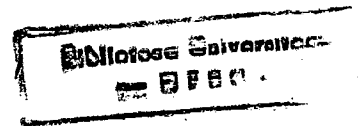


JAIME FERNANDO FERREIRA

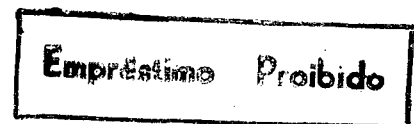


PUFES DE DNA DE Trichostia pubescens (DIPTERA: SCIARIDAE) E SUA
RELAÇÃO COM A SÍNTESE DE PROTEÍNAS

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de
São Paulo como parte dos
requisitos necessários para a
obtenção do Título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS na Área de Biologia

São Paulo

1988



JAIME FERNANDO FERREIRA*

PUFES DE DNA DE Trichostia pubescens (DIPTERA: SCIARIDAE) E SUA
RELAÇÃO COM A SÍNTESE DE PROTEÍNAS

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologias da Universidade de
São Paulo como parte dos
requisitos necessários para a
obtenção do Título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS na Área de Biologia



00041005

*Professor Assistente III do Departamento
de Biologia do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina

Bolsista CNPq e CAPES - PICD

Orientador : Dr. JOSÉ MARIANO AMABIS

São Paulo

- 1988 -

A

Rachel e Fernando

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e, em particular, :

- a Aimê Rachel Magenta Magalhães pela amizade, paciência, tolerância e pelo Fernando;
- ao meu orientador Dr. José Mariano Amabis pelo exemplo como professor e pesquisador e pelo auxílio, fundamental em todas as fases do trabalho;
- ao amigo Carlos Henrique Batista Rossini pelo companheirismo e auxílio em diversos aspectos da parte experimental;
- ao Departamento de Biologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina por ter permitido meu afastamento por dois anos para a conclusão do trabalho experimental.
- ao CNPq pela Bolsa de Estudos em nível de Doutorado nos dois primeiros anos do trabalho;
- a CAPES - PICD pelo Auxílio Financeiro em nível de Doutorado nos dois últimos anos do trabalho.

INDICE

Abreviaturas e Siglas	III
Introdução	1
Material	30
Métodos	32
1. Incubação de glândulas salivares "in vitro"	32
1.1. Incubação "in vitro" na presença de ecdisterona ...	32
1.2. Incubação "in vitro" na presença de alfa- amanitina.....	33
2. Preparação de cromossomos corados com Orceína	33
3. Extração de RNA total	34
4. Separação de RNA poliadenilado	35
5. Hibridização "in situ"	36
5.1. Hibridização com RNA endógeno	36
5.2. Hibridização com RNA exógeno	37
6. Detecção de híbridos DNA/RNA por imunofluorescência indireta	38
7. Eletroforese de Proteínas	39
7.1. Preparação das amostras	39
7.2. Eletroforese em géis de poliacrilaamida e SDS	39
7.3. Determinação dos pesos moleculares	41

7.4. Incorporação de aminoácidos radioativos "in vitro".	41
8. Fluorografia	42
9. Quantificação das proteínas solúveis das amostras de eletroforese	43
10. Análise densitométrica dos fluorogramas	43
Resultados	45
Discussão	85
Resumo	107
Abstract	110
Bibliografia	113

ABREVIATURAS E SIGLAS

CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
d	daltons
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DNase	Desoxiribonuclease
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FITC	Fluoroisocianato de Sódio
HCl	Ácido Clorídrico
IgG	Imunoglobulina tipo G
KCl	Cloreto de Potássio
mA	miliampér
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
poli A	poliadenilado
PPO	2,4- difeniloxazol
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Ribonuclease
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamino
TCA	Ácido tricloracético
Tris	Tris-hidróximetilaminometano

INTRODUÇÃO

Ao longo do desenvolvimento de um organismo multicelular, diferentes linhagens celulares especializam-se para desempenhar funções diversas. Esse processo, chamado geneticamente de diferenciação celular, tem sido um dos pontos centrais de interesse da Biologia. Ele é resultado da expressão diferencial de genes e sua compreensão está intimamente associada à própria regulação da atividade gênica nos cromossomos eucariontes. Dentre os mecanismos que participam na diferenciação celular, um dos mais estudados é o que envolve a regulação da atividade gênica por hormônios.

Os hormônios são substâncias orgânicas, secretadas por células especiais de organismos multicelulares e que atuam provocando respostas especiais em células ou tecidos geralmente localizados à distância e sem aparente relação com seu sítio de origem. São substâncias altamente específicas e, apesar de serem lançadas na corrente sanguínea, na hemolinfa ou passarem de célula a célula por difusão, entrando, dessa forma, em contato com um grande número de tecidos, só agem sobre alguns tipos celulares que, por isso, são denominados "célula-alvo" do hormônio.

A idéia de que os hormônios participam da regulação da atividade gênica em organismos eucariontes, foi originalmente proposta independentemente por Karlson (1961, 1963) e Zalokar (1961). Esses autores propuseram que os hormônios produzem seus efeitos regulando o programa genético, expresso em termos de produção de enzimas específicas e conseqüentemente mudança no metabolismo celular. Assim, criaram a teoria "hormônio-gene", segundo a qual os hormônios desempenham suas funções através da regulação do funcionamento gênico das "células-alvo". Nas duas últimas décadas, diversos aspectos do mecanismo de ação hormonal tem sido estudados, levando à confirmação da teoria "hormônio-gene".

Das duas grandes classes de hormônios existentes, os protéicos e os esteróides, estes últimos têm sido mais estudados no que se refere à sua participação no controle da atividade gênica. Esses estudos têm demonstrado a grande complexidade dos seus mecanismos de ação e a necessidade de serem estudados novos sistemas e empregados novos métodos para a melhor compreensão desse importante mecanismo de controle da atividade gênica (Kerkurt & Gilbert, 1985).

Os hormônios esteróides são constituídos por uma estrutura química básica, que apresenta três anéis de seis átomos de carbono cada e um anel com cinco carbonos,

interligados no centro. As diferenças entre os vários esteróides são determinados pelo padrão de ligações químicas nesses anéis e pela natureza e orientação dos grupos laterais a eles ligados. Os hormônios esteróides são, portanto, moléculas químicas pequenas com 20 a 30 átomos de carbono, que podem passar facilmente através da membrana (Florkin, & Stotz, 1963; Coffey, 1971; Lehninger, 1977).

Um importante passo na compreensão do mecanismo básico de ação dos hormônios esteróides foi a demonstração da existência de uma afinidade particular das "células-alvo" pelos seus respectivos hormônios. Jensen (1958) e Jensen & Jacobson (1962), utilizando o hormônio esteróide estradiol, marcado radioativamente, verificaram que as células que respondem a esse hormônio têm capacidade de retê-lo e acumulá-lo em seu interior por algumas horas. Já nas células não alvo, o hormônio, apesar de penetrar em seu interior, não se acumula. Pode-se concluir que, nas células não alvo, o hormônio passa através da membrana celular em ambas as direções e sua concentração dentro da célula não excede a do meio circundante. Por outro lado, nas "células-alvo", o hormônio, de alguma forma, fica retido em seu interior, acumulando-se e atingindo uma concentração muito mais alta do que a do meio circundante.

Foi sugerido mais tarde, que uma molécula receptora capaz de se ligar especificamente ao hormônio deveria estar presente nas "células-alvo" conferindo-lhes a capacidade de acumular o hormônio esteróide específico. Em 1965, Noteboom & Gorski detectaram um receptor estereoespecífico para o estradiol, sugerindo ser esse receptor uma molécula protéica. Em seguida, Toft & Gorski (1966) demonstraram que o estradiol, ao penetrar na "célula-alvo", combina-se com uma proteína denominada "receptor hormonal", formando um complexo "hormônio-receptor".

Esses estudos iniciais abriram caminho para que muitos aspectos do mecanismo de ação dos hormônios esteróides fossem rapidamente elucidados (revisões em Tomkins & Martin, 1970; Lisk, 1971; O'Malley & cols., 1976; Baulieu & cols., 1976; Kerkurt & Gilbert, 1985).

Baseado na ação da progesterona sobre células de oviduto de galinha, foi proposto um modelo básico de funcionamento geral para os hormônios esteróides (O'Malley & cols., 1976). O receptor hormonal da progesterona nesse sistema é um dímero protéico composto de duas subunidades, denominadas A e B, que possuem propriedades diferentes e específicas (Schrader & O'Malley, 1972; Schrader & cols., 1975). Esse dímero, que tem um índice de sedimentação de 6S (Schrader &

cols., 1975), está localizado no citoplasma das "células-alvo". O receptor hormonal seria específico para cada tipo de hormônio esteróide. Ao penetrar na célula, moléculas de hormônio ligam-se a cada uma das duas subunidades, causando a agregação dessas subunidades, com formação do complexo "hormônio-receptor". O complexo uma vez formado, migra do citoplasma para o núcleo (Maurer & Chalkey, 1967; Brecher & cols., 1967; Jensen & cols., 1968; de Sombre & cols., 1969; O'Malley & Toft, 1971; Mohla & cols., 1972), onde se associa à cromatina (O'Malley & cols., 1972; Buller & cols., 1975 a,b).

