larvas, o que seria então um artefato de técnica. Contudo, tendo em vista que outras bandas mantêm a mesma intensidade de coloração em todos os indivíduos, acreditamos que a primeira situação seja a mais provável.

Diferença quanto à intensidade de coloração pode ser observada na comparação entre os padrões das duas espécies, quanto às bandas de baixo peso molecular 1, 6, 7 e 8, que aparecem tenuamente coradas em *D. arizonensis*, enquanto são bem evidenciadas em *D. mulleri*, e quanto às bandas 2, 9 e 16 que são tenuamente coradas em *D. mulleri* e fortemente coradas em *D. arizonensis*. Essa diferença é constante em todos os géis. Além disso, a coluna 13 que contém uma mistura do material de fêmeas *D. mulleri* e *D. arizonensis*, bem como outras bandas das duas espécies, tais como a 15, 25 e 26, observáveis na Figura 18, constituem formas de controle para se admitir que se trata de uma diferença real entre as duas espécies, quanto à produtividade desses polipeptídeos.

Uma diferença interespecífica entre o padrão de proteínas das larvas de *D. mulleri* e *D. arizonensis* é observada com relação às bandas 4 e 13, respectivamente de peso molecular de cerca de 14 e 22,4 kilodaltons (kD), presentes em larvas de *D. arizonensis* e ausentes em *D. mulleri*. Essas bandas podem ser utilizadas como marcadores das larvas de *D. arizonensis*. Assim, no total, *D. mulleri* apresentou aproximadamente 48 bandas, enquanto *D. arizonensis* aproximadamente 50.

Para melhor caracterizar essas bandas diferenciais, dos géis a 10%, determinamos o peso molecular aproximado das proteínas correspondentes a elas, com base na migração relativa das

proteínas-padrão de peso molecular conhecido (MATERIAIS E MÉTODOS - Figura 1). Desse modo, os resultados mostraram que essas bandas apresentam, aproximadamente, os seguintes pesos moleculares: banda 1= 13, 2= 13,5, 6= 15,4, 7= 16,2, 8= 17,4, 9= 18, 13= 22,4, 15= 24,5, 16 = 26,3, 25 = 38 e 26 = 38,9 kD.

A Figura 19 contém um esquema dos padrões observados nas duas espécies, destacando através de setas e pontas de seta, as diferenças mencionadas.

Como outra forma de avaliação, além do exame direto dos géis, a Figura 20 apresenta a análise densitométrica dos padrões de proteínas de larvas de *D. mulleri*, *D. arizonensis* e de amostras reunidas das duas espécies, a 20°C.

Os resultados confirmam as observações já descritas. Foram observadas diferenças qualitativas e presumivelmente quantitativas entre as duas espécies e não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas da mesma espécie. As diferenças interespecíficas referem-se à exclusividade das bandas 4 e 13 em *D. arizonensis*. Com relação às diferenças quantitativas, elas são evidentes em algumas bandas de baixo peso molecular (até a banda 16). As demais bandas (a partir da banda 17) são sujeitas a grande variabilidade individual nas duas espécies, razão pela qual não foram analisadas quantitativamente.

Não foram observadas diferenças nos padrões dos indivíduos submetidos a aquecimento e resfriamento, comparando-se com o padrão, pela observação direta dos géis ou por densitometria. Por essa razão, decidimos utilizar géis em gradiente linear de 7 a 15% de concentração, na tentativa de observar algum efeito do choque de temperatura sobre a expressão das proteínas.

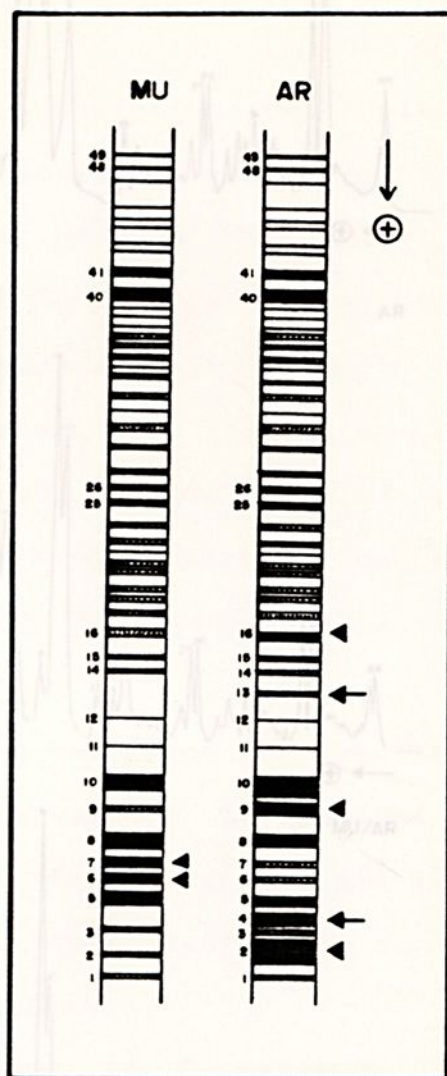


Figura 19. Esquema dos padrões de bandas de proteínas observados em larvas de 3º estágio tardio de *D. mulleri* (MU) e *D. arizonensis* (AR), obtidos em SDS-PAGE a 10%. As setas indicam bandas específicas de *D. arizonensis*; as pontas de setas indicam bandas comuns a ambas as espécies, porém com intensidade de coloração diferentes. Os números à esquerda referem-se às principais bandas.

Figura 20. Densitometria dos padrões de bandas de proteínas de larvas de 3º estágio tardio de *D. mulleri* (MU), *D. arizonensis* (AR) e da mistura *D. mulleri*/*D. arizonensis*. As larvas foram incubadas a 20°C, por uma hora e analisadas em SDS-PAGE a 10%. Os picos foram numerados a partir das bandas de maior migração no gel.

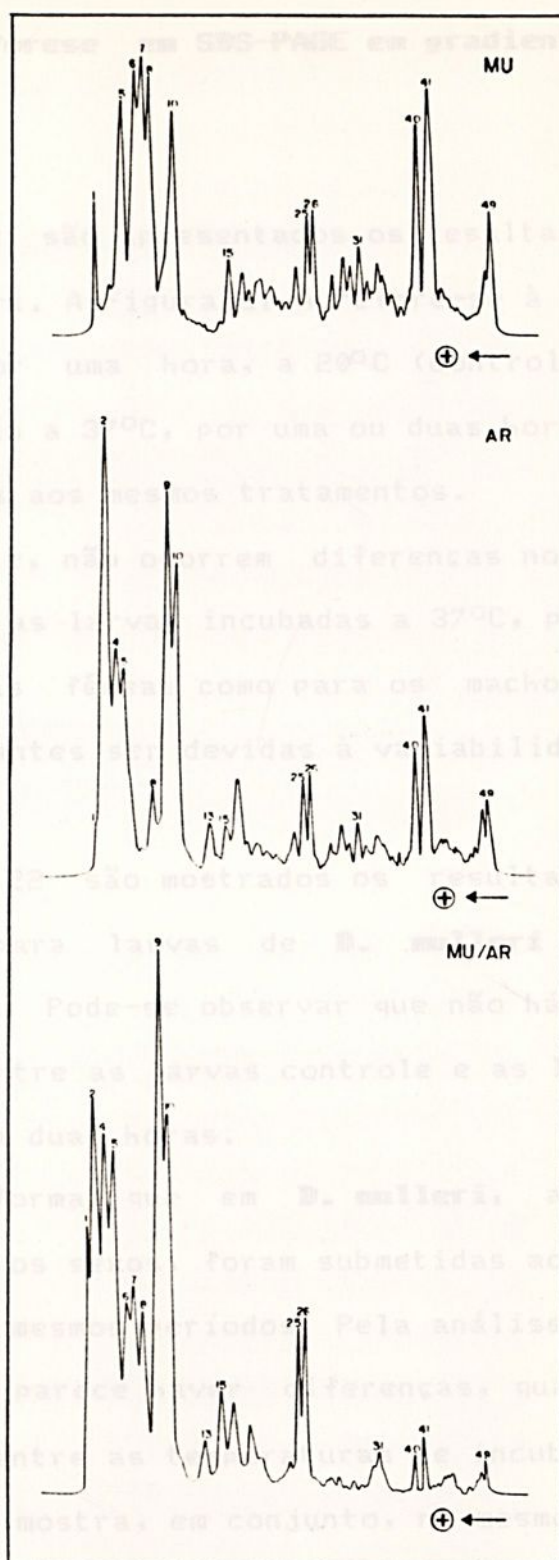


Figura 20. Densitometria dos padrões de bandas de proteínas de larvas de 3º estágio tardio de *D. mulleri* (MU), *D. arizonensis* (AR) e da mistura *D. mulleri*/*D. arizonensis*. As larvas foram incubadas a 20°C, por uma hora e analisadas em SDS-PAGE a 10%. Os picos foram numerados a partir das bandas de maior migração no gel.

3.2. Eletroforese em SDS-PAGE em gradiente linear de 7 a 15%

Na Figura 21 são apresentados os resultados obtidos, para larvas de *D. mulleri*. A Figura 21 A refere-se à eletroforese de fêmeas incubadas, por uma hora, a 20°C (controle) e de fêmeas submetidas à incubação a 37°C, por uma ou duas horas e, a Figura 21 B, a machos submetidos aos mesmos tratamentos.

Aparentemente, não ocorrem diferenças no padrão de bandas entre o controle e as larvas incubadas a 37°C, por uma ou duas horas, tanto para as fêmeas como para os machos. As variações encontradas parecem antes ser devidas à variabilidade individual do que aos tratamentos.

Na Figura 22 são mostrados os resultados obtidos nas mesmas condições para larvas de *D. mulleri* submetidas ao resfriamento a 10°C. Pode-se observar que não há diferenças, em fêmeas e machos, entre as larvas controle e as larvas que foram resfriadas por uma ou duas horas.

Da mesma forma que em *D. mulleri*, as larvas de *D. arizonensis*, de ambos os sexos, foram submetidas ao aquecimento e ao resfriamento, pelos mesmos períodos. Pela análise dos géis dessa espécie, também não parece haver diferenças, quanto aos padrões, entre os sexos e nem entre as temperaturas de incubação.

A Figura 23 mostra, em conjunto, no mesmo gel, o padrão de proteínas de fêmeas *D. mulleri* e machos *D. arizonensis*, submetidas à incubação a 10°C, a 20°C e a 37°C. Mostra ainda, os resultados obtidos para os híbridos, também submetidos às três temperaturas. O gel, nessa Figura, evidencia diferenças entre os padrões das duas

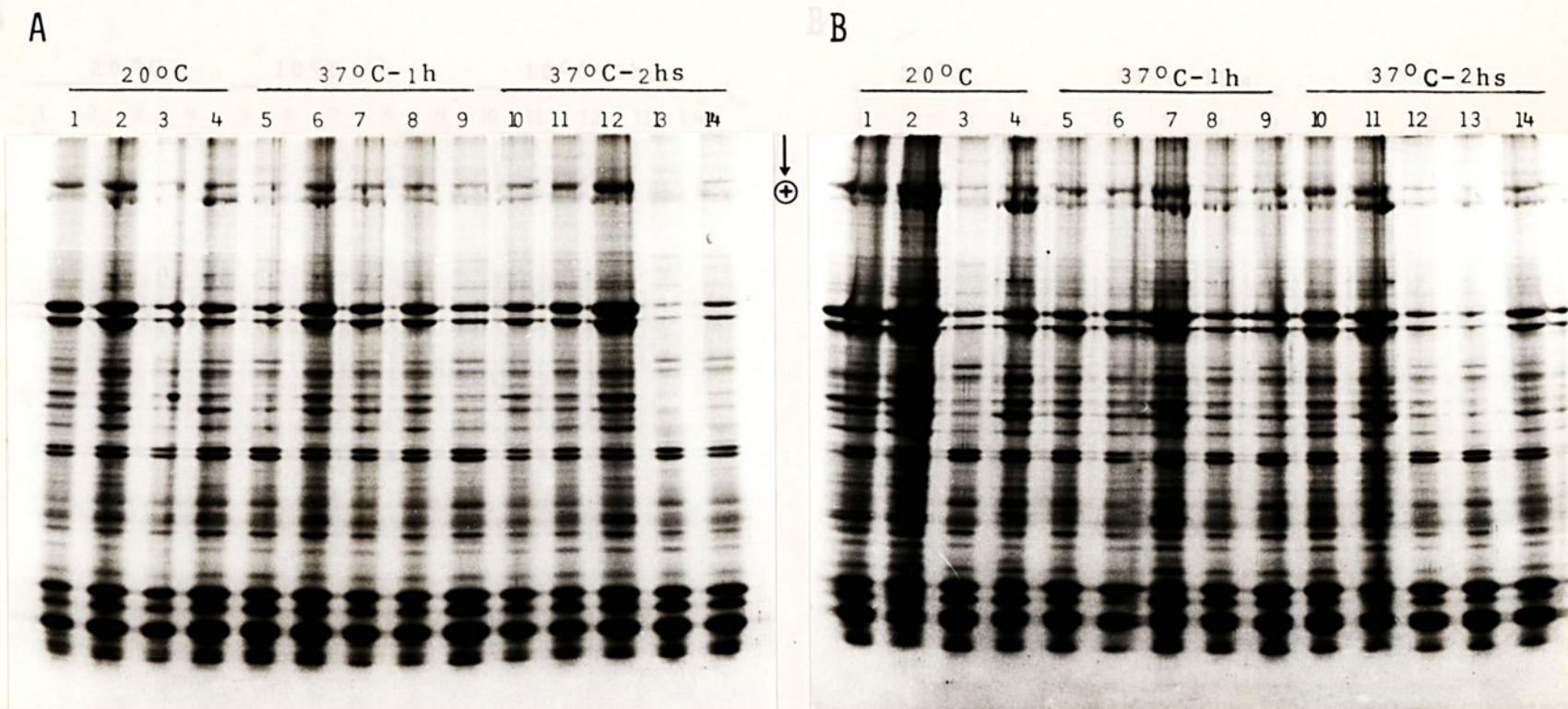


Figura 21 A, B. Padrões de bandas de proteínas de larvas de 3º estágio tardio de fêmeas (A) e machos (B) de *D. mulleri*, submetidas ao choque térmico a 37°C e analisadas em SDS-PAGE, em gradiente de 7 a 15%. Em A e B : 1-4, controle (20°C); 5-9, incubação a 37°C, por uma hora; 10-14, incubação a 37°C, por duas horas.