Foi demonstrado em experimentos com DNA purificado, e com cromatina "in vitro" que a fração A do complexo hormônio-receptor liga-se inespecificamente a DNA purificado enquanto a subunidade B se liga a proteínas ácidas do cromossomo, mas não a DNA (O'Malley & cols., 1972; Schrader & O'Malley, 1972; Schrader & cols., 1975). Com base nesses resultados, foi proposto que a subunidade B especificaria os locais da cromatina aos quais o complexo hormônio-receptor deve se ligar e que a subunidade A participaria mais diretamente na indução da atividade transcricional do DNA (O'Malley & cols., 1976). Supõem-se que a ligação do complexo hormônio-receptor cause modificações conformacionais na cromatina, permitindo a ligação

de RNAs polimerases e a transcrição de genes específicos (Mohla & cols., 1972; Schwartz & cols., 1976; revisão em O'Malley & cols., 1977).

Nos insetos, o hormônio esteróide típico é a ecdisona, isolado primeiramente a partir de extrato de pupas de Bombyx mori por Butenandt & Karlson em 1954. Esse hormônio atua sozinho ou em conjunto com outros hormônios em diversos processos fisiológicos relacionados à embriogênese, à morfogênese de discos imaginais, à reprodução e, principalmente, aos mecanismos responsáveis pela metamorfose (Gilbert, 1974; Reggi, 1977; Riddiford, 1980; Kurstak & cols., 1980), sendo conhecido muitas vezes como "hormônio da muda". Existem diversos tipos de ecdisonas, isoladas a partir de insetos, crustáceos e plantas, todas derivadas de uma estrutura básica, semelhante ao Colesterol.

Dos pelo menos 25 diferentes tipos de ecdisteróides de insetos (Smith, 1985), os mais importantes são a alfa-ecdisona (Karlson & cols., 1963; Huber & Hope, 1965) e a beta-ecdisona (Karlson, 1956). A partir de 1978 (Goodwin & cols., 1978), esses hormônios passaram a ser definitivamente denominados, respectivamente, de ecdisona e 20-hydroxiecdisona ou ecdisterona, nome esse já sugerido por Hoffmeister, em 1966.

Nos insetos, a ecdisona é produzida nas glândulas protorácicas de larvas, pré-pupas e pupas (revisão em Gilbert, 1964). Com os trabalhos de Romer & cols. (1974) e Sakurai & cols. (1977), ficou demonstrado que apesar de ocorrer a transformação de colesterol em ecdisona nas glândulas protorácicas, estas não produzem a 20-hydroxiecldisona. Segundo Smith & cols. (1985), após ser liberada para a hemolinfa, a ecdisona é oxidada pelos oenócitos (Romer & cols., 1974) recebendo uma hidroxila no carbono 20 e dando origem à 20-hydroxiecldisona, uma forma mais ativa do hormônio, como sugerido inicialmente por King, em 1972.

Apesar de a ecdisona e a ecdisterona serem muitas vezes chamadas de hormônios da muda, os processos relacionados ao desenvolvimento e metamorfose pós-embrionária são determinados pela variação da concentração de, pelo menos, três hormônios principais. Baseados nos trabalhos de Kopec (1922), Wigglesworth (1936, 1940, 1947), Fukuda (1940 a, b, 1944) e Willians (1947, 1948, 1952) delineou-se, por volta de 1950, um modelo básico de controle endócrino do desenvolvimento pós-embrionário dos insetos. De acordo com esse modelo, em resposta a estímulos ambientais, as células neuro-secretoras cerebrais produzem um hormônio protoracicotrópico (PTTH) que estimula as glândulas protorácicas a secretarem a ecdisona.

Depois de ser secretada pelas glândulas protorácicas, a ecdisona é rapidamente liberada para a hemolinfa, onde é transformada em ecdisterona que entra em contato com as células dos diferentes tecidos do inseto, provocando, nos tecidos-alvo, diferentes alterações. Nas células epidérmicas, o hormônio provoca a secreção de uma nova cutícula determinando a muda para o estágio seguinte do desenvolvimento.

Embora a muda seja determinada pela ecdisterona, sua expressão qualitativa é controlada pelo hormônio juvenil, secretado pelas "corpora-allata". Assim, na presença de altas taxas do hormônio juvenil, a muda será larval; caso a dose do hormônio juvenil seja intermediária, forma-se uma cutícula de pupa; se houver apenas vestígios desse hormônio, haverá a formação de cutícula de adulto (revisão em Gilbert, 1964; Wigglesworth, 1970).

Os dípteros são materiais biológicos particularmente favoráveis para o estudo dos mecanismos de ação do hormônio ecdisterona, pois neles a resposta gênica ao hormônio pode ser visualizada em alterações específicas no padrão de pufes dos cromossomos politênicos.

Os cromossomos politênicos que ocorrem nas glândulas salivares e em outros tecidos larvais de dípteros são

cromossomos gigantes que apresentam uma diferenciação longitudinal em faixas e interfaixas e onde as alterações morfológicas decorrentes da atividade de genes específicos podem ser visualizadas a nível microscópico.

Os cromossomos politênicos foram observados pela primeira vez por Balbiani em 1881, nas glândulas salivares de um chironomídeo. Foram, então, descritos apenas como cordões cilíndricos enrolados sobre si mesmos, como um intestino. Balbiani não discutiu qualquer possível significado daqueles cordões e ele não poderia supor a sua natureza cromossômica visto que, na época, cromossomo era uma estrutura pouco entendida. A natureza cromossômica desses corpos cilíndricos só foi finalmente estabelecida em 1933 com os trabalhos de Heitz & Bauer em células dos túbulos de Malpighi de Bibio hortulanus e de Painter em células das glândulas salivares de Drosophila melanogaster. No ano seguinte, Koltzoff (1934), trabalhando com Drosophila sugeriu, pela primeira vez, a "hipótese politênica" para a origem daqueles cromossomos gigantes. Segundo esta hipótese, os cromossomos gigantes dos dípteros seriam formados pelo emparelhamento ponto a ponto dos cromossomos homólogos e sucessivas duplicações longitudinais dos seus filamentos básicos. Essa hipótese foi logo em seguida corroborada pelos

trabalhos de Bridges (1935), Bauer (1935), White (1948), Bauer & Beermann (1952), Alfert (1954).

O processo de politenização se inicia algumas horas antes da eclosão do ovo em todos os tecidos larvais, com excessão dos gânglios nervosos, células germinativas e discos imaginais (Rieffel & Crouse, 1966). Nesse processo, os cromossomos homólogos sofrem emparelhamento somático, seguido de sucessivas duplicações de cada um dos elementos cromossômicos, sendo que as centenas de filamentos resultantes permanecem emparelhados. Assim, as células que apresentam cromossomos politênicos estão em intérfase permanentemente; não mais se dividem e aumentam muito em volume, atingindo tamanhos gigantescos em relação às células diplóides normais.

Ao longo do seu comprimento, os filamentos cromossômicos que constituem o cromossomo politênico apresentam configurações compactas, denominadas cromômeros, intercaladas com regiões mais distendidas, denominadas intercromômeros. Devido ao emparelhamento e duplicação dos cromonemas, ocorre a justaposição dos cromômeros e intercromômeros, originando um padrão de faixas e interfaixas característico de cada cromossomo politênico. Graças a esse padrão, é possível a confecção de mapas cromossômicos onde o padrão de distribuição de faixas e interfaixas é usado para caracterizar cada um dos

cromossomos da célula. A partir do trabalho pioneiro de Bridges (1935) associando o padrão de herança de mutações gênicas à transmissão de aberrações cromossômicas mapeadas nos cromossomos politênicos, tornou-se possível a localização de genes específicos em faixas e interfaixas dos cromossomos gigantes de *Drosophila*. A partir desse trabalho, começou a ficar evidente a importância dos cromossomos politênicos para a Genética.

O padrão de faixas e interfaixas dos cromossomos politênicos é, em geral, o mesmo para todos os tecidos de um mesmo indivíduo e, também, entre diferentes indivíduos de uma mesma espécie (Bridges, 1940; Pavan & Breuer, 1952; Beermann, 1952; Guevara, 1970). No entanto, no decorrer do desenvolvimento do organismo, ocorrem alterações estruturais ao longo dos cromossomos politênicos de um dado tecido. Essas alterações, que aparecem como intumescências em regiões específicas, são conhecidas como pufes ou anéis de Balbiani (Bridges, 1935; Beermann, 1952; Breuer & Pavan, 1952; Meckelke, 1953). Sua origem é admitida como sendo consequência da desespiralização dos cromômeros que constituem as faixas dos cromossomos politênicos (Swift, 1962; Gall, 1963; Zhimulev & cols., 1981; Semeshim & cols., 1985).

O padrão de pufes é, normalmente diferente em células de diferentes tecidos de um mesmo indivíduo e em células de um mesmo tecido em diferentes fases do desenvolvimento do animal (Breuer & Pavan, 1952, 1953, 1955; Beermann, 1952; Ashburner, 1970a; Cuevara & Basile, 1973; Amabis, 1974, 1983a). Estes fatos levaram Breuer & Pavan (1952, 1953, 1955), Beermann (1952, 1956), Meckelke (1953) e Pavan & Breuer (1955) a sugerirem que os diferentes padrões de pufes refletiriam diferentes padrões de atividade gênica e que os pufes poderiam ser interpretados como a manifestação morfológica da atividade gênica diferencial nos cromossomos politênicos.

A hipótese proposta por Breuer & Pavan (1952, 1954, 1955), Beermann (1956) e Meckelke (1953) de que os diferentes padrões de pufes refletiriam diferentes padrões de atividade gênica e que os pufes correspondem a genes em atividade tem sido corroborada nas últimas três décadas. Diversos trabalhos demonstraram que os pufes são locais de intensa síntese de RNA e outros têm estabelecido correlações positivas entre a presença de determinados pufes e a síntese de produtos gênicos específicos.

O primeiro trabalho que mostrou uma relação positiva entre a presença de um produto gênico e um pufe foi o de Beermann (1961). Trabalhando com duas espécies de Chironomus,

este pesquisador verificou que o citoplasma de células especiais da glândula salivar de Chironomus pallidivittatus apresentava grânulos de secreção característicos e apenas nos cromossomos dessas células, está presente o anel de Balbiani 4 (BR4). As glândulas de Chironomus tentans não apresentavam nem o BR4 nem os grânulos de secreção mencionados, nas células correspondentes às de C. pallidivittatus. Nos híbridos obtidos do cruzamento de indivíduos dessas duas espécies, as células glandulares apresentavam metade da quantidade de grânulos presente em C. pallidivittatus e, em seus cromossomos, o pufe BR4 era assimétrico, estando ausente apenas no homólogo proveniente de C. tentans.

Dando continuidade ao trabalho de Beermann (1961), Grossbach (1969, 1973) analisou eletroforéticamente as proteínas da secreção salivar de C. tentans e C. pallidivittatus. Essa análise revelou que um polipeptídeo específico presente na secreção de C. pallidivittatus é produzido pelas células especiais das glândulas salivares, as mesmas que apresentam os grânulos protéicos. Através de análises citogenéticas em híbridos interespecíficos, o gene relacionado a essa fração protéica foi localizado no cromossomo IV, na região onde se forma o BR4.

Um passo importante no estabelecimento de correlações entre pufes e proteínas foi dado em 1974 por Tissières e colaboradores. Esses pesquisadores utilizando a técnica de eletroforese em placa e autorradiografia, conseguiram relacionar as rápidas alterações no padrão de pufes de Drosophila melanogaster, desencadeadas pelo choque térmico, com alterações rápidas no padrão de síntese de proteínas.

Como originalmente descoberto por Ritossa (1962) em Drosophila buskii e observado posteriormente em outras espécies desse mesmo gênero, o choque térmico produzido pela transferência de larvas da temperatura de 25°C para 37°C, induz o aparecimento de novos pufes em locais específicos e a regressão de pufes pré-existentes (Ritossa, 1963; Berendes & cols., 1965; van Breugel, 1966; Ashburner, 1970b). Analisando o padrão de síntese de proteínas nas glândulas salivares de larvas de D. melanogaster após choque de temperatura, Tissières & cols. (1974) mostraram o aparecimento de seis novos polipeptídios e o desaparecimento de outros. Essas mesmas alterações foram verificadas em células de cérebro e de túbulos de Malpighi. Considerando a quantidade de Uridina ^m incorporada nos pufes e o nível de Metionina ^{SS} presente nas proteínas, Tissières & cols. (1974) sugeriram uma relação entre o pufe 87B e uma proteína de peso molecular 70.000

daltons, induzida pelo choque térmico. Trabalhando com células de D. melanogaster em cultura, McKenzie & cols. (1975) mostraram que o choque de temperatura causa um rápido desaparecimento de polissomos pré-existentes, seguido pelo aumento da produção de novos polissomos. A hibridização "in situ" em cromossomos politênicos mostrou que a maior parte do RNA associado à fração polissômica presente após o choque térmico era poliadenilado e hibridizava na região 87B.

Ainda em Drosophila melanogaster, uma excelente correlação entre genes estruturais e produtos celulares específicos foi obtida por Korge (1975, 1977). Esse autor, utilizando a técnica de eletroforese em géis de poliacrilamida, analisou as frações polipeptídicas da secreção salivar de diferentes linhagens de D. melanogaster, portadoras de inversões e deficiências. Seus resultados permitiram relacionar frações polipeptídicas da secreção salivar e as regiões 3C11 e 3C12 do cromossomo X e as regiões 66D2 e 72E5 do cromossomo III. Estes dados foram confirmados por Akam & cols. (1978) e por Velizariou & Ashburner (1980).

Além das mudanças na atividade gênica que ocorrem nas glândulas salivares durante o desenvolvimento larval e após choque térmico, é possível induzir, nesse órgão, alterações no funcionamento gênico através de diversos agentes injetados na

hemolinfa das larvas ou administrados "in vitro". Esses sistemas têm permitido não só uma melhor compreensão do mecanismo de ação desses agentes sobre o funcionamento gênico, como também o estudo de regiões gênicas específicas do genoma, principalmente aquelas que desenvolvem pufes nos cromossomos politênicos. Dentre as substâncias que tem sido utilizadas nessas experimentos, destaca-se o hormônio esteróide ecdisterona.

A indução de pufes pela ação da ecdisterona foi primeiramente demonstrada por Clever & Karlson (1960) em larvas de Chironomus tentans. Esses autores observaram que a injeção de ecdisona em meio de quarto estágio, induz o aparecimento de pufes característicos da época da muda.

A partir desse trabalho pioneiro, diversos outros experimentos levaram à confirmação de que a ecdisona ou seu derivado mais ativo, a ecdisterona, controla a indução e a regressão dos pufes dos cromossomos politênicos nas glândulas salivares de diversas espécies de dípteros (Berendes, 1967; Amabis & Cabral, 1970; Berendes & Thijssen, 1971; Amabis & Simões, 1971; Ashburner, 1971a,b, 1972,1974; Amabis, 1972; Dessen & Perondini, 1976; Richards 1976a,b; Amabis, 1978; Amabis & cols., 1977; Amabis & Amabis, 1984a,b).

O mecanismo pelo qual a ecdisterona atua de forma a provocar a indução de pufes específicos vem sendo estudado nas duas últimas décadas. Clever (1964a) trabalhando com larvas de Chironomus tentans, verificou que somente dois pufes são induzidos rapidamente pela ecdisterona (pufes primários). Os demais pufes (pufes secundários) só aparecem depois de um intervalo de tempo de várias horas após o tratamento. Além disso, Clever (1964b) e Clever & Romball (1966), verificaram que a indução dos pufes primários é independente da síntese de proteínas, mas que os pufes mais tardios não são induzidos quando essa síntese é inibida. Resultados semelhantes foram obtidos para glândulas salivares de Drosophila (Berendes, 1967; Ashburner, 1972; Ashburner & cols., 1974; Richards, 1976a,b; Ashburner & Berendes, 1978) e Trichozia pubescens (Amabis, 1977; Amabis & Amabis, 1984a).

Alguns trabalhos tem sugerido a existência de receptores intracelulares para ecdisteróides, nas "células-alvo". Os trabalhos de Emmerich (1970, 1972) mostraram que o tratamento de glândulas salivares de D. hydei com ecdisona, provoca o aparecimento, no citoplasma, de uma fração protéica específica. Essa proteína, na presença do hormônio, passa do citoplasma para o núcleo. Helmsing & Berendes (1971) sugeriram ainda que esta proteína deve ser aquela que se

acumula nos pufes induzidos pela ecdisona, imediatamente antes do início da síntese de RNA como verificado por Clever (1964b) em Chironomus. O aparecimento de uma proteína específica no citoplasma e sua passagem para o núcleo, após tratamento com ecdisterona foram mostrados em células de discos imaginiais (Yund & cols., 1978) e células em cultura da linhagem Kc (Maroy & cols., 1978) de Drosophila.

Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação da ecdisona é semelhante ao de outros hormônios esteróides. Esta sugestão recebeu apoio com o trabalho de Sage & cols. (1982) que detectaram, após a administração de hormônio tritiado em células Kc de Drosophila, o aparecimento de um complexo citoplasmático com 4S, que passa para o núcleo na forma de um complexo 6S e apresenta capacidade de se ligar ao DNA. Schaltmann & Pongz (1982) identificaram uma proteína com peso molecular de 130.000 daltons que se liga à ecdisona formando um complexo hormônio-receptor, tanto em glândulas salivares quanto em células Kc. Esses autores verificaram ainda que 70% desse complexo passa do citoplasma para o núcleo, no período de 1 hora após o tratamento com o hormônio ecdisona. Além disso, através de técnicas imunológicas, foi possível localizar moléculas de ecdisona associadas a regiões específicas dos cromossomos politênicos de glândulas salivares de Drosophila (

Gronemeyer & Pongs, 1980 e de Chironomus (Gronemeyer & cols., 1981) nos locais onde se desenvolvem pufes induzidos pelo hormônio.

Assim, tem sido sugerido que, como outros hormônios esteróides estudados, a ecdisona penetra no citoplasma da "célula-alvo", associa-se a uma proteína receptora formando um complexo hormônio-receptor que passa para o núcleo. Esse complexo liga-se, então, à cromatina próximo ou diretamente sobre os genes que respondem ao hormônio, induzindo a sua expressão. Além disso, segundo O'Connor (1985) os sítios que respondem à ecdisona teriam a mesma composição química, em termos de DNA, sofrendo variação na estrutura secundária da cromatina, provavelmente por diferenças nas proteínas a ela associadas, durante o desenvolvimento e em diferentes tecidos. Isso causaria uma variação na afinidade entre a cromatina e o complexo hormônio-receptor e a ativação diferencial dos genes que respondem à ecdisterona.

Nos Sciarídeos, além dos efeitos comuns a outros dípteros, a ecdisona induz uma sincronização da síntese de DNA entre os núcleos das glândulas salivares (Gabrusewycz-Garcia, 1964; Crouse, 1968; Simões, 1967, 1970; Perondini, 1968; Machado-Santelli, 1973). Nesses dípteros ocorre, portanto, um ciclo adicional de duplicação cromossômica antes da pupação. E

durante esse ciclo que se formam os chamados pufes de DNA (Pavan, 1965a,b).