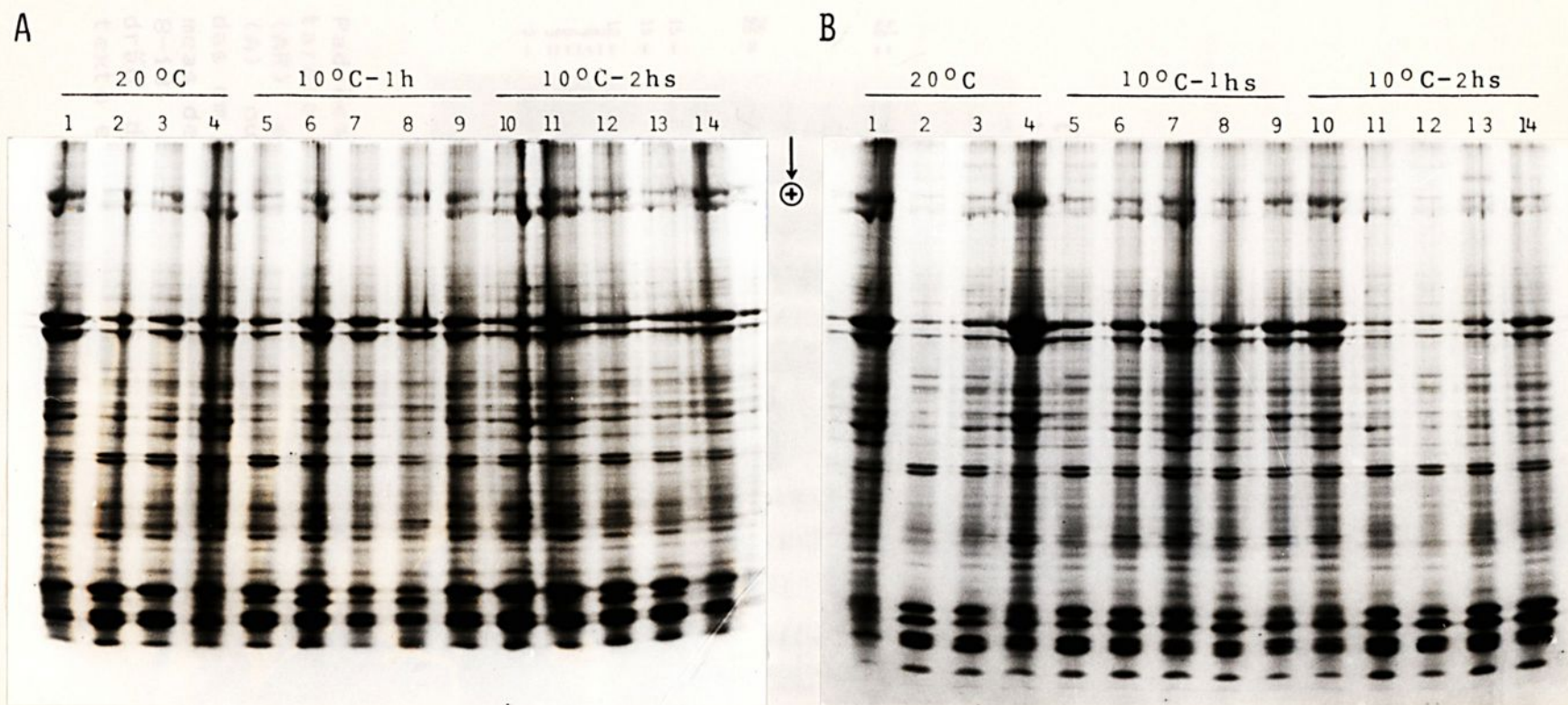


Figura 22 A, B. Padrões de bandas de proteínas de larvas de 3º estágio tardio de fêmeas (A) e machos (B) de *D. mulleri*, submetidas ao choque térmico a 10°C e analisadas em SDS-PAGE, em gradiente de 7 a 15%. Em A e B : 1-4, controle (20°C); 5-9, incubação a 10°C, por uma hora; 10-14, incubação a 10°C, por duas horas.

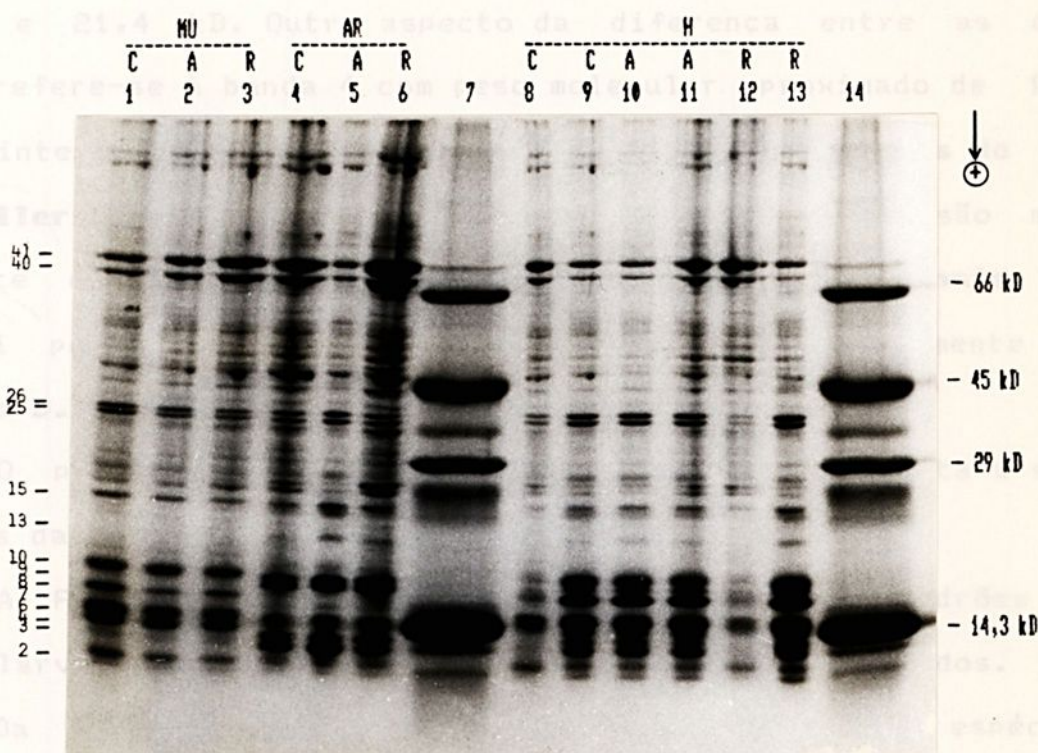


Figura 23. Padrões de bandas de proteínas de larvas de 3º estágio tardio de fêmeas *D. mulleri* (MU), machos *D. arizonensis* (AR) e híbridos (H), submetidas ao aquecimento a 37°C (A) ou resfriamento a 10°C (R), por uma hora, e analisadas em SDS-PAGE, em gradiente de 7 a 15%. 1-3, larvas fêmeas de *D. mulleri*; 4-6, larvas machos de *D. arizonensis*; 8-13, larvas híbridas sem distinção de sexo; 7 e 14, padrão de P.M. Os números das principais bandas citadas no texto estão à esquerda do gel.

espécies, quanto à presença ou ausência de algumas bandas, e quanto à intensidade de coloração. Essas diferenças entre as duas espécies, nesse gel em gradiente, da mesma maneira que no gel a 10%, referem-se às bandas de baixo peso molecular.

Pela análise das amostras controle, *D. mulleri* apresentou com exclusividade, a banda 6 com peso molecular aproximado de 17 kD, e em *D. arizonensis*, foram detectadas exclusivamente as bandas 3, 7, 9 e 13 com, respectivamente, pesos moleculares de cerca de 15,5, 17,8, 20 e 21,4 kD. Outro aspecto da diferença entre as duas espécies refere-se à banda 4 com peso molecular aproximado de 15,9 kD, cuja intensidade de coloração é maior em *D. arizonensis* do que em *D. mulleri*. Por outro lado, as bandas 2, 8 e 10 são mais intensamente coradas em *D. mulleri* do que em *D. arizonensis*. No total, foi possível computar, em *D. mulleri* aproximadamente 49 bandas e em *D. arizonensis*, 51.

O padrão de bandas dos híbridos a 20°C, representa a soma dos padrões das duas espécies, totalizando 52 bandas.

A Figura 24 apresenta a densitometria dos padrões de bandas de larvas mantidas a 20°C, das duas espécies e híbridos.

Da mesma forma como já havia sido observado nas espécies parentais, nos híbridos também não foram encontradas diferenças quanto ao padrão de bandas, nas três temperaturas de incubação.

Portanto, nos dois tipos de géis é possível verificar que as duas espécies se diferenciam pela presença de bandas exclusivas ou pela diferença de intensidade de coloração. Os choques de temperatura, tanto nas espécies parentais como nos híbridos, não acrescentaram diferenças nos padrões eletroforéticos.

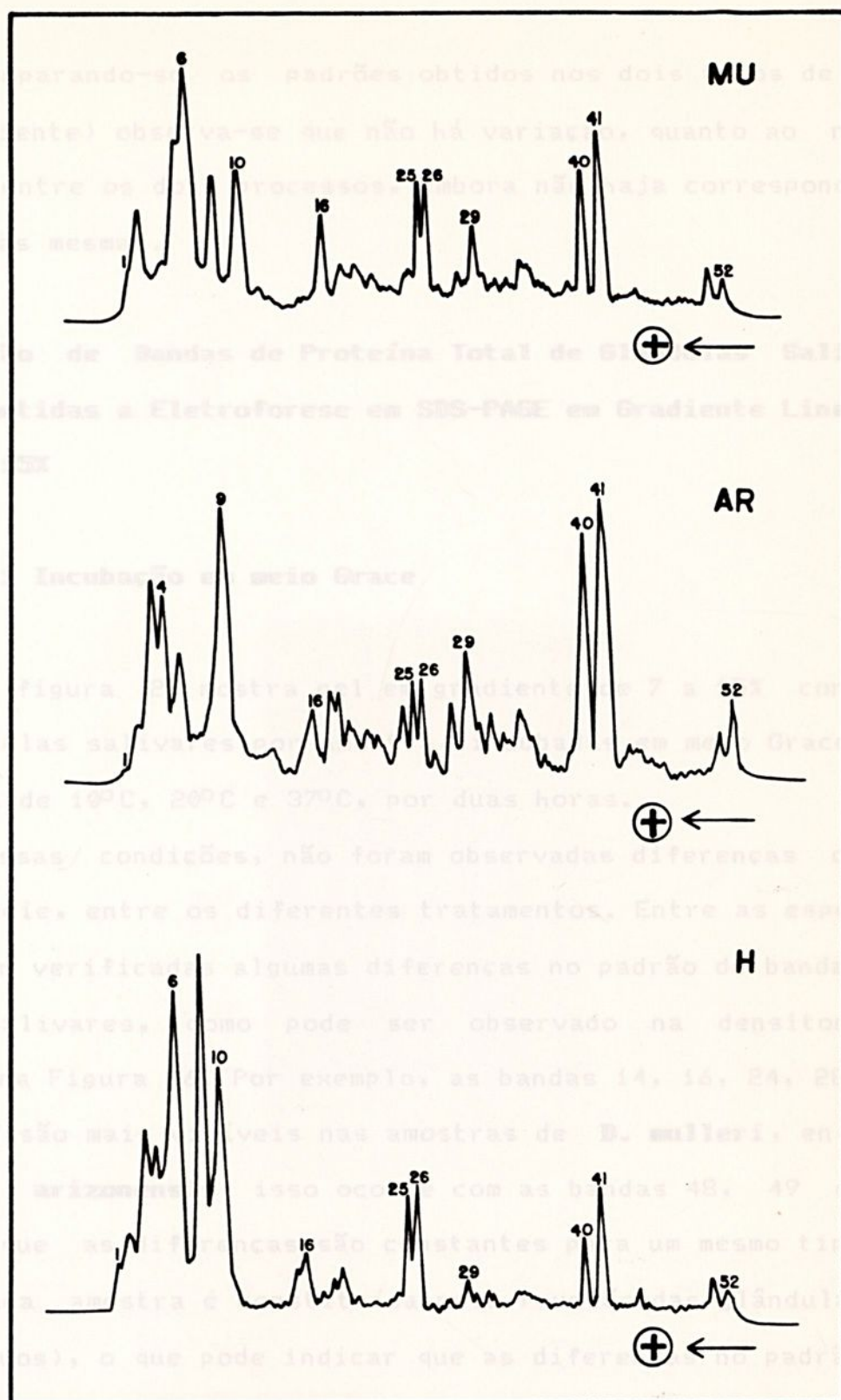


Figura 24. Densitometria dos padrões de bandas de proteínas de larvas de 3º estágio tardio de **D. mulleri** (MU), **D. arizonensis** (AR) e híbridos (H). As larvas foram incubadas a 20°C, por uma hora e analisadas em SDS-PAGE em gradiente de 7 a 15%. Os picos foram numerados a partir das bandas de maior migração no gel.

Comparando-se os padrões obtidos nos dois tipos de géis (10% e gradiente) observa-se que não há variação, quanto ao número de bandas, entre os dois processos, embora não haja correspondência total entre as mesmas.

4. Padrão de Bandas de Proteína Total de Glândulas Salivares Submetidas a Eletroforese em SDS-PAGE em Gradiente Linear de 7 a 15%

4.1 Incubação em meio Grace

A figura 25 mostra gel em gradiente de 7 a 15% contendo vinte glândulas salivares por amostra, incubadas em meio Grace, nas temperaturas de 10°C, 20°C e 37°C, por duas horas.

Nessas condições, não foram observadas diferenças dentro de cada espécie, entre os diferentes tratamentos. Entre as espécies, porém, foram verificadas algumas diferenças no padrão de bandas das glândulas salivares, como pode ser observado na densitometria apresentada na Figura 26. Por exemplo, as bandas 14, 16, 24, 28, 30, 42, 45 e 57 são mais visíveis nas amostras de *D. mulleri*, enquanto que em *D. arizonensis* isso ocorre com as bandas 48, 49 e 55. Observa-se que as diferenças são constantes para um mesmo tipo de amostra (cada amostra é constituída pela reunião das glândulas de dez indivíduos), o que pode indicar que as diferenças no padrão de proteínas das glândulas dessas espécies retratam diferenças genéticas realmente existentes entre elas.