Os pufes de DNA constituem uma classe especial de pufes, característicos de larvas da família Sciaridae. Este tipo de pufe foi descoberto em 1955 por Breuer & Pavan em larvas de Rhynchosciara angelae (= R. americana). Esses pesquisadores demonstraram através da reação de Feulgen, que aqueles pufes desenvolvem-se em determinadas regiões dos cromossomos das glândulas salivares onde ocorre acúmulo adicional de DNA em fases específicas do desenvolvimento.

A síntese adicional de DNA nos locais onde se desenvolvem os pufes de DNA corresponde a uma amplificação gênica, ou seja, a um aumento localizado na quantidade de genes. Esse fenômeno é comum nos cromossomos politênicos de glândulas salivares de diversas espécies de Sciarídeos e pode ocorrer antes ou durante a expansão do pufe (Breuer & Pavan, 1955; Gabrusewycz-Garcia, 1964, 1971; Simões, 1970; Pavan & da Cunha, 1969; Sauaia & cols., 1971; Amabis, 1974). O aumento desproporcional da quantidade de genes em locais específicos dos cromossomos foi interpretado por Breuer & Pavan (1955), como sendo uma adaptação da célula no sentido de aumentar a síntese de um determinado produto gênico. Assim, o RNA produzido em grande quantidade nesses pufes poderia ser

transportado para o citoplasma e traduzido em proteínas, necessárias em grandes quantidades em épocas específicas do desenvolvimento larval.

A interpretação de Breuer & Pavan (1955) para os pufes de DNA só veio ter suporte experimental na década de 70, com diversos trabalhos em Rhynchosciara. Winter & cols. (1977a,b; 1980) detectaram nesse Sciarídeo, a síntese de uma série de polipeptídios que são produzidos somente na época em que aparecem os pufes de DNA. Esses autores foram capazes de correlacionar dois desses polipeptídios, produzidos pelas glândulas salivares e presentes na secreção salivar, com os pufes de DNA B2 e C3. Okretic & cols. (1977) mostraram que o ciclo de expansão e regressão do pufe B2 na região S1 da glândula salivar de R. americana é paralelo à síntese de uma fração de RNA poliadenilado específica, sugerindo que este seja transcrito daquela região cromossômica. Bonaldo & Lara (1978) conseguiram hibridizar "in situ" a espécie de RNA descrita acima com a região cromossômica de onde se origina o pufe de DNA B2. Realizando a tradução "in vitro" do RNA poliadenilado, extraído da região S1 da glândula salivar de R. americana (onde o pufe B22 está mais ativo), de Toledo & Lara (1978) conseguiram caracterizar um polipeptídio de 21.000 d, semelhante ao descrito por Winter & cols. (1977a,b), como

sendo correlacionado ao pufe B2. Além disso, os resultados obtidos por Bonaldo & cols. (1979) com RNA extraído de pufes após microdissecção e hibridização "in situ", mostraram que esse RNA tem uma constante de sedimentação de 14 S, é poliadenilado, migra rapidamente para o citoplasma e é instável.

Nas glândulas do Sciarídeo Bradysia hygida, foi possível correlacionar o aparecimento de diversas frações polipeptídicas com a expansão de pufes de DNA ao longo do desenvolvimento larval, através da inibição seletiva de pufes de DNA por drogas inibidoras da síntese de DNA (Laicine & cols., 1980).

Em nosso laboratório, o fenômeno da amplificação gênica e alguns aspectos do controle hormonal de pufes tem sido estudado em larvas do Sciarídeo Trichosia pubescens. A seguir há uma breve descrição desse sistema que foi o utilizado no presente trabalho.

As glândulas de Trichosia pubescens são dois órgãos cilíndricos que percorrem ventro-lateralmente toda a extensão do corpo da larva. Cada glândula é formada por cerca de duas centenas de células que diferem morfológicamente em diferentes regiões do órgão (S1, S2a, S2b e S3) (Amabis, 1974, 1983a). As células das glândulas salivares contém quatro cromossomos

politênicos denominados A,B,C e X (Amabis, 1974, 1983a), de acordo com a nomenclatura utilizada por Metz (1935) para Sciarídeos. Em preparações citológicas de glândulas salivares, em geral são encontrados sete elementos cromossômicos, já que os cromossomos A,B e X normalmente se quebram em pontos específicos.

A caracterização do padrão de atividade nas glândulas salivares de T. pubescens é muito facilitada pela excelente qualidade, em termos de tamanho e de definição de faixas e interfaixas, de seus cromossomos politênicos. Essa característica permitiu uma análise detalhada das variações no padrão de pufes ao longo do desenvolvimento larval (Amabis, 1983b).

O padrão de pufes dentro de uma mesma região glandular é bem constante ao longo da maior parte do desenvolvimento larval. No entanto, algumas horas antes da larva deixar a massa de alimento, à procura de um local para construir o casulo e coincidentemente ao aparecimento das primeiras manchas oculares, o padrão de pufes começa a se alterar. A primeira alteração consiste na regressão de alguns pufes típicos da fase de intermuda e no aparecimento de uns poucos pufes novos (pufes primários). Após essas primeiras alterações, o padrão permanece praticamente inalterado por

algumas horas para, em seguida, entrar em uma sequência de alterações contínuas que só terminará com a autólise da glândula; é nessa fase de drásticas alterações no padrão de pufação que se desenvolvem enormes pufes de DNA.

A formação dos pufes de DNA na fase que precede a muda pupal está intimamente associada a um ciclo de duplicações cromossômicas que ocorre especificamente nessa fase do desenvolvimento (J.M. Amabis, comunicação pessoal). Este ciclo de duplicação caracteriza-se por uma sincronização da síntese de DNA entre os núcleos celulares das glândulas salivares. E durante esse ciclo de duplicação do DNA que ocorre a amplificação gênica em certas regiões cromossômicas, a partir das quais desenvolver-se-ão os pufes de DNA (Amabis, 1983b). Foi verificado que pelo menos 30 faixas dos cromossomos politênicos das glândulas salivares de T. pubescens sofrem amplificação gênica durante essa fase e originam pufes de DNA, apesar do processo de amplificação iniciar-se simultaneamente em diferentes fases do desenvolvimento. Assim, observa-se desde pufes que iniciam sua expansão simultaneamente ao início do processo de amplificação gênica, até aqueles que só se expandem muitas horas após o término de síntese do DNA. Diferentemente dos pufes típicos da fase de intermuda, os pufes de DNA atingem enormes dimensões e mantêm-se expandidos por curtíssimos

espaços de tempo. Nesse caso também, observa-se uma variação intraglandular, isto é, certas faixas que sofrem amplificação gênica e desenvolvem pufes de DNA nas células da região anterior da glândula mantêm-se inalteradas na região posterior e vice-versa (J.M.Amabis, & D.C.Amabis, comunicação pessoal).

As alterações no padrão de atividade gênica que ocorrem nas glândulas salivares de larvas de T. pubescens ao final do desenvolvimento larval são desencadeadas por um aumento da taxa do hormônio da muda na hemolinfa. Assim, a eliminação da fonte desse hormônio, pouco antes do início das alterações no padrão de atividade gênica, bloqueia completamente essas alterações (Amabis & Amabis, 1984b). Por outro lado, a injeção de ecdisterona em larvas jovens desencadeia prontamente todas as alterações observadas no fim do desenvolvimento larval (Amabis, 1977; Amabis & Amabis, 1984a). Por exemplo, cerca de 15 minutos após a injeção do hormônio em larvas em intermuda, observa-se o aparecimento dos primeiros pufes primários e a regressão de alguns pufes típicos de larvas jovens. Duas horas após a injeção do hormônio, as alterações primárias estão completas e novas alterações só irão ocorrer após 3 a 4 horas. As alterações secundárias induzidas pela ecdisterona compreendem a indução do último ciclo de

duplicação cromossômica, do processo de amplificação gênica e a sequência de alterações no padrão de pufes característicos do fim da vida larval.

Em Trichosia pubescens é possível se induzir a expansão dos pufes de DNA em glândulas salivares incubadas "in vitro" em meio de cultura, acrescido de ecdisterona (Ferreira, 1981). Nessas condições foi possível mostrar que, após 15 minutos de contato das glândulas salivares com o meio de cultura contendo o hormônio, se detecta o início de expansão de pufes de DNA. Essa indução, além disso, é dependente da síntese "de novo" de proteínas (Ferreira, 1981). Segundo Benozzati (1978) e Benozzati & Amabis (1983), a função primordial das glândulas salivares das larvas de T. pubescens é a síntese de uma secreção mucosa que, nas fases jovens da vida, parece ser utilizada na lubrificação do corpo e no revestimento de canais, dentro da massa de alimento, no interior dos quais o animal se desloca. No fim da vida larval, na fase que precede a muda pupal, a secreção das glândulas salivares é utilizada para a construção de um casulo frouxo dentro do qual ocorre a pupação.

Os resultados obtidos até o presente sugerem que as glândulas salivares de larvas de T. pubescens desempenham duas funções básicas: a produção de uma secreção típica da fase de intermuda e a produção de um outro tipo de secreção típica do

fim do desenvolvimento larval. Nossa proposição é que o desempenho dessas funções depende de dois sistemas de diferenciação distintos, um deles atuando durante a maior parte do desenvolvimento larval e o outro restrito ao fim do quarto estágio. O primeiro sistema seria correspondente ao "long time constant system of differentiation" proposto por Kafatos & cols. (1977), onde a síntese de grandes quantidades de proteínas específicas seria decorrente de uma amplificação ao nível da tradução. Alguns fatos favorecem essa hipótese: a) a síntese de polipeptídeos da secreção salivar na fase de intermuda é intensa; b) não se observa amplificação de genes específicos; c) os pufes de intermuda são relativamente pequenos e a síntese de RNA nesses locais não é particularmente intensa; d) o padrão de síntese de polipeptídeos mantém-se praticamente inalterado por várias horas após a regressão dos pufes de intermuda (Benozzati & Amabis, 1983; Amabis, 1983b).

No fim da vida larval, ocorreria uma reprogramação gênica que levaria ao segundo sistema de diferenciação celular, correspondente ao "short time-constant system of differentiation" (Kafatos & cols., 1977). Nesse caso, a produção de grandes quantidades de proteínas específicas durante curtos espaços de tempo exigiria um sistema de mensageiros instáveis e a síntese e a amplificação dos genes

codificadores. As evidências de que tal sistema de diferenciação atua nas glândulas salivares de T. pubescens, no final do desenvolvimento larval, são: a) nessa fase ocorre a produção de grandes quantidades de proteínas específicas por curtíssimos períodos de tempo e o padrão de síntese varia continuamente ao longo do desenvolvimento; b) ocorre amplificação de genes específicos que transcrevem RNA ativamente em fases determinadas do desenvolvimento e cuja atividade pode ser temporalmente relacionada à síntese de polipeptídios específicos (Amabis, 1983b).

Esse quadro permite-nos concluir que o sistema constitui-se em um modelo particularmente favorável para o estudo de certos processos envolvidos na diferenciação celular. Por um lado, ele apresenta cromossomos politênicos, onde a atividade gênica pode ser estudada a nível microscópico; por outro lado, tudo indica que nele atuam dois sistemas distintos de diferenciação celular, sendo a ecdisterona o fator responsável pelo desencadeamento e provável manutenção da reprogramação genética necessária à produção dos polipeptídios que constituem as proteínas do casulo.

Este projeto teve por objetivo obter maiores informações a respeito da síntese de polipeptídios glandulares

na fase que precede a muda pupal de Trichostia pubescens e o estabelecimento de possíveis correlações entre a síntese desses polipeptídios e a atividade de pufes de DNA específicos.

Para atingir esse objetivo, necessitamos conhecer diversos aspectos relacionados à síntese de RNA na região dos pufes de DNA e a síntese de proteínas nas glândulas salivares. Isso nos levou a estabelecer os seguintes passos para o desenvolvimento do presente trabalho :

- Estudar a síntese de proteínas nas glândula salivares de Trichostia pubescens, durante os períodos do desenvolvimento larval em que aparecem os pufes de DNA;
- Verificar de que maneira os diferentes pufes de DNA se comportam na presença de ecdisterona "in vitro";
- Estudar a síntese de proteínas nas glândulas salivares de larvas, após incubação "in vitro", na presença de ecdisterona;
- Caracterizar o tipo de RNA produzido nas regiões que originam pufes de DNA.

MATERIAL

Neste trabalho foram utilizadas larvas do díptero sciarídeo Trichosia pubescens (Morgante, 1969). Os animais foram retirados de um estoque que vem sendo mantido no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, segundo técnica descrita por Amabis (1974).

O ciclo de vida desta espécie tem uma duração aproximada de 30 dias à 21°C. A fase larval consiste de quatro estádios; a primeira muda acontece tres dias após a eclosão do ovo; a segunda ao redor do sétimo dia; a terceira, por volta do décimo dia e a quarta, que corresponde à muda pupal, ocorre por volta do vigésimo segundo dia após a eclosão do ovo. Esta última muda dá-se no interior de um casulo individual, construído a partir da secreção salivar da larva. O adulto emerge quatro dias após a muda pupal e tem uma vida de aproximadamente dez dias (Morgante, 1969).

Em todos os experimentos aqui mencionados foram utilizadas larvas fêmeas em quarto estádio larval. Esse estádio é arbitrariamente dividido em períodos, definidos por características externas da larva e pelo comportamento quanto a alimentação e locomoção (Amabis, 1974), como pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1 - Subdivisão do fim do quarto estágio larval de T. pubescens, modificado de Amabis (1983b) e Amabis & Amabis (1984a).

Período	Duração aproximada (horas)	Características e comportamento
L1	100	Ausência de manchas oculares. Larva no interior da massa de alimento
L2	25	Início do desenvolvimento das manchas oculares. Larvas no interior da massa de alimento.
L3	20	Manchas oculares de tamanho médio. Larva no interior da massa de alimento.
L4	10	Larva locomovendo-se sobre a terra.
L5	10	Larva sob a terra. Início da construção do casulo. Presença de alimento no intestino
L6	6	Larva no interior do casulo individual, com forma de U. Presença de terra no intestino
L7	6	Larva no interior do casulo, com forma de J. Intestino vazio.
P1	3	Início da migração das manchas oculares
P2	3	Manchas oculares migrando
P3	10	Fim da migração das manchas oculares
P4	25	Período entre P3 e a pupação

MÉTODOS

1. Incubação de glândulas salivares "in vitro"

As larvas eram dissecadas em uma gota de PBS (NaCl 1,4M; KCl 25mM; Na_2HPO_4 1mM; KH_2PO_4 15 mM) e parte das glândulas salivares transferidas para 2 μl de meio de cultura para Trichozia (meio Tp descrito em Barbosa, 1984) sobre parafilme. Nessas condições as glândulas eram mantidas pelo tempo desejado em câmara úmida e a temperatura ambiente (em torno de 20°C). Uma porção das glândulas salivares era, imediatamente após a dissecação, fixada, corada e esmagada entre lâmina e lamínula para determinação do padrão de pufes e conseqüentemente do período de desenvolvimento larval.

1.1- Incubação "in vitro" na presença de ecdisterona

Em todos os experimentos foi utilizada ecdisterona (Rohto Pharmaceutical Co. Ltd.) numa concentração de $2 \times 10^{-4}\text{M}$, feita a partir de uma solução estoque de $2 \times 10^{-2}\text{M}$. A solução estoque era preparada dissolvendo-se a quantidade desejada do hormônio em 1/20 do volume final de etanol e complementando-se com água destilada. Em todos os experimentos de incubação, enquanto uma glândula do par era incubada na presença do

hormônio, a outra era incubada na presença do solvente deste, para servir como controle.

1.2- Incubação "in vitro" na presença de alfa-amanitina

Nesses experimentos, foram utilizadas glândulas salivares de larvas em período L7. O par de glândulas de cada larva era incubado por 30 minutos em 2 μ l de meio de cultura isento de hormônio e acrescido de alfa-amanitina (Boehringer Mannheim GmbH), em uma concentração de 10 mg/ml. Em seguida, uma das glândulas do par era transferida para uma gota de meio de cultura contendo alfa-amanitina (10 mg/ml) e ecdisterona $2 \times 10^{-4}M$, e incubadas por 4 horas. A outra glândula do par era incubada em meio contendo apenas ecdisterona $2 \times 10^{-4}M$, também por 4 horas.

2- Preparações de cromossomos corados com Orceína

As porções S1 e S2 das glândulas salivares eram separadas do resto do material da larva e fixadas em etanol-ácido acético (3:1) por 5 minutos. Em seguida, o material era transferido para uma gota de ácido acético a 50%, sobre uma lamínula. Após 1 minuto, uma gota de orceína láctico-acética a 2% era, então, adicionada ao ácido acético

contendo a glândula. A lamínula era então, virada sobre uma lâmina e o conjunto esmagado entre duas porções de papel de filtro. As bordas da lamínula eram vedadas com esmalte e as preparações citológicas mantidas no refrigerador até serem examinadas. Em alguns casos, as preparações foram tornadas permanentes pelo seguinte processo:

- remoção da lamínula em Nitrogênio líquido;
- banho em etanol por 10 minutos;
- secagem;
- banho em Xilol;
- retirada do excesso de Xilol e montagem com Verniz Cristal Ipiranga
- secagem à temperatura ambiente

3- Extração de RNA total

As larvas eram dissecadas em PBS e as glândulas salivares estocadas, congeladas em Nitrogênio líquido até atingir-se a quantidade desejada. As glândulas eram então digeridas por 2 horas a 37°C em uma solução contendo Pronase (1 mg/ml), SDS (0,4%), Tris (10 mM) e EDTA (1 mM) pH 6.8. Após a digestão era adicionado à mistura 1 volume de Fenol-Clorofórmio 1:1 e o conjunto era agitado por 20 minutos. A fase

aquosa era separada por centrifugação (15 minutos a 16.000 g), transferida para um outro tubo e tornada 0,1 M de Cloreto de Sódio. Os ácidos nucleicos eram precipitados com 2,5 volumes (da solução aquosa) de Etanol Absoluto gelado por, no mínimo, 2 horas a - 20°C. O precipitado era recolhido por centrifugação (15 minutos a 16.000 g), seco ao ar e ressuspensão em uma solução 10 mM de Tris e 5 mM de $MgCl_2$, pH 7.5. A solução era submetida a digestão com DNase (RNase "free") na concentração de 50 ul/ml por 15 minutos, a 20°C e a mistura extraída com 1 volume de Fenol-Clorofórmio 1:1, como descrito anteriormente. A fase aquosa era separada por centrifugação (15 minutos a 16.000 g) e tornada 0,1 M de NaCl. O RNA era precipitado pela adição de 2,5 volumes (da solução aquosa) de Etanol Absoluto gelado por, no mínimo, 2 horas a -20°C.