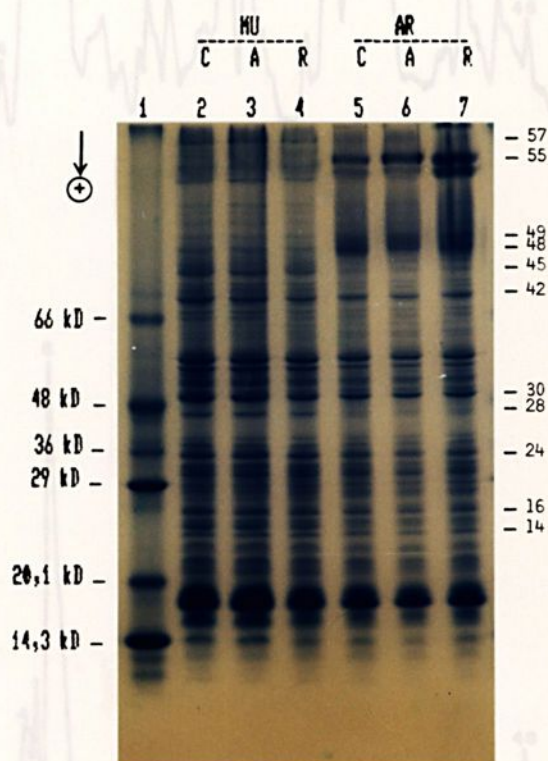


Figura 25. Padrões de bandas de proteínas de glândulas salivares de larvas fêmeas de 3º estágio tardio de *D. mulleri* (MU) e *D. arizonensis* (AR), incubadas em meio Grace a 20°C (C), 37°C (A) ou a 10°C (R), e separadas em SDS-PAGE, em gradiente de 7 a 15%. A coluna 1 apresenta os padrões de P.M. Os números à direita do gel correspondem às bandas que mostram diferenças entre as espécies.

Figura 26. Densitometria dos padrões de bandas de proteínas de glândulas salivares de larvas de 3º estágio de *D. mulleri* (MU) e *D. arizonensis* (AR) incubadas a 20°C, e analisadas em SDS-PAGE em gradiente de 7 a 15%. Os picos foram numerados a partir das bandas de maior migração no gel.

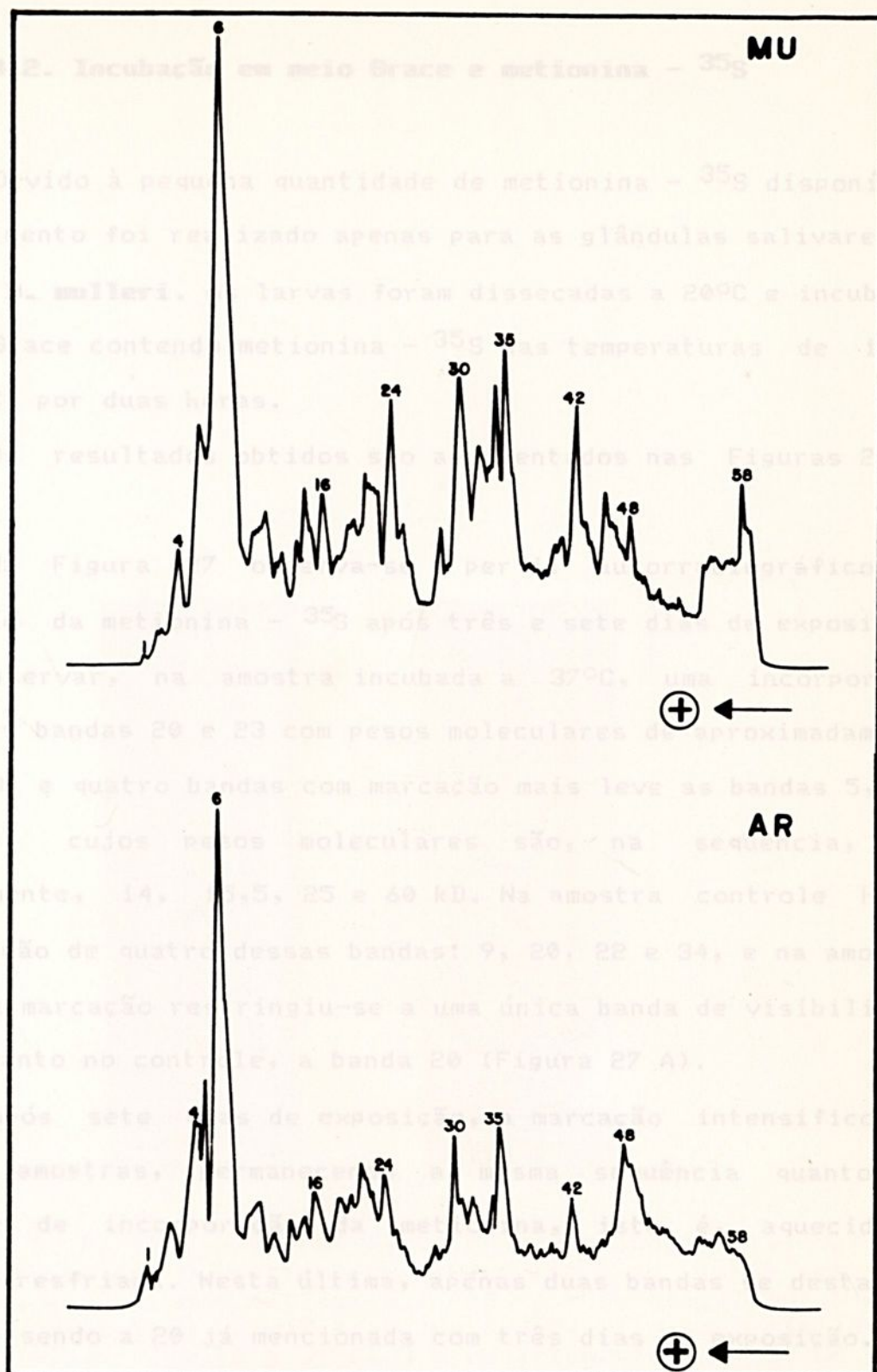


Figura 26. Densitometria dos padrões de bandas de proteínas de glândulas salivares de larvas de 3º estágio de ***D. mulleri*** (MU) e ***D. arizonensis*** (AR) incubadas a 20°C, e analisadas em SDS-PAGE em gradiente de 7 a 15%. Os picos foram numerados a partir das bandas de maior migração no gel.

4.2. Incubação em meio Grace e metionina - ^{35}S

Devido à pequena quantidade de metionina - ^{35}S disponível, este experimento foi realizado apenas para as glândulas salivares de larvas de *M. mulleri*. As larvas foram dissecadas a 20°C e incubadas em meio Grace contendo metionina - ^{35}S nas temperaturas de 10°C , 20°C e 37°C , por duas horas.

Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 27 e 28.

Na Figura 27 observa-se o perfil autorradiográfico de incorporação da metionina - ^{35}S após três e sete dias de exposição. Pode-se observar, na amostra incubada a 37°C , uma incorporação intensa nas bandas 20 e 23 com pesos moleculares de aproximadamente 22 e 27 kD, e quatro bandas com marcação mais leve as bandas 5, 9, 22 e 34, cujos pesos moleculares são, na sequência, de aproximadamente, 14, 15,5, 25 e 60 kD. Na amostra controle houve leve marcação de quatro dessas bandas: 9, 20, 22 e 34, e na amostra resfriada a marcação restringiu-se a uma única banda de visibilidade tão leve quanto no controle, a banda 20 (Figura 27 A).

Após sete dias de exposição, a marcação intensificou-se nas três amostras, permanecendo a mesma sequência quanto à intensidade de incorporação da metionina, isto é, aquecida > controle > resfriada. Nesta última, apenas duas bandas se destacam, a 9 e a 20, sendo a 20 já mencionada com três dias de exposição.

A banda 20 é a que apresenta a mais intensa incorporação em *M. mulleri* aquecida. Nessa amostra também se destacam outras cinco bandas: 5, 9, 22, 23, e 34. As bandas 7, 13, 15, 17, 24, 26, 28 e 32 (respectivamente, com pesos moleculares aproximados de 15,



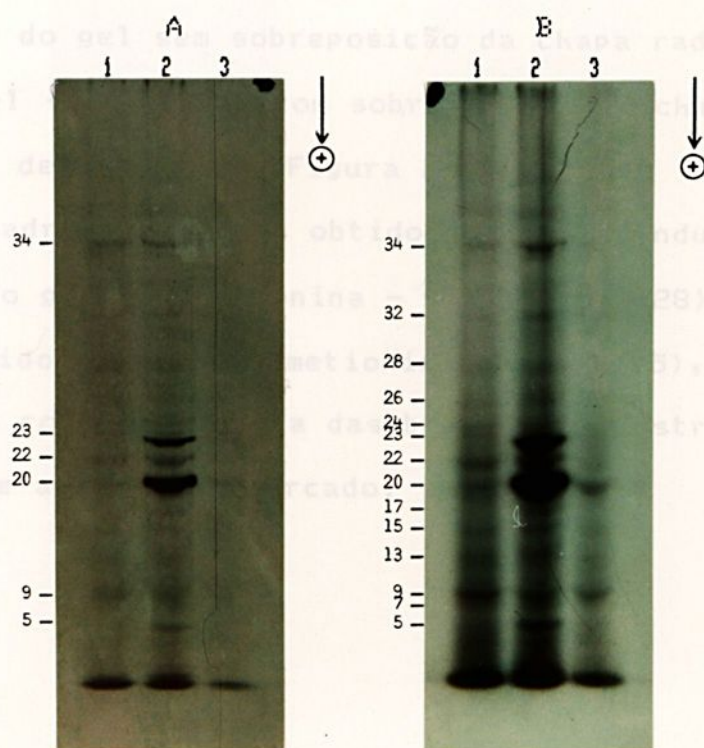


Figura 27 A, B. Perfil autorradiográfico de glândulas salivares de larvas de *D. mulleri* incubadas por duas horas em meio Grace contendo metionina - ^{35}S . A - exposição por 3 dias. B - exposição por 7 dias. Em A e B, 1 = controle (20°C), 2 = aquecimento a 37°C , 3 = resfriamento a 10°C . Os números das bandas citadas no texto estão indicadas à esquerda do gel.

18,6, 21, 21,3, 28, 31,6, 35,5 e 44,6 kD) também aparecem marcadas nessa amostra submetida ao aquecimento, sendo a marcação tênue em comparação com as cinco primeiras bandas. As bandas 5, 17, e 23 aparecem exclusivamente na amostra aquecida. Na amostra controle pode-se observar, na banda 9, uma marcação aparentemente mais intensa do que na amostra aquecida, e cinco bandas levemente marcadas, a 13, 15, 20, 22 e 34.

Para melhor evidenciar quais são as bandas que se destacam pela incorporação da metionina - ^{35}S , a Figura 28 apresenta uma fotografia do gel sem sobreposição da chapa radiográfica (Figura 28 A) e do gel fotografado com sobreposição da chapa radiográfica, após sete dias de exposição (Figura 28 B).

O padrão de bandas obtido para as glândulas salivares de *M. mulleri*, no gel com metionina - ^{35}S (Figura 28), não corresponde ao padrão obtido no gel sem metionina (Figura 25), o que dificulta estabelecer a correspondência das bandas que mostram a incorporação destacada desse aminoácido marcado.

Figura 28 A, B. Padrões de bandas de proteínas de glândulas salivares de larvas de *M. mulleri* incubadas em meio Grace contendo metionina - ^{35}S e separadas em SDS-PAGE, em gradiente de 7 a 15% (A), e perfil autorradiográfico obtido após 7 dias de exposição, sobreposto ao padrão de bandas (B). Em A e B, 1 = controle (20°C), 2 = aquecimento a 37°C, 3 = resfriamento a 10°C. Observar em B as diferenças dos perfis autorradiográficos quando as glândulas foram submetidas ao aquecimento (2) e ao resfriamento (3). Os números à esquerda do gel referem-se às principais bandas.

IV. DISCUSSÃO

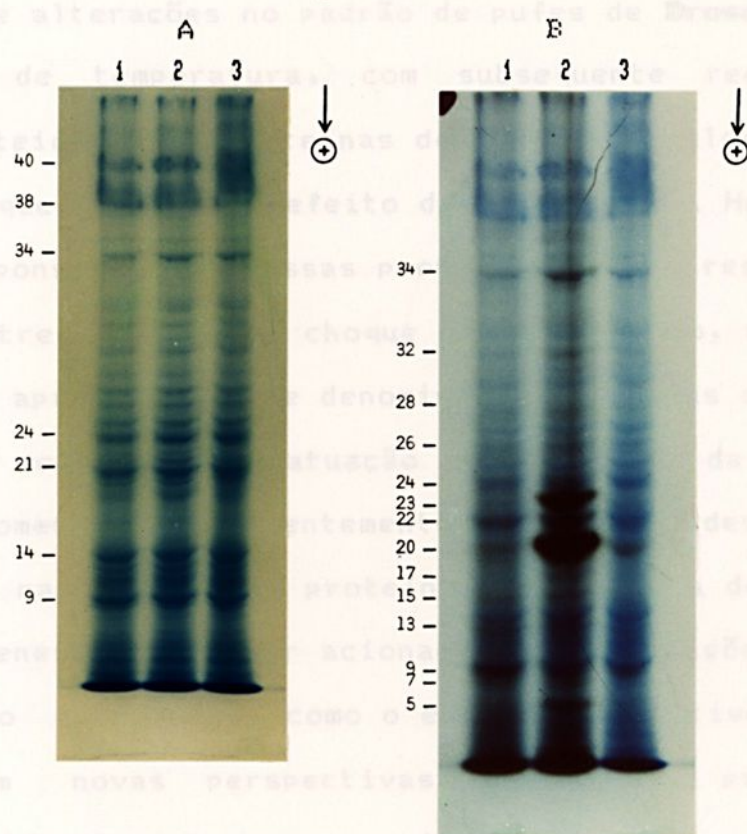


Figura 28 A, B. Padrões de bandas de proteínas de glândulas salivares de larvas de *D. mulleri* incubadas em meio Grace contendo metionina - ^{35}S e separadas em SDS-PAGE, em gradiente de 7 a 15% (A), e perfil autorradiográfico obtido após 7 dias de exposição, sobreposto ao padrão de bandas (B). Em A e B, 1 = controle (20°C), 2 = aquecimento a 37°C , 3 = resfriamento a 10°C . Observar em B as diferenças dos perfis autorradiográficos quando as glândulas foram submetidas ao aquecimento (2) e ao resfriamento (3). Os números à esquerda do gel referem-se às principais bandas.

IV. DISCUSSÃO

A revisão da literatura indica que todos os organismos são, possivelmente, dotados de um conjunto de genes capazes de lhes permitir tolerar, dentro de certos limites, alguns tipos de estresse ambiental. O conhecimento desses genes derivou, inicialmente, da observação de alterações no padrão de pufes de *Drosophila*, causadas por choque de temperatura, com subsequente reconhecimento de produtos proteicos - as proteínas de choque de calor - vinculados a novos pufes que surgem sob efeito desse estresse. Hoje, sabe-se que os genes responsáveis por essas proteínas também respondem a outros tipos de estresse, além do choque de aquecimento, razão pela qual elas são mais apropriadamente denominadas proteínas de estresse.