4- Separação de RNA poliadenilado

O RNA total era dissolvido em 10 mM de Tris, 0,5 M de KCl pH 7.5 e submetido a cromatografia de afinidade em coluna de oligo dT-celulose, seguindo basicamente o método descrito por Aviv & Leder (1972). Segundo esse método, na presença de uma solução tampão (10 mM de Tris) de alta força iônica (0,5 M de KCl), apenas o RNA ribossômico é eluído da coluna. Com a diminuição da força iônica para um valor intermediário (0,1 M

KCl) é eluído o RNA de baixo peso molecular. O RNA poliadenilado fica retido na coluna devido ao emparelhamento da cauda de poli A aos segmentos de oligo dT e só é eluído quando a coluna é submetida ao tampão de baixa força iônica (10 mM de Tris).

O RNA poliadenilado, eluído da coluna sob baixa força iônica era precipitado pela ação de 2,5 volumes de Etanol Absoluto gelado, após a solução ter sido tornada 0,1 M em NaCl, como mencionado anteriormente.

5. Hibridização "in situ"

5.1 - Hibridização com RNA endógeno

As glândulas salivares eram fixadas em etanol-ácido acético (3:1) por 5 minutos. Em seguida, as glândulas eram transferidas para uma gota de ácido acético 50% e mantidas por 10 minutos sobre uma superfície aquecida a 40°C. Após a incubação a quente, as glândulas eram esmagadas entre lâmina e lamínula, as preparações congeladas em Nitrogênio líquido e as lamínulas retiradas com auxílio de uma lâmina de barbear. Após remoção das lamínulas, as preparações eram imediatamente mergulhadas em Etanol Absoluto gelado e mantidas por, no

mínimo, 2 horas a -20°C , antes de serem processadas para imunofluorescência.

5.2- Hibridização com RNA exógeno

Nesse caso, foi utilizado o procedimento básico descrito em Bonner & Pardue, 1976 com algumas modificações. As glândulas salivares eram fixadas em etanol-ácido acético (3:1) por 5 minutos. Em seguida, as glândulas eram transferidas para uma gota de ácido acético 50% e esmagadas entre lâmina e lamínula. Após congelamento em Nitrogênio líquido, as lamínulas eram removidas e a preparação mantida em Etanol a -20°C por, no mínimo, 4 horas. As preparações eram, então, lavadas em 2xSSC (NaCl 0,30 M e Citrato de sódio 30 mM) (3 banhos de 10 minutos cada) antes de serem submetidas ao tratamento com RNase. Para esse tratamento, uma gota de 20 μl de uma solução 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase A em 2xSSC era colocada sobre uma lamínula, virada sobre uma lâmina contendo a preparação cromossômica ainda úmida da última lavagem com 2xSSC. As preparações contendo RNase permaneciam, então, 2 horas a 37°C em uma câmara úmida, após o que eram lavadas em 2xSSC (3 banhos de 10 minutos cada). Após a lavagem, as preparações eram submetidas a um banho em 2xSSC a 70°C por 30 minutos e uma lavagem rápida em 2xSSC à temperatura ambiente. A denaturação do DNA cromossômico era feita pela

Imersão das preparações em uma solução 0,07N de NaOH por um minuto, seguido de um banho em 0,1xSSC e 3 outros banhos de 10 minutos cada, em 2xSSC gelado. Após esse procedimento, cada preparação ainda úmida era virada sobre uma lâmina contendo uma gota de 20 µl de uma solução de RNA exógeno em 2xSSC ou 2xTNS (Tris 0,02 M e NaCl 0,3 M). As preparações eram incubadas em câmara úmida por 18 a 24 horas, a 63°C.

6- Detecção de híbridos DNA/RNA por imunofluorescência indireta

Os híbridos DNA/RNA produzidos como descrito no item anterior foram detectados através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando-se soro de cabra imunizado com poli A/dT (Kitagawa & Stollar, 1982) e um segundo anticorpo anti IgG de cabra conjugado com FITC. Nesse processo, as preparações eram lavadas em PBS (3 banhos de 10 minutos cada), viradas sobre uma lâmina contendo 20 µl do anticorpo diluído 1/20 em PBS e incubadas em câmara úmida a 37°C por uma hora. Em seguida, as lâminas eram retiradas com uma rápida lavagem em PBS e as preparações submetidas a 3 banhos em PBS (10 minutos cada). Procedia-se, então, a incubação com 20 µl de uma mistura do segundo anticorpo (diluído 1/40 em PBS) e Azul de Evans 0,5% (diluído 1/400 em PBS) nos moldes da primeira incubação. Após essa incubação, as

preparações eram lavadas em PBS (3 banhos de 10 minutos cada), e cada uma foi virada sobre uma lamínula contendo 10 µl de uma solução de Glicerol- PBS (9:1), esmagada levemente entre papel de filtro e analisada em microscópio de epifluorescência. Nas diversas etapas do procedimento descrito acima, foi evitada a secagem do material.

7- Eletroforese de proteínas

7.1- Preparação das amostras

As glândulas a serem submetidas a eletroforese eram fixadas em TCA 10% por 30 minutos, a 4°C, lavadas por 10 minutos em etanol 70%, seguida de uma mistura de etanol 95% e clorofórmio (1:1) e secas em estufa, a 37°C. A cada amostra eram, então, adicionados 15 µl de Tampão de Amostra (0,01 M de tampão fosfato, pH 6,9; 1% SDS; 0,1% de Mercaptoetanol e 4M de Uréia. A mistura era fervida por 2 minutos a 100°C e 5µl do volume restante eram acrescidos de uma solução contendo 1µl de Azul de Bromofenol e 1µl de Mercaptoetanol e submetidos a eletroforese. Em diversos casos, outros 5 µl eram utilizados para a dosagem de proteínas solúveis.

7.2- Eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS

A separação eletroforética dos polipeptídeos das glândulas salivares de larvas de Trichosia pubescens foi realizada em placas verticais de 1 mm de espessura com géis de poli(acrilamida e SDS (Laemmli, 1970, modificado por MacGillivray & cols., 1972). O gel de separação (poros finos) era preparado misturando-se 1 volume da Solução A (48 ml de HCl 1M; 3,6 g de Tris; 0,23 ml de TEMED e água destilada para 100 ml; pH 8,9) com 3 volumes da Solução B (40 g de acrilamida; 0,6 g de bis-acrilamida e água destilada para 100 ml), 4 volumes da Solução C (8M de uréia; 0,2% de SDS e água destilada para 100 ml) e 0,014 g de Persulfato de Amônio. Após 2 horas de polimerização, era preparado o gel de empacotamento (poro grosso) pela mistura de 1 volume da Solução D (48,0 ml de HCl; 5,98 de Tris; 0,23 ml de TEMED e água destilada para 100 ml, pH 6,7), 2 volumes da Solução E (10 g de acrilamida; 2,5 g de bis-acrilamida e água destilada para 100 ml), 1 volume da Solução F (4mg de Riboflavina e água destilada para 100 ml) e 4 volumes da Solução C. A mistura era colocada sobre o gel de separação e um pente (feito de acetato ou acrílico com 1 mm de espessura) para a formação dos poços de aplicação das amostras. Após a polimerização do gel superior (não mais que 1 hora) o pente era retirado e a placa montada em uma cuba vertical, na qual era adicionado o tampão de corrida. Esse tampão consistia

de 3 g de Tris, 14,4 g de Glicina e 1 g de SDS, completado para o volume de 1 litro com água destilada.

A eletroforese era realizada em geladeira (4°C), com amperagem constante de 12 mA. Após a corrida, os géis eram fixados por 1 hora em uma mistura de partes iguais de Metanol e ácido acético a 20%. Os géis eram, em seguida, corados com Coomassie Blue (0,5% do corante em ácido acético 7%) por 2 horas e diferenciados em banhos sucessivos de uma solução contendo metanol, ácido acético e água (300:70:630).

7.3- Determinação dos pesos moleculares

Para estimarmos os pesos moleculares dos polipeptídios, foram corridas em paralelo misturas de proteínas de pesos moleculares conhecidos (Fosfatase b, 94.000 d; Albumina Bovina, 67.000 d; Catalase, 60.000 d; Piruvato quinase, 57.000 d; Ovoalbumina, 43.000 d; Lactato Desidrogenase, 36.000 d; Anidrase Carbônica, 30.000 d; Quimotripsina, 25.700 d; Inibidor de Tripsina, 20.000 d; Mioglobina, 17.200 d). Essas proteínas eram dissolvidas em Tampão de Amostra e a mistura aquecida a 100°C por 2 minutos antes de ser submetida à eletroforese.

7.4- Incorporação de aminoácidos radioativos "in vitro"

Para a análise das frações polipeptídicas recém-sintetizadas, as glândulas salivares eram incubadas em Solução Salina (NaCl 36 mM, KCl 52 mM, CaCl₂, pH 6,8) contendo uma mistura de aminoácidos radioativos (New England Nuclear L-(¹⁴C(U); 55,0 mCi/matom carbon, 0,1 mCi/ml). Em dois experimentos foi utilizado como precursor radioativo L-Leucina ³H (Schwartz Mann, sp.act.55 Ci/mM). Em todos os casos, 1 µl do precursor era seco a vácuo sobre parafilme e, em seguida, dissolvido por 30 minutos com 1 µl de solução salina. Uma glândula era, então, incubada nessa gota, em câmara úmida, à temperatura ambiente por 30 minutos.

8. Fluorografia

Após a eletroforese os géis eram corados, diferenciados e tratados para fluorografia, segundo método descrito por (Bonner & Laskey, 1974). Esta técnica consiste na desidratação do gel em dois banhos com DMSO por 30 minutos cada, seguidos por embebição em uma solução de PPO 22,2% em DMSO, por 4 horas, e precipitação do PPO por lavagem do gel em 2 banhos de água destilada por 1 hora. Esse processo era feito à temperatura ambiente em uma capela e sob agitação constante. Os géis eram, então, secos sob vácuo à temperatura de 80°C, cobertos com filme de Raio X (XR-1, X-Omat, R da Kodak) e

mantidos por diferentes períodos de tempo (até 30 dias) em exposição a -80°C . As chapas foram reveladas segundo indicações do produtor do filme e fotografadas.

9. Quantificação das proteínas solúveis nas amostras de eletroforese

A dosagem das proteínas presentes em alíquotas das amostras submetidas à eletroforese foi feita utilizando-se o "kit Protein Assay" da Bio-Rad, o qual se baseia em método descrito por Bradford (1976). Nesse caso, uma alíquota de 5 μl era retirada de cada amostra antes da colocação do corante. A essa alíquota eram acrescentados 395 μl de água e 100 μl do reagente Bio-Rad e as leituras foram feitas a um comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Beckmann, modelo ACTA III. As curvas padrões foram construídas com diluições sucessivas de soluções de Albumina Bovina (Sigma). Essas determinações mostraram que a quantidade de proteína nos 5 μl de amostra aplicados no gel era da ordem de $8 \pm 0,8 \mu\text{g}$.

10. Análise densitométrica dos fluorogramas

Para essa análise, as chapas fluorográficas eram cortadas em tiras correspondentes a cada amostra submetida a eletroforese. Para cada uma dessas tiras era, inicialmente

determinada a menor absorbância a 500 nm em espectrofotômetro Beckmann modelo ACTA III. Em seguida, o aparelho era calibrado, sendo esse menor valor normalizado para um valor padrão utilizado para todas as leituras. Cada tira de fluorograma era então submetida a um "scanning" com velocidade de leitura, de avanço do papel e da pena controladas. Assim, era obtido um densitograma para cada amostra de glândula salivar submetida a eletroforese.

A área total e dos picos de absorção dos diversos densitogramas foi determinada utilizando-se um Planímetro. O valor relativo final dos picos de absorbância, correspondente aos diferentes polipeptídios separados por eletroforese, e expresso em porcentagem, foi conseguido através da seguinte relação:

$$\text{valor relativo de um pico de absorção} = \frac{\text{área da região}}{\text{área total do densitograma}} \cdot 100\%$$

RESULTADOS

1. O padrão de síntese de polipeptídios das glândulas salivares varia sequencialmente no fim do quarto estágio em paralelo a alterações no padrão de pufes.

Foram realizados experimentos com o objetivo de determinar o padrão de síntese de polipeptídios das glândulas salivares de larvas entre os períodos L3 e P3 do desenvolvimento larval. Nesses experimentos, as larvas eram separadas em períodos, segundo as características morfológicas externas. Essa classificação era depois confirmada pela análise citológica do padrão de pufes de uma das glândulas do par, enquanto a outra era utilizada para eletroforese.

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 estão apresentados os fluorogramas de separações eletroforéticas dos polipeptídios de glândulas salivares de larvas em diferentes períodos do desenvolvimento entre L3 e P3. Pode-se verificar que o padrão de síntese é bem constante entre os períodos L3 e L5 e passa a variar drasticamente a partir desse ponto. Entre L5 e P1, o padrão de síntese é dominado por uns poucos polipeptídios que formam manchas muito fortes de marcação, principalmente na

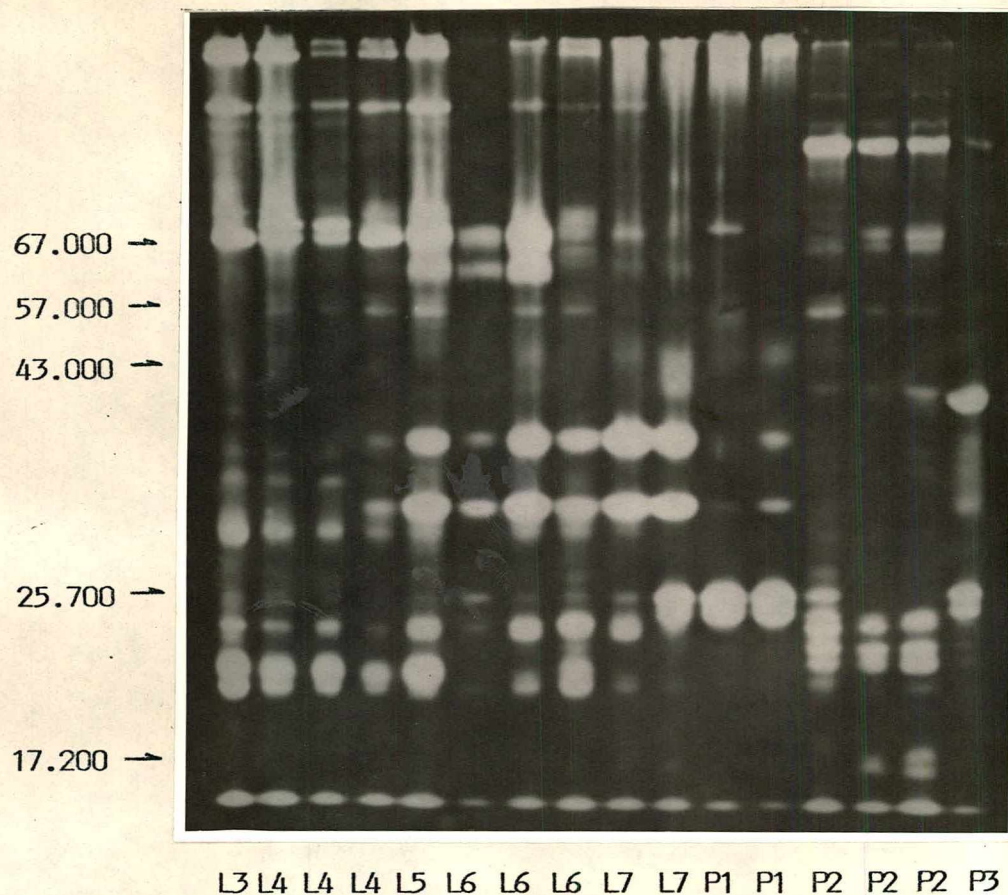


Figura 1- Fluorograma de eletroforese de glândulas salivares de Trichostia pubescens em diferentes períodos do desenvolvimento no fim do quarto estágio larval, marcadas "in vitro" com L-leucina ^3H . As setas indicam a posição das proteínas de pesos moleculares conhecidos.

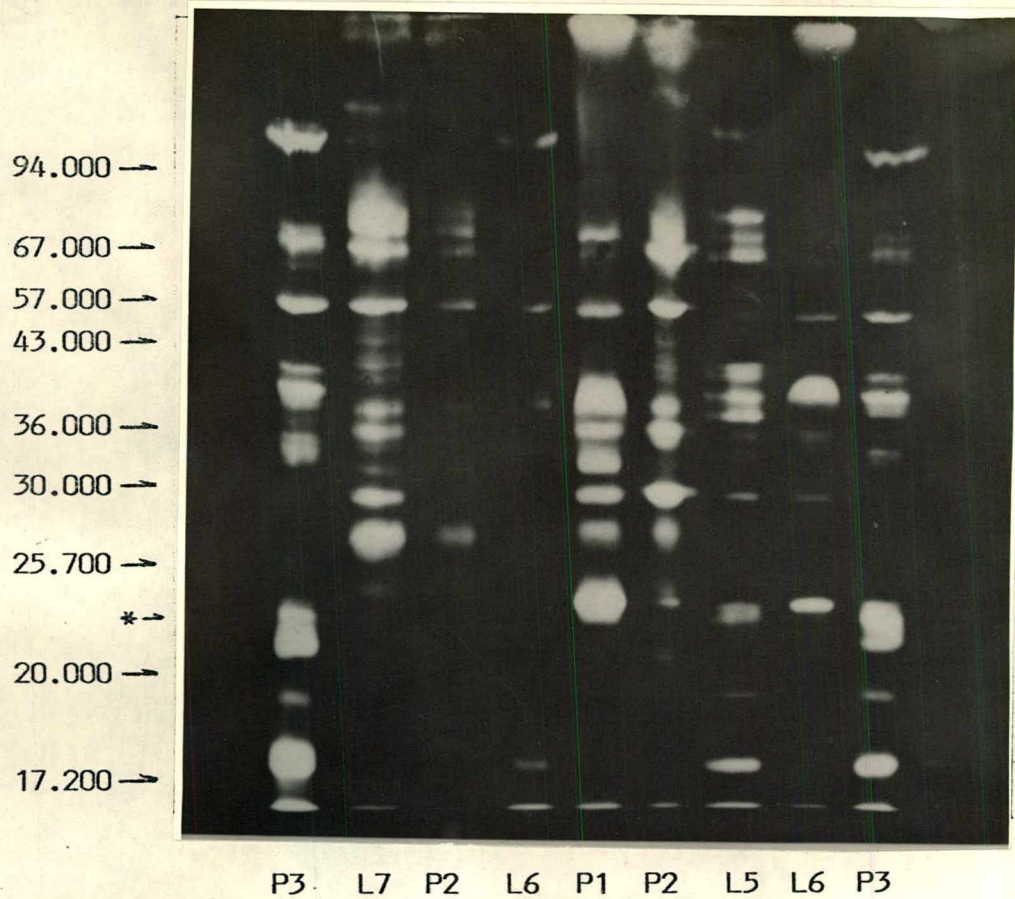


Figura 2- Fluorograma de eletroforese de glândulas salivares de Trichosia pubescens em diferentes períodos do desenvolvimento no fim do quarto estágio larval, marcadas "in vitro" com uma mistura de aminoácidos L- ^{14}C . As setas indicam a posição das proteínas de pesos moleculares conhecidos.