Os mecanismos de atuação e de controle da síntese dessas proteínas começaram, recentemente, a ser desvendados. Seu envolvimento nas interações proteína-proteína e a descoberta de que os mesmos genes podem ser acionados em condições de estresse ambiental tão diferentes, como o estresse oxidativo e o choque de calor, abrem novas perspectivas quanto ao papel protetor, extremamente importante, dessas proteínas.

No presente trabalho, algumas observações sobre o desenvolvimento e sobrevivência, de *D. mulleri* e *D. arizonensis*, sob tratamento contínuo às temperaturas experimentais, mostraram que a fase do desenvolvimento em que esse tratamento se inicia é importante na resposta do organismo. Nas condições deste experimento, a temperatura de 10°C inibiu inteiramente a progressão do desenvolvimento, qualquer que tenha sido a fase de início do tratamento, exceto para larvas de 3º estágio tardio. Já o

aquecimento, a partir de larvas de 2º estágio permitiu uma progressão do desenvolvimento para a fase seguinte, sendo que, no tratamento de larvas de 3º estágio o desenvolvimento chegou a pupa jovem. Quanto à sobrevivência, porém, foi maior quando o tratamento se iniciou em fases precoces do desenvolvimento larval e menor nas fases mais adiantadas, para ambas as temperaturas e espécies. Não foram observadas diferenças entre as duas espécies analisadas. Nos indivíduos que sobreviveram, foi possível observar que o desenvolvimento a 10°C é mais lento e a 37°C mais rápido em comparação com o desenvolvimento a 20°C, usado como controle.

A literatura mostra que o estudo do efeito do resfriamento, sobre os organismos, tem sido menos intenso do que o do efeito do aquecimento. Em geral esse estudo tem focalizado adaptações estacionais em condições de inverno, depois de semanas ou meses de exposição a baixas temperaturas. Muitos insetos respondem à aproximação do inverno entrando em diapausa e fazendo ajustes fisiológicos que aumentam sua capacidade de tolerar as baixas temperaturas. Em muitas espécies, essa preparação geralmente envolve a acumulação gradual de um crioprotetor como glicerol e outros álcoois polihídricos e açúcares de baixo peso molecular (pequena revisão em LEE et al. (1987).

O estudo de LEE et al. (1987) verificaram que o acúmulo de glicerol, pode também ser uma resposta rápida em insetos fora da diapausa, contra choques de frio. Os autores sugeriram que interações específicas entre o glicerol e outros componentes celulares podem ser de importância crítica. Entre elas citam a possibilidade de alterar a natureza das transições de fase dos lipídios da membrana durante o resfriamento e assim proteger contra o choque de frio. Os



autores citam como reforço à sua idéia, o fato de que a capacidade de acumulação rápida de glicerol em resposta à exposição a baixas temperaturas foi observada em diversos insetos filogeneticamente diferentes. A exposição do corpo-gorduroso do inseto ao frio, *in vivo* e *in vitro*, causa a ativação da fosforilase para a forma a, a qual cataliza a quebra rápida do glicogênio e a acumulação do glicerol. A resposta é evidente, por exemplo, 10 minutos após exposição a 0°C, na pupa do bicho da seda. Esse mecanismo protegeria os insetos contra mudanças diurnas na temperatura e os tornaria capazes de sobreviver a breves períodos de exposição a baixas temperaturas.

Entre os trabalhos sobre o efeito do frio, há também o de FUKATAMI (1984) que submeteu *M. lutescens* e *M. takahashii*, duas espécies muito próximas, a temperaturas de -3°C, em diferentes fases do desenvolvimento, computando a porcentagem de ovos eclodidos, de larvas e adultos obtidos e a sobrevivência dos adultos. Foi observado que a primeira espécie é mais resistente ao frio que a segunda, mas, em ambas, o grau de tolerância ao frio foi observado na seguinte ordem: pupa > ovos > larvas. Adultos mais velhos de *M. takahashii* apresentaram maior sensibilidade ao frio do que os adultos jovens, mas *M. lutescens* pouco variou sob esse aspecto. O estudo de híbridos mostrou que os genes relevantes na tolerância ao frio podem estar distribuídos nos cromossomos sexuais e autossomos. As diferenças observadas, entre as duas espécies, na resistência ao frio, de acordo com o autor pode estar relacionada com a distribuição de *M. lutescens* na região norte das ilhas do Japão, em contraste com a distribuição de *M. takahashii* que é limitada à região sul.

Também híbridos de *D. virilis* (oriunda de regiões temperadas), *D. lummei* (de regiões boreais) e seus híbridos foram analisados quanto à tolerância a choque de frio a -10°C e a exposições mais prolongadas. *D. lummei* tolerou exposições 40 a 50% mais longas que *D. virilis*. A análise de híbridos de cruzamentos recíprocos permitiu verificar que a contribuição dos cromossomos é de três a quatro vezes maior que a do citoplasma, na resistência ao frio. Machos heterozigotos autossômicos, portadores de cromossomo X e citoplasma de *D. virilis* apresentaram a menor resistência ao frio (HEINO & LUMME, 1989).

Os resultados apresentados no presente trabalho por *D. mulleri* e *D. arizonensis* sugerem que elas são mais sensíveis ao frio do que as espécies de *Drosophila* utilizadas nos dois trabalhos mencionados, levando-se ainda em conta que as temperaturas neles utilizadas foram bem mais baixas. Assim, é possível que a aparente menor resistência ao frio de *D. mulleri* e *D. arizonensis* possa, estar relacionada à origem geográfica das linhagens utilizadas que é o México. Além disso, essas espécies são cactofílicas, o que por si só já sugere restrições às condições ambientais.

Alterações na temperatura constituem uma das principais variáveis ambientais. Entretanto, a compreensão da capacidade dos seres vivos se adaptarem a essas alterações é ainda um problema considerado complexo. A literatura contém trabalhos que mostram preferências espécie-específicas quanto à temperatura, bem como a capacidade dos animais em sobreviver sob diferentes temperaturas e sua correlação com genótipos alozímicos. Em *Drosophila*, o paralelismo entre a distribuição geográfica e a capacidade catalisadora, dependente da temperatura, de enzimas homólogas ou

aloenzimas foi também analisado (pequena revisão em ALAHOTIS & STEPHANOU, 1982). As informações mostram que há limites na capacidade de suportar variações de temperatura. A literatura sugere que esses limites estão relacionados provavelmente com mudanças na conformação das proteínas e nas propriedades de transporte das membranas (ALAHOTIS & STEPHANOU, 1982).

Stephanou et al. (1983) verificaram que a capacidade de linhagens de *M. melanogaster* sobreviver a estresse de calor correlaciona com a cinética da síntese proteica em órgãos submetidos ao tratamento, avaliada pela taxa de incorporação de metionina-³⁵S.

Como vimos na Introdução, o sistema de proteínas hsp's, que começa a ser sintetizado alguns minutos após o início do estresse de calor, reflete a presença de maquinaria genética atuante nessas condições e ocorre paralelamente a alterações no padrão de pufes. Em *M. melanogaster* foi demonstrado que o resfriamento também determina a síntese de hsp's (BURTON et al., 1988).

No presente trabalho, as preparações cromossômicas para estudo do efeito da temperatura foram feitas a partir de larvas tratadas sobre papel de filtro umedecido em Demerec ou a partir de glândulas submersas na solução de Demerec ou no meio Grace. A comparação da qualidade das preparações feitas nessas diferentes situações mostrou que a temperatura de 37°C provoca alterações cromossômicas mais acentuadas do que a temperatura de 10°C, quer as preparações sejam feitas a partir de glândulas ou larvas. Essas alterações abrangem modificações estruturais das bandas cromossômicas que adquirem um aspecto "vacuolizado" ou "desenovelado". O aquecimento dificulta também mais fortemente a

distensão dos cromossomos para análise; eles permanecem predominantemente no interior do núcleo. *pufes não foram encontrados*

A temperatura As preparações de glândulas salivares incubadas em meio Grace mostraram melhor qualidade que as de glândulas salivares incubadas em Demerec. Porém, as preparações feitas a partir de larvas incubadas em Demerec foram melhores do que as de glândulas salivares incubadas em meio Grace. Portanto, em grau de qualidade das preparações cromossômicas, observamos que larvas-Demerec > glândulas-Grace > glândulas-Demerec. *O resfriamento. Nesta última*

situação. O contato direto com o meio aquecido ou resfriado deve ter efeitos mais drásticos sobre as glândulas salivares do que no caso da larva tratada, na qual aquelas glândulas estão protegidas do efeito direto. Por outro lado, o meio Grace é destinado à cultura celular de insetos e, portanto, deve fornecer mais elementos necessários ao funcionamento normal das células das glândulas salivares do que a solução fisiológica de insetos, Demerec. *devida à*

presença A comparação entre as espécies mostrou que as preparações de *D. mulleri* tratadas foram melhores do que as de *D. arizonensis* tratadas. *foram observados.*

A análise do padrão de pufes sob efeito dos choques de temperatura restringiu-se ao cromossomo 2. Nesse cromossomo, *D. mulleri*, mostrou dois tipos de resposta ao aquecimento, em diferentes indivíduos, independentemente do meio de incubação, ou do tratamento de larva ou glândula. Um deles mostrou alteração de tamanho do pufe terminal distal do cromossomo 2. Esse pufe forma-se também no controle e sob resfriamento, mas sua área é consideravelmente maior nos indivíduos submetidos a aquecimento, nas duas espécies analisadas e nos híbridos. O outro tipo de resposta ao



aquecimento, observado exclusivamente em *M. mulleri*, envolveu o aparecimento de cinco novos pufes. Esses pufes não foram encontrados à temperatura controle e sob efeito de resfriamento. indica que sua

atividade Em *M. arizonensis*, as alterações morfológicas aparentemente abrangeram apenas o pufe terminal distal do cromossomo analisado. Nessa espécie, como em *M. mulleri*, o aquecimento, sob qualquer das condições experimentais utilizadas mostrou um aumento da área desse pufe, de aproximadamente o dobro ou mais que o dobro quando comparado com o controle ou o resfriamento. Nesta última situação, a área desse pufe foi aparentemente igual ou ligeiramente inferior à observada sob a temperatura controle. JER & LUSSEN, 1979;

PETERS. No que se refere aos híbridos, as observações mostraram um heteromorfismo do pufe terminal, decorrente de uma acentuada diferença de tamanho entre os pufes dos dois cromossomos, nas três temperaturas, mas mais acentuada a 37°C.

Quanto aos outros pufes, a sinapse complexa, devida à presença de inversões superpostas nesse cromossomo dos híbridos, dificulta o reconhecimento dos mesmos. Entretanto, aparentemente eles não foram observados. principal, e o pufe observado no presente

trabalho *M. hydei* é a espécie mais próxima das analisadas no presente trabalho, até agora estudadas quanto aos efeitos do choque de calor. Nela, o calor induz novos pufes em seis locos do genoma (BERENDES et al., 1965). Esse efeito não é o mesmo quando as glândulas isoladas são incubadas e quando há tratamento das larvas. Nas condições *in vitro*, aparecem pufes que não são observados nem nas larvas tratadas nem no controle, à mesma idade. São os pufes, e

permanece Quatro dos seis pufes observados em larvas de *M. hydei* sob choque de calor ocorrem a 25°C no desenvolvimento normal, na



formação do puparium, sendo porém menores que os induzidos experimentalmente. De acordo com BERENDES (1972) o fato de que esses pufes ocorrem também em condições normais indica que sua atividade deve ser relevante para o metabolismo da célula, em determinadas circunstâncias.

O estudo comparativo dos cromossomos do grupo repleta realizado por WASSERMAN (1954, 1962a, b) mostra que a extremidade distal do cromossomo 2 de *D. mulleri* e *D. arizonensis* corresponde morfológicamente à mesma região de *D. hydei*. Nessa região, esta última espécie mostra o pufe denominado 2-48B que é induzido à temperatura de 37°C (BERENDES, 1968; SONDERMEIJER & LUBSEN, 1979; PETERS et al., 1982) e o pufe 2-48C que é induzido *in vitro* e *in vivo* pelo calor (BERENDES, 1972) e pela vitamina B6 (LEENDERS et al., 1973). Ambos os pufes derivam, portanto, de bandas vizinhas, próximas à região telomérica.

No presente trabalho, a observação dos pufes foi restrita à microscopia óptica o que torna difícil estabelecer uma correspondência de localização entre os pufes observados em *D. hydei*, na extremidade terminal, e o pufe observado no presente trabalho em *D. mulleri* e *D. arizonensis*, apenas com base na observação das bandas. Entretanto, uma diferença que se estabelece entre estas duas espécies e a primeira, é que o pufe detectado no presente trabalho, está presente, em condições normais, em fases anteriores à formação do puparium. BICUDO (informação pessoal) verificou que esse pufe encontra-se presente desde a fase de larva de 2º estágio, quando é possível reconhecer o padrão de pufes, e permanece aberto até a fase de pré-pupa amarela, que é a fase final de observação dos cromossomos das glândulas salivares, abrangendo



provavelmente as duas bandas correspondentes a 48B e 48C.

De acordo com LUBSEN et al. (1978) a maior parte do RNA produzido no loco 2-48B permanece no núcleo, mas parte ocorre também no citoplasma. Este RNA poli-A está presente em baixa concentração e pode codificar para uma das proteínas menores de choque de temperatura (BELEW & BRADY, 1981).

Para RYSECK et al. (1987) o loco 2-48B de *D. hydei* e o 3-93D de *D. melanogaster*, ambos clonados e sequenciados, apresentam um padrão estrutural e transcricional comum, sugerindo para eles uma função conservada, embora desconhecida, nessas espécies bastante distantes evolutivamente. Para eles ambos os pufes não parecem codificar proteína mas são transcritos em uma série de RNAs diferentes. Ainda de acordo com os mesmos autores, o pufe 93D de *D. melanogaster* difere claramente do tipo comum de genes de choque de calor porque a maior parte de seus produtos de transcrição são retidos no núcleo e acumulam-se sob a forma de partículas gigantes de RNP (como acontece com o 2-48B), sendo que todas as espécies de *Drosophila* já estudadas apresentam um pufe como 93D. Assim, em *D. hydei* o pufe correspondente a 93D de *D. melanogaster* parece ser o 48B que nas espécies estudadas no presente trabalho, pela localização poderia corresponder ao pufe da extremidade distal do cromossomo 2.

Com relação aos outros pufes que aparecem em *D. mulleri* no 3º estágio tardio, sob efeito de aquecimento, BICUDO (informação pessoal) verificou que os mesmos são característicos da fase de pré-pupa branca, nas condições normais de desenvolvimento. Portanto, o aquecimento antecipa a síntese de produtos desses pufes, e com relação ao pufe da extremidade distal, parece apenas intensificar a



síntese local de produtos. *proteínas da maquinaria de resposta ao aquecimento* Pufes que ocorrem normalmente em certas fases do desenvolvimento, em geral, são os que respondem à ação do hormônio ecdisona ou hormônio da muda, presente nesses insetos (ASHBURNER, 1972b; BERENDES, 1972). *bandas nessas condições. Uma banda presente no controle* Algumas outras espécies foram bem estudadas quanto ao padrão de pufes, em condições de estresse pelo calor. Por exemplo, em *M. subobscura* a análise dos pufes como resposta ao efeito do aquecimento mostrou que alguns deles mantêm sua expressão, enquanto outros a aumentam e outros a reduzem (PASCUAL & FRUTOS, 1986). Em *M. guanche*, que é também membro do grupo *obscura* e bastante próxima de *M. subobscura*, o choque de calor induz um conjunto de quatro pufes que não aparecem durante o desenvolvimento normal. Um outro pufe que aparece ativo em outras fases do desenvolvimento, sob efeito do calor torna-se altamente ativo em fase em que não aparece, no desenvolvimento normal (MOLTÓ et al., 1987). Esse último pufe comporta-se, portanto, como os pufes a-e do cromossomo 2 de *M. mulleri* analisada no presente trabalho. *primário de RNA, e que o bloqueio* MOLTÓ et al. (1987) verificaram também que a resposta de *M. guanche* é mais acentuada à temperatura de 37°C que a 31°C, enquanto em *M. subobscura* ocorre o oposto, considerando assim, possível que *M. guanche* tolere melhor a temperatura mais alta que *M. subobscura* porque a primeira espécie é endêmica em regiões mais quentes, e a segunda é adaptada a ambientes frios. *celulares como a síntese* No presente trabalho, o estudo do padrão de síntese proteica em glândulas salivares incubadas em metionina - ³⁵S mostrou que em *M. mulleri* aquecida, há incorporação de metionina em três bandas que não apresentam incorporação a 20°C ou a 10°C. Devem,



portanto, corresponder a proteínas da maquinaria de resposta ao aquecimento. Por outro lado há bandas que estão marcadas à temperatura controle mas que apresentam marcação muito mais intensa sob aquecimento, devendo, portanto, corresponder a proteínas que são mais ativamente sintetizadas nessas condições. Uma banda presente no controle parece apresentar redução da marcação na amostra aquecida e neste caso deve corresponder a proteína cuja síntese sofre redução sob aquecimento. Essas observações mostraram a variabilidade das modificações que ocorrem na expressão gênica, sob ação do choque de calor, em *D. mulleri*.

O resfriamento, por sua vez, determina uma redução acentuada nos níveis de incorporação da metionina marcada na glândula salivar, em *D. mulleri*. Nessas condições, o padrão de incorporação, visualizado no gel submetido à autorradiografia mostra um número reduzido de bandas, isto é, apenas duas.

YOST & LINDQUIST (1986) observaram que em *Drosophila*, um choque de calor breve e elevado bloqueia o processamento das sequências interpostas do transcrito primário de RNA e que o bloqueio persiste por pelo menos duas horas depois do retorno das células à temperatura normal. Os autores sugeriram que o bloqueio da eliminação dos introns contribui para a letalidade causada pelo calor e que uma função das hsp's é proteger o processamento.

De acordo com PETERSEN et al. (1990) tanto o choque de calor como o de frio desligam importantes funções celulares como a síntese de proteínas, a síntese de RNAm e provavelmente o metabolismo energético. No choque de frio, porém, esses autores admitem que não ocorra a desnaturação proteica, considerada um dos mecanismos desencadeadores da indução da síntese de hsp's após

tratamento com calor. A literatura mostra que a resposta de síntese proteica, no caso de choque de frio, ocorre não durante o choque, mas sim durante a recuperação após o choque. Essa observação foi feita por exemplo por PETERSEN et al. (1990) que analisou a síntese de proteínas de estresse em tratamento prolongado de larvas de *Drosophila* a 0°C. Esses autores verificaram que o RNAm acumula-se não durante o tratamento, mas sim, quando as larvas estão retornando a 25°C. De acordo com esses autores, isto poderia ser devido a uma extrema redução das respostas metabólicas nessas temperaturas, ou a que algum tipo de dano celular deva ocorrer para desencadear a resposta. O presente trabalho, evidenciando o padrão de síntese de proteína total nas glândulas salivares altamente reduzido sob condições de choque de frio parece reforçar a primeira possibilidade. Nessas condições como também mencionamos, apenas as bandas 9 e 20 incorporaram a metionina - ^{35}S . Ambas as bandas também incorporam a metionina - ^{35}S sob condições de aquecimento e à temperatura controle, o que pode indicar que a síntese das proteínas correspondentes a essas bandas está "protegida" para atuar continuamente, em diferentes condições ambientais, sugerindo também um papel fundamental para as mesmas, na atividade celular.

É possível que a observação, no presente trabalho de um padrão extremamente baixo de incorporação de metionina - ^{35}S sob ação do frio seja devido à análise ter sido realizada ainda em condições de choque, e que se fosse realizada algum tempo após o mesmo, o padrão de marcação mostraria maior número de bandas marcadas. 40 e 41), no intervalo entre elas há uma variação

A síntese proteica mais intensa, no período de recuperação, em caso de tratamento pelo frio foi também observada em outros organismos. A mosca *Sarcophaga crassipalpis* submetida a um breve choque de resfriamento a -10°C ou -18°C no estágio de olho vermelho não chega à fase adulta, mas seu desenvolvimento prossegue até a emergência. Uma redução da taxa de consumo de oxigênio indica a ocorrência de dano ao organismo. A taxa de síntese proteica é lenta na primeira hora do choque, mas se recupera rapidamente. As hsp's de peso molecular 92 e 72 kD são expressas durante essa recuperação, sendo que a segunda é imunologicamente relacionada à família de proteína 70 de choque de calor em *D. melanogaster*, produzida nos locos 87A e 87C. Diferentes órgãos sintetizam diferentes proteínas na recuperação do choque de frio, nesse organismo (JOPLIN et al., 1990).

No presente trabalho foi possível obter alguns outros elementos na avaliação metodológica para o estudo do efeito do choque de temperatura. Por exemplo, a detecção do padrão total de proteínas que reflete o padrão de síntese nas condições de estresse estudadas, não pode ser avaliado sem uso de marcadores. Foi, porém, possível, detectar diferenças entre os indivíduos e as espécies sem o uso desses marcadores.

A comparação entre os dois tipos de géis utilizados, isto é, gel de concentração homogênea e gel em gradiente mostrou melhor definição das bandas no segundo tipo. Embora algumas bandas se mostrem bastante conservadas nos dois tipos de géis e possam assim ser consideradas bandas marcadoras das espécies analisadas (bandas 25, 26, 40 e 41), no intervalo entre elas há uma variação qualitativa, mas não quantitativa, das bandas. Isto fez com que no

gel em gradiente tenham sido detectadas uma banda exclusiva de *D. mulleri* e quatro bandas específicas de *D. arizonensis*, enquanto no gel a 10% foram observadas apenas duas bandas específicas de *D. arizonensis* e nenhuma de *D. mulleri*. Considerando-se que essas espécies são crípticas, esses resultados podem servir como mais um critério de diferenciação bioquímica entre elas, nessa fase do desenvolvimento (larva de terceiro estágio tardio). CERON (1988) verificou que *D. mulleri* e *D. arizonensis* diferenciam-se quanto ao padrão de esterases, havendo esterases específicas de uma ou outra espécie, que se manifestam especialmente na fase adulta.

Quanto à análise do padrão de bandas do gel em gradiente dos híbridos das duas espécies, verificou-se um padrão de herança predominantemente co-dominante, uma vez que correspondeu à soma dos padrões das espécies separadas.

Embora a metodologia utilizada, no presente trabalho não tenha permitido uma abordagem mais profunda, restringindo bastante as conclusões, entendemos que os resultados obtidos podem ser somados aos existentes na literatura, contribuindo para diferenciar biologicamente as duas espécies. Além disso, como vimos, os resultados que hoje existem em *Drosophila*, referentes aos efeitos de choques de temperatura, foram obtidos predominantemente em *D. melanogaster*, *D. simulans* e pequeno número de outras espécies entre as quais algumas do grupo obscura e uma do grupo repleta. Os resultados obtidos no presente trabalho abrem, portanto, perspectivas para uma abordagem do problema em outras espécies, no caso espécies do grupo repleta, que têm mostrado, em vários trabalhos (por exemplo, BICUDO & RICHARDSON, 1977; BICUDO, 1979), apresentar mecanismos biológicos e evolutivos interessantes relacionados com



processos de regulação gênica, os quais, como sabemos, constituem um dos pontos centrais em estudos dos efeitos do choque de temperatura.

Foram realizados tratamentos de choque de temperatura *in vivo* pela transferência de larvas da temperatura controle (20°C) para 37°C e 10°C ou *in vitro* utilizando glândulas salivares incubadas, às temperaturas de solução de Demerec ou meio Grace. As observações incluíam alguns aspectos do desenvolvimento e da taxa de sobrevivência, o padrão de ecdise e o crescimento. Os padrões de ecdise e o crescimento de larvas e glândulas salivares foram analisados em um sistema de SDS, homogêneo ou em gradiente, e glândulas salivares incubadas em metionina - 35S. Neste estudo foram utilizadas as espécies *B. mulleri*, *B. arizonensis* (*B. arizonensis*) e seus híbridos.

Observou-se que o choque de frio a 10°C inibiu o desenvolvimento dos estágios 1^o e 2^o de larvas e ovos a eclosão. Os estágios 1^o e 2^o de larvas e ovos não eclosaram. A taxa de sobrevivência dos estágios 1^o e 2^o de larvas foi maior para as larvas tratadas com choque de frio a 10°C do que para as larvas tratadas com choque de calor a 37°C . O desenvolvimento de larvas tratadas com choque de calor a 37°C foi mais rápido do que o das larvas tratadas com choque de frio a 10°C . A taxa de sobrevivência dos estágios 1^o e 2^o de larvas foi maior quando o tratamento foi realizado nos estágios mais precoces do desenvolvimento larval. Os resultados foram praticamente os mesmos nas duas espécies.

A baixa resistência ao choque de frio mostrada por *B. mulleri* e *B. arizonensis*, em comparação com as espécies estudadas na literatura, está possivelmente relacionada com a origem geográfica.



623/93

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram realizados tratamentos de choque de temperatura *in vivo* pela transferência de larvas da temperatura controle (20°C) para 37°C e 10°C ou *in vitro* utilizando glândulas salivares incubadas, às mesmas temperaturas, em solução de Demerec ou meio Grace. As observações incluíram alguns aspectos do desenvolvimento e da taxa de sobrevivência, o padrão de pufes do cromossomo 2 e o padrão de síntese de proteína total de larvas e glândulas salivares analisadas em gel de poliacrilamida - SDS, homogêneos ou em gradiente, e glândulas salivares incubadas em metionina - ^{35}S . Neste estudo foram utilizadas as espécies *M. mulleri*, *M. arizonensis* (*M. arizonae*) e seus híbridos.

Observou-se que o choque de frio a 10°C inibe o desenvolvimento quando aplicado a ovos e larvas de 1º, 2º e 3º estágio precoce, mas permite que larvas de 3º estágio tardio prossigam seu desenvolvimento até o estágio de puparium. A taxa de sobrevivência foi maior para as larvas tratadas no 1º e 2º estágio que para as tratadas no 3º estágio. Sob choque de calor, o desenvolvimento de larvas tratadas no 2º estágio ou no 3º estágio tardio prosseguiu, respectivamente, até o 3º estágio larval e a fase de pupa jovem. A taxa de sobrevivência sob choque de calor também foi maior quando o tratamento foi realizado nos estádios mais precoces do desenvolvimento larval. Os resultados foram praticamente os mesmos nas duas espécies.

A baixa resistência ao frio mostrada por *M. mulleri* e *M. arizonensis*, em comparação com outras espécies estudadas na literatura, está possivelmente relacionada com a origem geográfica



das linhagens analisadas (México) e a ocorrência dessas espécies em cactus.

A qualidade das preparações de glândulas salivares para análise cromossômica, em função da técnica utilizada, mostrou que glândulas de larvas tratadas em Demerec apresentam cromossomos menos alterados estruturalmente que glândulas incubadas em Demerec ou Grace, mas entre as duas últimas condições, a segunda é melhor que a primeira. Esses resultados, provavelmente, são devidos à condição de "proteção", contra a ação direta da temperatura, sobre a glândula salivar, que ocorre quando a larva é tratada. Por outro lado a glândula incubada em meio Grace, o qual se destina à cultura de tecidos de insetos, deve receber maior número de nutrientes importantes que quando incubada em solução fisiológica de Demerec.

Um ou seis pufes foram observados no cromossomo 2 de *M. mulleri* submetida a 37°C. O pufe que pode estar sozinho, ou não, localiza-se na extremidade distal. Esse pufe foi também observado no desenvolvimento normal, desde a fase de larva de 2º estágio até a fase de pupa jovem, sendo que, entre o choque de calor e o desenvolvimento normal, a diferença é aparentemente devida apenas ao maior tamanho do pufe sob a ação do calor. Os outros pufes que podem ocorrer, no cromossomo 2, sob ação do calor, na fase do 3º estágio tardio, foram previamente detectados, no desenvolvimento normal, na fase de puparium. Portanto, em *M. mulleri*, o choque de calor antecipa a atividade dos locos genéticos correspondentes a esses pufes, enquanto, aparentemente, apenas aumenta a atividade do loco genético da extremidade distal. Este último pufe mostrou o mesmo comportamento em *M. arizonensis* e híbridos submetidos a aquecimento, aparecendo também grandemente aumentado sob efeito do calor, em

comparação com o controle ou o choque de frio. Esse foi o único pufe observado em *D. arizonensis* e híbridos, no cromossomo 2, sob qualquer dos tratamentos e também o único observado em *D. mulleri* a 10°C e 20°C.

Quanto aos padrões de proteína total, os géis preparados a partir de glândulas sem incubação em metionina - ^{35}S não permitiram verificar diferenças entre os tratamentos, em qualquer das duas espécies, mas permitiram verificar diferenças entre os indivíduos e as espécies. A eletroforese, usando géis em gradiente, mostrou uma melhor definição das bandas que os géis homogêneos, embora o número de bandas tenha sido praticamente o mesmo nos dois tipos de géis. Nos géis em gradiente, foi possível ver quatro bandas exclusivas de *D. arizonensis* e uma banda exclusiva de *D. mulleri* enquanto no gel homogêneo foram observadas duas bandas exclusivas de *D. arizonensis* e nenhuma de *D. mulleri*. Como *D. mulleri* e *D. arizonensis* são consideradas espécies crípticas, esses resultados provavelmente podem ser usados como um critério bioquímico para diferenciá-las.

O padrão de bandas nos géis dos híbridos foi aparentemente o resultado da adição do padrão das duas espécies.

O padrão de bandas das glândulas salivares de *D. mulleri*, incubadas em metionina - ^{35}S e submetidas a choque de calor, mostrou três novas bandas, nenhuma delas presente a 10°C ou 20°C. Devem corresponder, portanto a proteínas cujos locos são ativados exclusivamente pelo calor. Outras bandas apareceram nos géis a 37°C e a 20°C, mas, apresentaram grau de incorporação da metionina mais elevado nos primeiros que nos segundos; devem, portanto, corresponder a proteínas mais intensamente expressas sob ação do calor. E, finalmente, uma banda presente a 37°C e 20°C mostrou maior

incorporação da metionina no controle que sob ação do calor, sugerindo tratar-se de proteína cuja expressão é reduzida sob efeito do calor. Essas observações mostraram a variabilidade de mudanças que caracteriza a resposta ao choque de calor, em *D. mulleri*.

Sob ação do frio os níveis de incorporação da metionina, nessa espécie foram muito baixos, restringindo-se a duas bandas.

A abordagem experimental realizada no presente trabalho para estudo do choque de calor e frio pode ser considerada restritiva nas suas conclusões. Os resultados obtidos, porém, podem ser importantes no conjunto de diferenças que possibilitam caracterizar a divergência evolutiva das duas espécies utilizadas, além do que fornecem uma nova perspectiva no estudo da expressão gênica dessas espécies que já demonstraram, por outros estudos, ser portadoras de mecanismos interessantes, envolvidos nesse processo.

allowed late third instar larvae to go to puparium stage. As to the survival rate, it was greater for treated first and second instar larvae than for third instar larvae. Heat shock at 37°C allowed development to proceed when applied to second and late third instar larvae, respectively to the third instar larvae and young pupae.

The survival rate was also greater when heat shock was applied to early stages of larval development. The results were about the same for both species studied.

The low resistance to cold of *D. mulleri* and *D. arizonensis* compared with other species studied in literature is possibly related to the geographic origin of strains used (México) and the occurrence of these species in cactus.

Preparations for chromosomal analysis showed that chromosomes were less damaged when using treated larvae. Comparing

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Temperature treatments were performed *in vivo* by transferring *Drosophila* larvae from 20°C to 37°C and to 10°C or *in vitro* with isolated salivary glands incubated at the same temperatures in Demerec solution or Grace medium. The observations included some aspects of development and survival rate, puffing pattern at chromosome 2 and synthetic pattern of total protein of larvae and salivary glands analyzed in polyacrilamide-SDS gels, using both gels of homogeneous concentration or in gradient, and salivary glands incubated in ^{35}S - methionine. In this study, *D. mulleri*, *D. arizonensis* (*D. arizonae*) and their hybrids were used.

Cold shock at 10°C inhibited development when applied to either eggs or first, second and early third instar larvae but allowed late third instar larvae to go to puparium stage. As to the survival rate, it was greater for treated first and second instar larvae than for third instar larvae. Heat shock at 37°C allowed development to proceed when applied to second and late third instar larvae, respectively to the third instar larvae and young pupae.

The survival rate was also greater when heat shock was applied to early stages of larval development. The results were about the same for both species studied.

The low resistance to cold of *D. mulleri* and *D. arizonensis* compared with other species studied in literature is possibly related to the geographic origin of strains used (México) and the occurrence of these species in cactus.

Preparations for chromosomal analysis showed that chromosomes were less damaged when using treated larvae. Comparing



preparations using salivary glands incubated in Demerec and in Grace medium, the second showed better chromosomes for analysis than the first. These results are probably due to the better "protection" for chromosome structure when salivary glands are within the larvae. On the other hand, Grace medium is used for insect tissue culture and thus must provide more important nutritional elements than the physiological solution of Demerec.

One or six puffs were detected in the chromosome 2 of different individuals of *D. mulleri* submitted to 37°C. The puff which may be single or not in response to heat shock is located at the distal end of chromosome 2. This puff was also observed in every developmental stage at normal conditions in which polytene chromosomes may be examined from second third instar larvae to young pupae. The difference is that under heat shock this puff is greater than under normal conditions at any developmental stage.

The other puffs which may also occur in chromosome 2, under heat shock at the late third instar larvae, were previously detected in normal development at the puparium stage. Thus heat shock anticipates activity of the genetic locus of these puffs while it apparently only increases activity of the genetic loci of the puff from the distal end.

The puff of the distal end of chromosome 2 behaved the same in heated *D. arizonensis* and hybrids. In both cases this puff was also greatly enlarged in comparison to cold shocked or control flies. This puff was the only one observed in *D. arizonensis* and hybrids submitted to heat shock and the only one observed in *D. mulleri*, *D. arizonensis* and hybrids submitted to cold or used as control.



As to protein patterns treatment of larvae or incubation of salivary glands in medium without the presence of ^{35}S - methionine did not show detectable banding differences among gels of treated, cooled or control flies. However, differences between species and among individuals of the same species could be detected.

Electrophoresis using gradient gels showed a better definition of bands than homogeneous gels, although the number of bands in both were about the same. In gradient gels, four bands were found to be exclusive to *D. arizonensis* and one exclusive to *D. mulleri* while in homogeneous gels two bands were exclusive to *D. arizonensis* and none was exclusive to *D. mulleri*. Because *D. mulleri* and *D. arizonensis* are considered sibling species, the present results may be used as a biochemical criterion for differentiating them.

Banding pattern in hybrids was apparently due only to the addition of both species' banding patterns.

Banding pattern of *D. mulleri* salivary glands incubated in ^{35}S - methionine submitted to heat shock showed three new bands, neither of them present at cold shock or at 20°C . Both are, thus, due to proteins whose expression is elicited exclusively by heat shock. Other bands were present in gels of flies submitted to the temperatures of 37°C and 20°C , but the degree of methionine intake was greater at the first than at the second temperature; these are probably proteins more intensively expressed under heat shock. Still another band present in both conditions (37°C and 20°C) showed greater incorporation of methionine in the control than in the heated cells; this is probably due to the decrease of expression of a protein under heat shock. These observations showed the



variability of changes which occurs in gene expression of *D. mulleri* under heat shock.

ALAHUTIS. Under cold shock the degree of methionine intake was very low and restricted to only two bands. *Gene system. Comp. Biochem.*

Physiol. The experimental approach for analyzing the effects of heat and cold shocks used in this study may be considered restrictive as to the conclusions which may be drawn. However, the results obtained may be important for the possibility of finding evolutionary differences between these species and provide a new perspective in the study of gene expression in these species which in other studies had already shown very interesting mechanisms involved in such processes. *31, p. 356-376, 1970a.*

ASHBURNER, M. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. *Adv. Insect. Physiol.*, v. 7, p. 1-95, 1970b.

ASHBURNER, M. Puffing patterns in *Drosophila melanogaster* and related species. In: **BEERMANN, W., REINERT, J., URSPRUNG, H. (Ed.)** Results and problems in cell differentiation: Developmental studies on giant chromosomes. Berlin: Springer, New York Heidelberg Berlin, 1972a, v. 4, cap. 5, p. 101-151.

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

ASHBURNER, M. Puffs, genes and hormones revisited. *Cell*, v. 61, p. 1-3, 1979.

ASHBURNER, M., RICHARDS, G. The role of ecdysone in the control of gene activity in the polytene chromosomes of *Drosophila*. In: **LAWRENCE, P. A. (Ed.)** Insect development. New York: New York-



VII. BIBLIOGRAFIA 203-225.

- ASHBURNER, M., BONNER, J.J. The induction of gene activity in
- ALAHOTIS, S.N., STEPHANOU. Temperature adaptation of *Drosophila* populations. The heat shock proteins system. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 73B, n. 3, p. 529-533, 1982.
- ARRIGO, A.-P., DARLIX, J.L., KHANDJIAN, E.W, SIMON, M., SPAHR, P.F. Characterization of the prosome from *Drosophila* and its similarity to the cytoplasmic structures formed by the low molecular weight heat-shock proteins. *EMBO J.*, v. 4, p. 399-406, 1985.
- ASHBURNER, M. Patterns of puffing activity in salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses of environmental treatment. *Chromosoma*, v. 31, p. 356-376, 1970a.
- ASHBURNER, M. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. *Adv. Insect. Physiol.*, v. 7, p. 1-95, 1970b.
- ASHBURNER, M. Puffing patterns in *Drosophila melanogaster* and related species. In: BEERMANN, W., REINERT, J., URSPRUNG, H. (Ed.) *Results and problems in cell differentiation: Developmental studies on giant chromosomes*. Berlin: Springer, New York Heidelberg Berlin, 1972a. v. 4, cap. 5, p. 101-151.
- ASHBURNER, M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. VI. Induction by ecdysone in salivary glands of *Drosophila melanogaster* cultured in vitro. *Chromosoma*, v. 38, p. 255-281, 1972b.
- ASHBURNER, M. Puffs, genes and hormones revisited. *Cell*, v. 61, p. 1-3, 1990.
- ASHBURNER, M., RICHARDS, G. The role of ecdysone in the control of gene activity in the polytene chromosomes of *Drosophila*. In: LAWRENCE, P. A. (Ed.) *Insect development*. New York: New York-

- Wiley, 1976. p. 203-225. *Drosophila hydei*. In: BEERMANN, W., REINERT, M., ASHBURNER, M., BONNER, J.J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*, v. 17, p. 241-254, 1979. *Prosomeres*.
- ATHERTON, D., GALL, J. Salivary gland squashes for in situ-nucleic acid hybridization studies. *Dros. Inf. Serv.*, v. 49, p.131-133, 1972.
- ATKINSON, B.G., WALDERN, D.B. Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. Academic Press, Inc., New York, 1985. apud MARTINS DE SÁ, C., ROLLET, E., GROSSI DE SÁ, M. -F., TANGUAY, R.M., BEST-BELPOMME, M., SCHERRER, K. Prosomes and heat shock complexes in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol. Cell Biol.*, v. 9, p. 2672-2681, 1989.
- ANGE, H., JACOB, F. Heat shock.
- BALBIANI, E.G. Sur la structure du noyau des cellules cellulaires chez les larves de *Chironomus*. *Zool. Anz.*, v.4, p. 637-641, 1881. apud PAVAN, C. Estrutura e função dos cromossomos. In: PAVAN, C., CUNHA, A.B. *Elementos de Genética*. 2.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional/Editora da Universidade de São Paulo, 1966. cap. 6, p. 118-157.
- REINERT, M., UESPRUNG, H. (Ed.) *Results and problems*
- BARETTINO, D., MORCILLO, G., DíEZ, J.L. Induction of the heat-shock response by carbon dioxide in *Chironomus thummi*. *Cell Differentiation*, v. 23, p. 27-36, 1988.
- BAUER, H. Structure and arrangement of salivary gland chromosomes in *Drosophila* species. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 22, p. 216-222, 1936.
- BECKER, H.J. Die puffs der Speicheldrusenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Beobachtungen zum Verhalten des puffmusters im normalstamm und bei zwei mutanten, giant und lethal-giant-larvae. *Chromosoma*, v. 10, p. 654-678, 1959. apud BERENDES, H.D. The



- control of puffing in *Drosophila hydei*. In: BEERMANN, W., REINERT, J., URSPRUNG, H. (Ed.) **Results and problems in cell differentiation: Developmental studies on giant chromosomes.** Berlin: Springer, Berlin Heidelberg New York, 1972. v. 4, cap. 7, p. 181-207. 1979. 202p. Tese (Livro-Docência) - Instituto de
- BEERMANN, W. Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 21, p. 217-232, 1956. *Nucleolar organizer activity and its regulatory*
- BELEW, K., BRADY, T. Induction of tyrosine aminotransferase by pyrodoxine in *Drosophila hydei*. **Chromosoma**, v. 82, p. 99-106, 1981. *H.E.M.C. Further observations on the nucleolar organizing*
- BENSAUDE, O., BABINET, C., MORANGE, M., JACOB, F. Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. **Nature**, v. 305, p. 331-333, 1983.
- BERENDES, H.D. Factors involved in the expression of gene activity in polytene chromosomes. **Chromosoma**, v. 24, p. 418-437, 1968.
- BERENDES, H.D. The control of puffing in *Drosophila hydei*. In: BEERMANN, W., REINERT, J., URSPRUNG, H. (Ed.) **Results and problems in cell differentiation: Developmental studies on giant chromosomes.** Berlin: Springer, Berlin Heidelberg New York, 1972. v. 4, cap. 7, p. 181-207. *D. arizonensis, Biol. Zbl.*, v. 100, p.
- BERENDES, H.D., HOLT, Th.K.H. The induction of chromosomal activities by temperature shocks. **Genen. Phaenen**, v. 9, p. 1-7, 1964. *D. arizonensis, and their hybrids. The nucleolar*
- BERENDES, H.D., BREUGEL, F.M.A., HOLT, Th. K.H. Experimental puffs in salivary gland chromosomes of *D. hydei*. **Chromosoma**, v. 16, p. 35-46, 1965. *Drosophila mulleri, D. arizonensis and their hybrids. Biol Zbl.*, v. 97, p. 193-203, 1978.

- BICUDO, H.E.M.C. Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (Grupo Repleta), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP, 1979. 202p. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP, 1979.
- BICUDO, H.E.M.C. Behaviour of polytene chromosomes of *Drosophila* species of the "Mulleri" complex and their hybrids. *Caryologia*, v. 34, n. 2, p. 231-253, 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.*, v. 100, p. 597-612, 1981b.
- BICUDO, H.E.M.C. Is there dosage compensation in *Drosophila* nucleolar organizing activity?, *Rev. Brasil. Gen.*, v. 4, p. 347-355, 1981c.
- BICUDO, H.E.M.C. Regulação da atividade organizadora nucleolar em *Drosophila*. *Ciênc. e Cult.*, v. 34, n. 4, p. 465-469, 1982.
- BICUDO, H.E.M.C. Evidence for gene amplification operating in dosage compensation in *Drosophila arizonensis*. *Biol. Zbl.*, v. 102, p. 685-695, 1983.
- 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.*, v. 74, p. 3498-3502, 1977.
- BICUDO, H.E.M.C., RICHARDSON, R.H. Morphological and developmental studies of *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* and their hybrids. *Biol Zbl*, v. 97, p. 195-203, 1978.



- BONNER, J.J., PARDUE, M.L. The effect of heat shock on RNA synthesis in *Drosophila* tissues. *Cell*, v. 8, p. 43-50, 1976.
- BONORINO, C.B.C., VALENTE, L.S. Heat shock and anoxia in chromosomes of species of the Willistoni group of *Drosophila*: evolutionary relationships. In: *Congresso Nacional de Genética*, 36, 1990, Caxambú. *Programa e Resumos*. Caxambú, 1990. p. 158.
- BREUER, M.E., PAVAN, C. Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma*, v. 7, p. 371-386, 1955.
- BREUGEL, F.M.A. Puff induction in larval salivary gland chromosomes of *M. hydei* (Sturtevant). *Genetica*, v. 37, p. 17-28, 1966.
- BRIDGES, C.B. The structure of salivary chromosomes and the relation of the banding to the genes. *Amer. Natl.*, v. 69, p. 59, 1935.
- BURTIS, K.C., THUMMEL, C.S., JONES, C.W., KARIM, F.D., HOGNESS, D.S. The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell*, v. 61, p. 85-99, 1990.
- BURTON, V., MITCHELL, H.K., YOUNG P., PETERSEN, N.S. Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster*. *Molec. Cell. Biol.*, v. 8, p. 3550-3552, 1988.
- CERON, C.A. Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1988. 142p. Tese (Doutoramento em Ciências)- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
- CERON, C.R., SANTOS, J.R., BICUDO, H.E.M.C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. *Rev.*



- Brasil. Genet., v. 15, n. 1, p. 201-203, 1992.
- CLEVER, V., KARLSON, P. Induktion von puff-veränderungen in den speicheldrusenchromosomen von *Chironomus tentans* durch edsyson. *Exp. Cell Res.*, v. 20, p. 623-626, 1960. apud ASHBURNER, M., BONNER, J.J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*, v. 17, p. 241-254, 1979.
- CLOS, J., WESRWOOD, J.T., BECKER, P.B., WILSON, S., LAMBERT, K., WU, C. Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock fator subject to negative regulation. *Cell*, v. 63, p. 1085-1097, 1990.
- COMPTON, J.L., MCCARTHY, B.J. Induction of the *Drosophila* heat shock response in isolated polytene nuclei. *Cell*, v. 14, p. 191-201, 1978.
- COURGEON, A.M., MAISONHAUTE, C., BEST-BELPOMME, M. Heat shock proteins are induced by cadmium in *Drosophila* cells. *Exp. Cell Res.*, v. 153, p. 515-521, 1984.
- COURGEON, A.M., ROLLET, E., BECKER, J., MAISONHAUTE, C., BEST-BELPOMME, M. Hydrogen peroxide (H_2O_2) induces actin and some heat-shock proteins in *Drosophila* cells. *Eur. J. Biochem.*, v. 171, p. 163-170, 1988.
- CRAIG, E.A. The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, v. 18, p. 239-280, 1985.
- CROW, J.F. Cross fertility and isolating mechanisms in the *Drosophila mulleri* group. *Univ. of Texas Publ.*, v. 4228, p. 53-67, 1942.
- DANIELS, C.J., MCKEE, A.H.Z., DOOLITTLE, W.F. Archaeobacterial heat shock proteins. *EMBO J.*, v. 3, p. 745-749, 1984.



- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Methods and application to serum proteins. *Annals. N. Y. Acad. Sci.*, v. 121, p. 404-427, 1964.
- DEMEREZ, M., KAUFMANN, B.P. *Drosophila Guide*. The Lord Baltimore Press, Baltimore, Maryland, 1945. apud BICUDO, H.E.M.C. Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo mulleri (Grupo Repleta), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP, 1979. 202p. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP, 1979.
- ELLGAARD, E.G. Similarities in chromosomal puffing induced by temperature shocks and dinitrophenol in *Drosophila*. *Chromosoma*, v. 37, p. 417-422, 1972.
- ELLGAARD, E.G., CLEVER, U. RNA metabolism during puff induction in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, v. 36, p. 60-78, 1971.
- ELLIS, R.J. Molecular chaperones. *Semin. Cell Biol.*, v. 1, p. 1-72, 1990. apud SCHLESINGER, M.J. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 12111-12114, 1990.
- FRUTOS, R., LATTORE, A. Patterns of puffing activities and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. *Genetica*, v. 58, p. 177-188, 1982.
- FUKATAMI, A. Cold temperature resistance in *Drosophila lutescens* and *D. takahashii*. *Jpn. J. Genet.*, v. 59, p. 61-70, 1984.
- GAUSZ, J., BENCZE, G., GYRKOVICS, H., ASHBURNER, M., ISH-HOROWICZ, D., HOLDEN, J.J. Genetic characterization of the 87C region of the chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 93, p. 917-934, 1979.



- GORDON, A.H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels.** New York: North-Holland Publ. Co., 1969. 149p.
- GRACE, T.D.C. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. **Nature**, v. 195, p. 788-789, 1962.
- GREENLEAF, A.L., PLAGENS, U., JAMRICH, M., BAUTZ, E.K.F. RNA polymerase B(or II) in heat-induced puffs of *Drosophila* polytene chromosomes. **Chromosoma**, v. 65, p. 127-136, 1978.
- HEINO, R., LUMME, J. Inheritance of cold shock tolerance in hybrids of *Drosophila virilis* and *Drosophila lummei*. **Genetica**, v. 79, p. 17-25, 1989.
- HEITZ, E., BAUER, H. Beweise für die chromosomennatur der kernschdeifen in den knaulkernen von *Bibio hortulanus* L. **Z. Zellforsch.**, v. 17, p. 67-62, 1933. apud PAVAN, C. Estrutura e função dos cromossomos. In: PAVAN, C., CUNHA, A.B. **Elementos de Genética.** 2.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional/Editora da Universidade de São Paulo, 1966. cap. 6, p. 118-157.
- HENIKOFF, S., MESELSON, M. Transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. **Cell**, v. 12, p. 441-451, 1977.
- HIGHTOWER, L.E. Heat shock, stress protein, chaperones, and proteotoxicity. Meeting review. **Cell**, v. 66, p. 191-197, 1991.
- HJERTÉN, S. **Arch. Biochem. Biophys.**, Suppl., v. 1, p. 147-151, 1962. apud WINTER, C.E., BIANCHI, A.G. Eletroforese descontínua em camada delgada utilizando géis de poliacrilamida e SDS. São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Departamento de Bioquímica, 1977. 14p. (apostila).
- HOLMGREN, R., LIVAK, K., MORIMOTO, R., FREUND, R., MESELSON, M. Studies of cloned sequences from four *Drosophila* heat shock loci. **Cell**, v. 18, p. 1359-1370, 1979.



- HOLT, Th.K.H. Local protein accumulation during gene activation. II. Interferometric measurements of the amount of solid material in temperature induced puffs of *Drosophila hydei*. *Chromosoma*, v. 32, p. 428-435, 1970.
- HOLT, Th.K.H., KUIJPERS, A.M.C. Induction of chromosome puffs in *Drosophila hydei* salivary glands after inhibition of RNA synthesis by alfa-amanitin. *Chromosoma*, v. 37, p. 423-432, 1972.
- IRELAND, R.C., BERGER, E.M. Synthesis of low molecular weight heat shock peptides stimulated by ecdysterone in a cultured *Drosophila* cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 79, p. 855-859, 1982.
- ISH-HOROWICZ, D., PINCHIN, S.M. Genomic organization of the 87A7 and 87C1 heat-induced loci of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, v. 142, p. 231-245, 1980.
- ISH-HOROWICZ, D., PINCHIN, S.M., SCHEDL, P., ARTAVANIS-TSAKONAS, S., MIRAULT, M.-E. Genetic and molecular analysis of the 87A7 and 87C1 heat-inducible loci of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, v. 18, p. 1351-1358, 1979.
- JAMRICH, M., GREENLEAF, A.L., BAUTZ, F.A. Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, p. 2079-2083, 1977a.
- JAMRICH, M., HAARS, R., WULF, E., BAUTZ, F.A. Correlation of RNA polymerase B and transcriptional activity in the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, v. 64, p. 319-326, 1977b.
- JOPLIN, K.H., YOCUM, G.D., DENLINGER, D.L. Cold shock elicits expression of heat shock proteins in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.*, v. 36, n. 11, p. 825-834, 1990.
- JUDD, B.N., CHEN, MW., KAUFMAN, T.C. The anatomy and function of a segment of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*,



- v. 71, p. 139-156, 1972.
- KEYSE, S.M., EMSLIE, E.A. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. **Nature**, v. 359, p. 644-647, 1992.
- KIMPEL, J.A., KEY, J.L. Presence of heat shock mRNAs in field grown soybeans. **Plant Physiol.**, v. 79, p. 672-678, 1985.
- KLOETZEL, P.M., BAUTZ, E.K. Heat shock proteins are associated with hnRNA in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. **EMBO J.**, v. 2, p. 705-710, 1983.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, R.E., CHEN, C.P., DENLINGER, D.L. A rapid cold-hardening process in insects. **Science**, v. 238, n. 4832, p. 1415-1417, 1987.
- LEENDERS, H.J., BECKERS, P.J.A. The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity. A correlation between induced gene activity and an increase in activity of a respiratory enzyme. **J. Cell Biol.**, v. 55, p. 257-265, 1972.
- LEENDERS, H.J., DERKSEN, J., MAAS, P.M.J.M., BERENDES, H.D. Selective induction of a giant puff in *Drosophila hydei* by vitamin B₆ and derivatives. **Chromosoma**, v. 41, p. 447-460, 1973.
- LEFEVRE, G.JR. The relationship between genes and polytene chromosome bands. **Ann. Rev. Genet.**, v. 8, p. 51-62, 1974.
- LEICHT, B.G., BIESSMANN, H., PALTER, K.B., BONNER, J. Small heat shock proteins of *Drosophila* associate with the cytoskeleton. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 90-94, 1986.
- LEWIS, M., HELMSING, P.J., ASHBURNER, M. Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 72, p. 3604-3608,

1975. *Centrioles associated with puffs. Cell*, v. 14, p. 539-544.
- LI, G.C. Induction of thermo-tolerance and enhanced heat shock protein synthesis in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol. *J. Cell Physiol.*, v. 115, p. 116-122, 1983. Ph.D. Thesis.
- LI, C.G., LASZLO, A. Thermotolerance in mammalian cells: a possible role for the heat shock proteins. *Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress*, p. 349-371. London: Academic, 1985. apud LINDQUIST, S., CRAIG, E.A. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, v. 22, p. 631-677, 1988.
- LINDQUIST, S. Varying patterns of protein synthesis during heat shock: implications for regulation. *Dev. Biol.*, v. 77, p. 463-479, 1980. *Dev. Biol.*, v. 84, p. 177-188, 1983.
- LINDQUIST, S. The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 55, p. 1151-1191, 1986. *Chromosoma*, v. 86, p. 457-467.
- LINDQUIST, S., CRAIG, E.A. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, v. 22, p. 631-677, 1988. *Molecular analysis of the region*
- LIVAK, K.F., FREUND, R., SCHWEBER, M., WEISINK, P.C., MESELSON, M. Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 75, p. 5613-5617, 1978.
- LUBSEN, N.H., SONDERMEIJER, P.J.A., PAGES, M., ALONSO, C. In situ hybridization of nuclear and cytoplasmic RNA to locus 2-48BC in *Drosophila hydei*. *Chromosoma*, v. 65, p. 199-212, 1978. *activity of*
- MARTINS DE SÁ, C., ROLLET, E., GROSSI DE SÁ, M. -F., TANGUAY, R.M., BEST-BELPOMME, M., SCHERRER, K. Prosomes and heat shock complexes in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol. Cell Biol.*, v. 9, p. 2672-2681, 1989. *Dev. B. arizomensis e seus híbridos. São José do*
- MAYFIELD, J.E., SERUNIAN, L.A., SILVER, L.M., ELGIN, S.C.R. A protein released by DNAase I digestion of *Drosophila* nuclei is



- preferentially associated with puffs. *Cell*, v. 14, p. 539-544, 1978.
- McKENZIE, S.L. Protein and RNA synthesis induced by heat in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. Ph.D. Thesis. Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 1976.
- ASHBURNER, M., BONNER, J.J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*, v. 17, p. 241-254, 1979.
- McKENZIE, S.L., HENIKOFF, S., MEELSON, M. Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 72, p. 1117-1121, 1975.
- METZ, C.W. Structure of the salivary gland chromosomes in *Sciara*. *J. Hered.*, v. 26, p. 177-188, 1935.
- MOHLER, J., PARDUE, M.L. Deficiency mapping of the 93D heat-shock locus in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, v. 86, p. 457-467, 1982.
- MOHLER, J., PARDUE, L.M. Mutational analysis of the region surrounding the 93D heat shock locus of *D. melanogaster*. *Genetics*, v. 106, p. 249-265, 1984.
- MOLTÓ, M.D., PASCUAL, L., DE FRUTOS, R. Puff activity after heat shock in two species of the *Drosophila obscura* group. *Experientia*, v. 43, n. 11/12, p. 1225-1227, 1987.
- MOLTÓ, M.D., FRUTOS, R., MARTÍNEZ-SEBASTIÁN, M.J. Gene activity of polytene chromosomes in *Drosophila* species of the *obscura* group. *Chromosoma*, v. 96, p. 382-390, 1988.
- NANYA, S. Atividade organizadora nucleolar e bandamentos C e G em *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São Paulo, 1986. 105p. Dissertação



- (Mestrado em Genética), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São Paulo, UNESP, 1986.
- ORNSTEIN, L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 121, p. 321-349, 1964. apud
- WINTER, C.E., BIANCHI, A.G. Eletroforese descontínua em camada delgada utilizando géis de poliacrilamida e SDS. São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Departamento de Bioquímica, 1977. 14p. (apostila).
- PASCUAL, L., FRUTOS, R. Stress response in *Drosophila subobscura*. I. Puff activity after heat shocks. *Biol. Cell*, v. 57, p. 127-134, 1986.
- PASCUAL, L., FRUTOS, R., LATORRE, A. Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. II. Puffing patterns at the prepupa stage. *Genetica*, v. 66, p. 123-138, 1985.
- PATTERSON, J.T. The *Drosophilidae* of the southwest. *Univ. of Texas Publ.*, n. 4313, p. 7-216, 1943.
- PAVAN, C. Estrutura e função dos cromossomos. In: PAVAN, C., CUNHA, A.B. *Elementos de Genética*. 2.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional/Editora da Universidade de São Paulo, 1966. cap. 6, p. 118-157.
- PAVAN, C., BASILE, R. Chromosome changes induced by infections in tissues of *Rhynchosciara angelae*. *Science*, v. 151, p. 1556-1558, 1966.
- PETERS, F.P.A.M.N., GROUND, C.J., SONDERMEIJER, P.J.A. LUBSEN, N.H. Chromosomal arrangement of heat shock locus 2-48B in *Drosophila hydei*. *Chromosoma*, v. 85, p. 237-249, 1982.
- PETERSEN, N.S., YOUNG, P., BURTON, V. Heat shock mRNA accumulation during recovery from cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.*, v. 20, n. 7, p. 679-684, 1990.



- PLAGENS, U., GREENLEAF, A.L., BAUTZ, E.K.F. Distribution of RNA polymerase on *Drosophila* polytene chromosomes as studied by indirect immunofluorescence. *Chromosoma*, v. 59, p. 157-165, 1976.
- RYSECK, RP, WALLDORF, U, HOFFMANN, T, HOVEMANN, B. Heat shock loci 93D of *Drosophila melanogaster* and 48B of *Drosophila hydei* exhibit a common structural and transcriptional pattern. *Nucleic Acids Research*, v. 15, n. 8, p. 3317-3333, 1987.
- RITOSSA, F.M. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, v. 18, p. 571-573, 1962.
- RITOSSA, F.M. New puffs induced by temperature shock, DNA and salicylate in salivary chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inf. Serv.*, v. 37, p. 122-123, 1963.
- RITOSSA, F.M. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res.*, v. 35, p. 601-607, 1964a.
- RITOSSA, F.M. Behavior of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res.*, v. 36, p. 515-523, 1964b.
- ROPP, M., COURGEON, A.M., CALVAYRAC, R., BEST-BELPOMME, M. The possible role of the superoxide ion in the induction of "heat shock" and normoxia after a period of an aerobiosis. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 61, p. 456-461, 1983.
- RUIZ, A., HEED, W.B., WASSERMAN, M. Evolution of the Mojavensis cluster of cactophilic *Drosophila* with description of two new species. *Journal of Heredity*, v. 81, p. 30-42, 1990.
- SACHS, M.M., FREELING, M., OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. *Cell*, v. 20, p. 761-767, 1980.



- SAVAGE, J.R.K., FITCHETT, M. The behaviour of fragile X and other aberrations during recovery from low folate conditions. *Chromosoma*, v. 96, p. 391-396, 1988.
- SCHLESINGER, M.J. Heat shock proteins: the search for functions. *J. Cell Biol.*, v. 103, p. 321-325, 1986.
- SCHLESINGER, M.J. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 12111-12114, 1990.
- SCHLESINGER, M.J., ASHBURNER, M., TISSIERES, A. Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 440p.
- SCHMID, H.P., AKHAYAT, O., MARTINS de SA, C., PUVION, F., KOEHLER, K., SCHERRER, K. The prosome: an ubiquitous morphologically distinct RNP particle associated with repressed mRNPs and containing ScRNA and a characteristic set of proteins. *EMBO J.*, v. 3, p. 29-34, 1984.
- SEMESHIN, V.F., BARICHEVA, E.M., BELYAEVA, E.S., ZHIMULEV, I.F. Electron microscopical analysis of *Drosophila* polytene chromosomes. I. Mapping of the 87A and 87C heat shock puffs in development. *Chromosoma*, v. 87, p. 229-237, 1982.
- SHAPIRO, A.L., VINUELA, E., MAIZEL, J.V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 28, p. 815-820, 1957. apud WINTER, C.E., BIANCHI, A.G. Eletroforese descontínua em camada delgada utilizando géis de poliacrilamida e SDS. São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Departamento de Bioquímica, 1977. 14p. (apostila).
- SILVER, L.M., ELGIN, S.C.R. Distribution patterns of three subfractions of *Drosophila* nonhistone chromosomal proteins: possible correlations with gene activity. *Cell*, v. 11, p. 971-983, 1977.



- SONDERMEIJER, P.J.A., LUBSEN, N.H. The activity of two heat shock loci of *Drosophila hydei* in tissue culture cells and salivary gland cells as analyzed by in situ hybridization of complementary DNA. *Chromosoma*, v. 72, p. 281-291, 1979.
- SORGER, P.K. Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, v. 65, p. 363-366, 1991.
- SOUTHGATE, R., AYE, A., VOELLMY, R. Nucleotide sequence analysis of the *Drosophila* small heat shock gene cluster at locus 67B. *J. Mol. Biol.*, v. 165, p. 35-57, 1983.
- SPOHR, G., GRANBOULAN, N., MOUL, C., SCHERRER, K. Messenger RNA in HeLa cells: an investigation of free and polyribosome bound cytoplasmic messenger RNP particles by kinetic labeling and electron microscopy. *Eur. J. Biochem.*, v. 17, p. 296-318, 1970.
- SPRADLING, A., PENMAN, S., PARDUE, M.L. Analysis of *Drosophila* mRNA by in situ hybridization: sequences transcribed in normal heat shocked cultured cells. *Cell*, v. 4, p. 395-404, 1975.
- SPRADLING, A., PARDUE, M.L., PENMAN, S. Messenger RNA in heat-shocked *Drosophila* cells. *J. Mol. Biol.*, v. 109, p. 559-587, 1977.
- SPRUILL, W.A., HURWITZ, D.R., LUCCHESI, J.C., STEINER, A.L. Association of cyclic GMP with gene expression of polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 75, p. 1480-1484, 1978.
- STEPHANOU, G., ALAHOTIS, S.N., CHRISTODOULOU, C., MARMARAS, V.J. Adaptation of *Drosophila* to temperature: heat-shock proteins and survival in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genet.*, p. 299-308, 1983.
- STOCKER, J.A., KASTRITSIS, C.D. Developmental studies in *Drosophila*. III. The puffing patterns of the salivary gland



- chromosomes of *Drosophila pseudoobscura*. *Chromosoma*, v. 37, p. 139-176, 1972. In: V. The mulleri subgroup. In: WHEELER, H.R.
- STUDIER, W.F. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.*, v. 79, p. 237-248, 1973. Univ. of Texas.
- TISSIÈRES, A., MITCHELL, H.K., TRACY, U.M. Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, v. 84, p. 389-398, 1974. In: WHEELER, H.R. (Ed.)
- THUMMEL, C.S., BURTIS, K.C., HOGNESS, D.S. Spatial and temporal patterns of E74 transcription during *Drosophila* development. *Cell*, v. 61, p. 101-111, 1990.
- VELASQUEZ, J.M., LINDQUIST, S. Hsp 70: nuclear function during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell*, v. 36, p. 655-662, 1984. de poliacrilamida e SDS. São Paulo:
- VINCENT, A., AKHAYAT, O., GOLDENBERG, S., SCHERRER, K. Differential repression of specific mRNA in erythroblasts cytoplasm: a possible role for free mRNP particles. *EMBO J.* v. 2, p. 1869-1876, 1983.
- VINCENT, M., TANGUAY, R.M. Different intracellular distributions of heat-shock and arsenite induced proteins in *Drosophila* KC cells. *J. Mol. Biol.*, v. 162, p. 365-378, 1982.
- VOELLMY, R., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M., SOUTHGATE, R., TISSIERES, A., LEVIS, R., GEHRING, W. A DNA segment isolated from chromosomal site 67B in *D. melanogaster* contains four closely linked heat-shock genes. *Cell*, v. 23, p. 261-270, 1981. mutation of a specific
- VOET, D., VOET, J.G. Electrophoresis. In: _____. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons. 1990. cap. 5, p. 94-100.
- WASSERMAN, M. Cytological studies of the *Repleta* group. *Univ. Texas Publ*, v. 5422, p. 130-152, 1954.



- WASSERMAN, M. V. Cytological studies of the repleta group of the genus *Drosophila*: V. The mulleri subgroup. In: WHEELER, M.R. (Ed.) Studies in Genetics. II. Research reports on *Drosophila* Genetics, Taxonomy and Evolution. Austin: The University of Texas, 1962a. n. 6205, cap. 5, p. 85-117.
- WASSERMAN, M. IV. Cytological studies of the repleta group of the genus *Drosophila*: IV. The hydei subgroup. In: WHEELER, M.R. (Ed.) Studies in Genetics. II. Research reports on *Drosophila* Genetics, Taxonomy and Evolution. Austin: The University of Texas, 1962b. n. 6205, cap. 4, p. 73-83.
- WEBER, K., OSBORN, M. *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 4406-4412, 1969.
- apud WINTER, C.E., BIANCHI, A.G. Eletroforese descontínua em camada delgada utilizando géis de poliacrilamida e SDS. São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Departamento de Bioquímica, 1977. 14p. (apostila).
- WIECH, H., BUCHNER, J., ZIMMERMANN, R., JAKOB, V. Hsp 90 chaperones protein folding *in vitro*. *Nature*, v. 358, p. 169-170, 1992.
- WHITAKER, J.R. *Electrophoresis in stabilizing media*. New York: Academic Press, 1967. 420p.
- YOST, J.H., LINDQUIST, S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell*, v. 45, p. 185-193, 1986.
- ZIMMERMAN, J.L., PETRI, W., MESELSON, M. Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNA in normal development without heat shock. *Cell*, v. 32, p. 1161-1170, 1983.

Ag. Prof. Dr. James Robert Coleman, pelo incentivo constante e pela revisão do "Summary and Conclusions".

VIII. AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, quero expressar o meu reconhecimento e minha gratidão à todas as pessoas, que direta ou indiretamente colaboraram de alguma maneira na sua execução.

Em especial, à Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, orientadora deste trabalho, brilhante pesquisadora e amiga, por todos os momentos que passamos juntas, os quais têm contribuído na minha formação pessoal e profissional, intensificando em mim o amor pela Ciência e pesquisa. E ao Dr. Luis Carlos Bicudo pelo interesse e amizade sempre constantes.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, por nos permitir a utilização de seu laboratório e pela participação na realização deste trabalho, orientando na parte de eletroforese e sempre incentivando com valiosas sugestões.

À Profa. Dra. Eliana Abdelhay da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Centro de Ciências da Saúde, por nos fornecer a metionina -³⁵S e o meio Grace, utilizados no trabalho.

Ao Prof. Dr. Édmo Garcia de Lima, coordenador do Curso de Pós-Graduação da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, pelo empréstimo do planímetro de compensação.

Ao Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela autorização para uso do densitômetro e ao Técnico especializado Marcelo da Costa Gonçalves pelo auxílio na sua utilização.

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



Aos Professores Doutores Eucléia Betioli Primo Contel, Itamar Romano Garcia Ruiz, João Ruggiero Neto e Shirlei Recco Pimentel, pela atenção e valiosas sugestões na análise criteriosa da Pro-forma. *referências bibliográficas.*

À Profa. Dra. Marileila Varella Garcia, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pelo exemplo de seriedade e conduta científica, pelo estímulo e permanente apoio.

À Profa. Dra. Maria Tercília V. A. Oliveira, amiga e incetivadora, pelas sugestões valiosas durante a realização deste trabalho. *restados.*

À Profa. Dra. Marlene K. H. Kobayashi, pela amizade e constante troca de idéias. *to das fotografias: Paulo A. Nazário e*

Sebastião Aos professores do Departamento de Biologia e do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do IBILCE - UNESP, pela transmissão de conhecimentos e incentivo. *Guilherme e Geociências: João*

R. Santos Ao Prof. Hélio Conte da Universidade Estadual de Maringá, pela amizade sincera, constante estímulo e solidariedade nas horas alegres e nos momentos difíceis. *viços solicitados.*

À Profa. Dra. Mary M. Itoyama da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e Ana Silvia Lapenta, pelo apoio e colaboração, principalmente na digitação e correção desta Tese. *cos realizados com*

muito zelo Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pela convivência agradável e pelas proveitosas trocas de experiências e idéias. *A*

Ministro À desenhista Soraia F. R. Soares pela competência na confecção dos gráficos e esquemas.

Ao funcionário do Laboratório de Computação Getúlio A. Salinas, pela disponibilidade e atenção sempre que solicitado. *Paula,*

Euclides A. Santos, José Custódio da Silva, Luiz C. Huniz, Manoel J.



Às funcionárias da biblioteca Gislaine L. Gameiro, Maria do Carmo Junqueira, Maria Helena Lima, Olinda V. T. Luchezi, Rosana P. Borelli e Wilse T. B. A. Soares, pela dedicação no atendimento e obtenção de referências bibliográficas.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação, Nanci O. A. Pereira, Olga M. R. Ferreira, Onilda N. O. Akasaki e Rosangela B. Simonato, pela eficiência no atendimento.

Aos funcionários da gráfica: Adauto A. Santos, José Firmino, Maria Aparecida A. de Marchi e Theodomiro Zafani, pelos serviços prestados.

Aos funcionários do Depto. de Biologia: Josué R. Santos pelo auxílio na confecção das fotografias; Paulo A. Maziero e Sebastião D. Barbosa, pelo preparo do meio de cultura; Simone C. Fernandes e Olga B. Pelicer, pelo serviços de datilografia.

Aos funcionários do Depto. de Química e Geociências: João R. Santos e Jorge F. Buchdid, pela ajuda técnica.

Aos responsáveis pelo setor de Audio-visuais, Marcio S. Silva e Eldes I. Rocha, pelos serviços solicitados.

Aos funcionários do setor de limpeza: Adelaide C. Dalbianco, Antonio Cavasana, Bernadete D. Trevisan, João B. Santos, Palmira G. Gonçalves e Virgilio Galan, pelos serviços realizados com muito zelo.

Às telefonistas: Dalva M. C. Marchiori, Egídia A. Ministro, Iraci B. Sobrinho e Sueli F. S. Vedoato, pela prontidão no atendimento e delicadeza constantes.

Aos vigias: Aldo Rizzo, Antonio de Freitas, Antonio S. Damasceno, Dejarne B. Silva, Domingos Sobrinho, Edberto B. Paula, Euclides A. Santos, José Custódio da Silva, Luiz C. Muniz, Manoel J.



Santos, Manoel R. Marinho, Marcos T. G. Silva, Pedro G. Montalvão e Romeu P. Alvares, pela atenção nas horas em que me encontrava neste Instituto, fora do expediente.

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

À Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Departamento de Biologia Celular e Genética, pela concessão do afastamento que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos meus queridos pais, Eikiti e Mitsuko, pelo exemplo de dedicação e amor à família, sempre me incentivando e apoiando.

Aos meus sogros, pela compreensão nos momentos de minha ausência.

Aos meus irmãos e cunhados, pelo incentivo constante.

Aos meus sobrinhos, em especial à Karen Akemi, Regiane e Gislaine, que sempre estiveram comigo transmitindo-me carinho e alegria.

A DEUS, pela vida e oportunidade de realizar este trabalho.

"A Paz é a única forma de nos
sentirmos realmente humanos".

"Há caminho, há luz em toda e
qualquer situação".
Albert Einstein

DOAÇÃO
Data 20.06.1993
Procedência <i>Outra</i>
Valor 100,000,000

"A Paz é a única forma de nos
sentirmos realmente humanos".

Albert Einstein