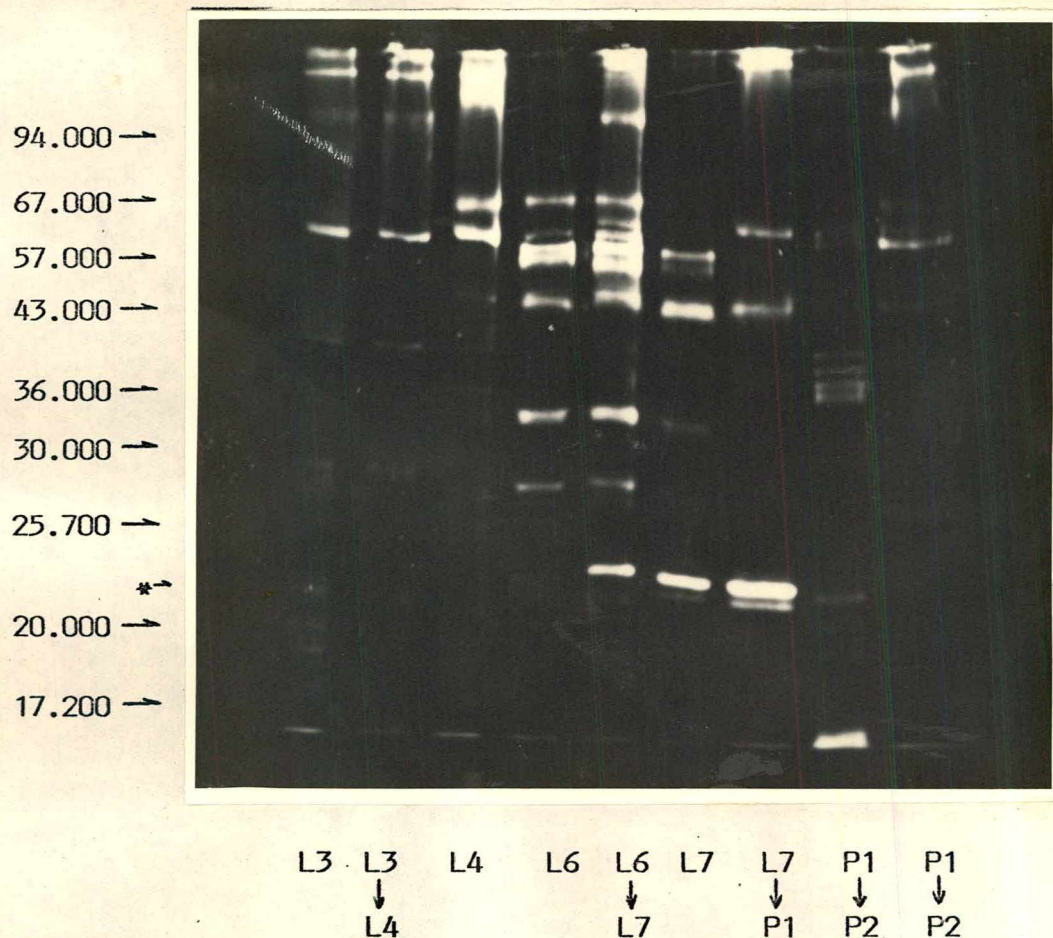


Figura 3- Fluorograma de eletroforese de glândulas salivares de Trichostia pubescens em diferentes períodos do desenvolvimento no fim do quarto estágio larval, marcadas "in vitro" com uma mistura de aminoácidos L- ^{14}C . As setas indicam a posição das proteínas de pesos moleculares conhecidos.

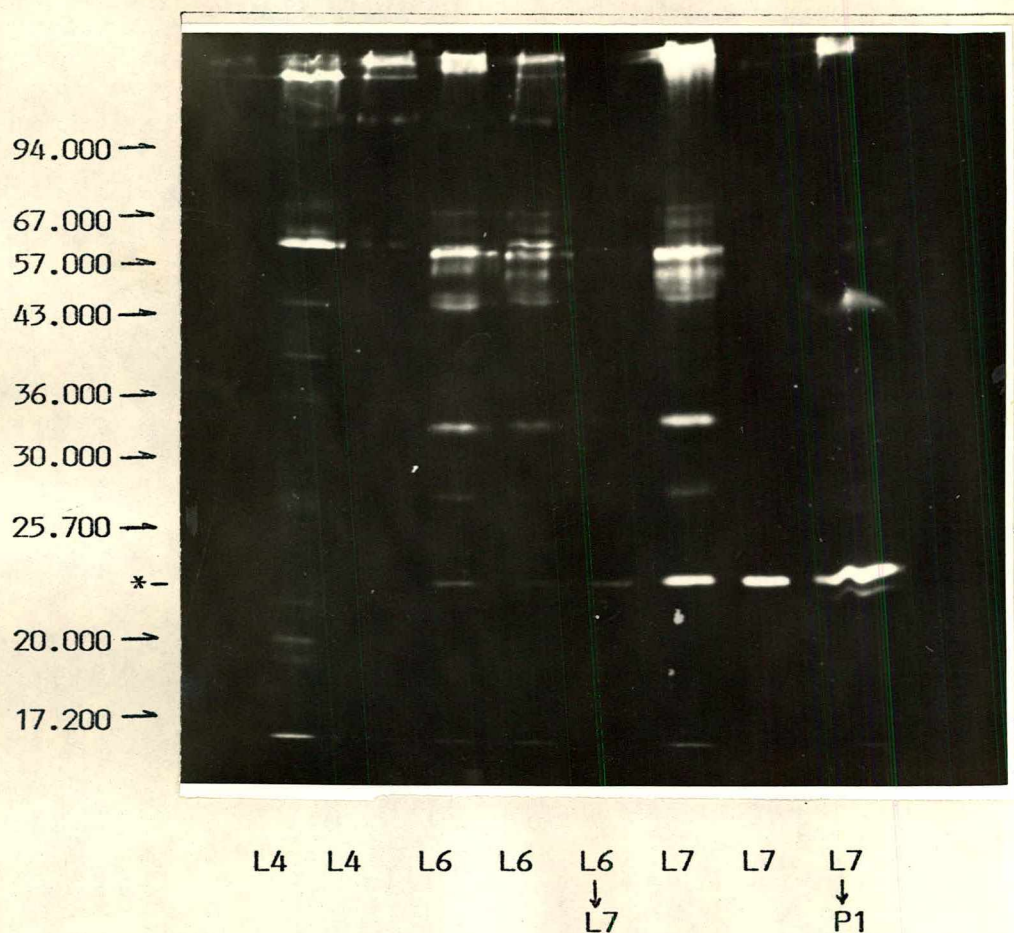


Figura 4- Fluorograma de eletroforese de glândulas salivares de Trichosia pubescens em diferentes períodos do desenvolvimento no fim do quarto estágio larval, marcadas "in vitro" com uma mistura de aminoácidos L- ^{14}C . As setas indicam a posição das proteínas de pesos moleculares conhecidos.

região de baixo peso molecular. Em alguns casos, pode-se verificar polipeptídios que começam a ser sintetizados em pequena quantidade, nos períodos mais jovens, aumentam muito nos períodos subsequentes, para diminuir logo em seguida. Com relação a certas frações, todo esse processo ocorre entre três períodos consecutivos do desenvolvimento larval, cuja duração é de poucas horas.

Os resultados obtidos mostram nitidamente a constância de síntese de vários polipeptídios ao longo de grande parte do desenvolvimento larval como, por exemplo, os de aproximadamente 90.000 d, 70.000 d e 57.000 d. É evidente, ainda, a variação contínua de grande número de polipeptídios. Dois exemplos dessa variação são mostrados nas Figuras 3 e 4, com relação a um polipeptídio de aproximadamente 25.000 d que começa a ser sintetizado em L6, aumenta até P1 e desaparece entre P2 - P3.

A análise dos cromossomos das glândulas salivares utilizadas nos experimentos de síntese de proteínas, mostrou que, no período estudado, ocorrem grandes alterações no padrão de pufes, com a regressão de grande parte dos pufes antes ativos e o aparecimento de um grande número de novos. Esses pufes expandem e regridem em uma ordem sequencial definida, e

muitos deles atingem grandes dimensões. Assim, foi possível relacionar os padrões específicos de pufes com os diferentes períodos do desenvolvimento larval.

A partir do fim do período L3, as faixas que originam os pufes de DNA começam a sofrer aumento de espessura. Esses pufes, no entanto, só começam a se expandir um pouco mais tarde, no fim do período L4 e início de L5. As principais variações no padrão de pufes de DNA que ocorrem a partir do fim do período L3, são apresentadas no esquema da Figura 5. Pode-se verificar que cada pufe permanece expandido durante um curto espaço de tempo que, em alguns casos, é de apenas umas poucas horas dentro de um único período do desenvolvimento.

2. As alterações no padrão de pufes no fim do quarto estágio são dependentes da presença contínua de ecdisterona.

Para testarmos o efeito da ecdisterona sobre os pufes de DNA foram realizados experimentos de incubação "in vitro" de glândulas salivares, em diferentes períodos do desenvolvimento, em meio de cultura acrescido do hormônio. Nesses experimentos, enquanto as porções S1 e S2a de uma glândula salivar era incubada "in vitro" na presença de ecdisterona por 4 horas, o segmento correspondente na outra glândula do par permanecia o

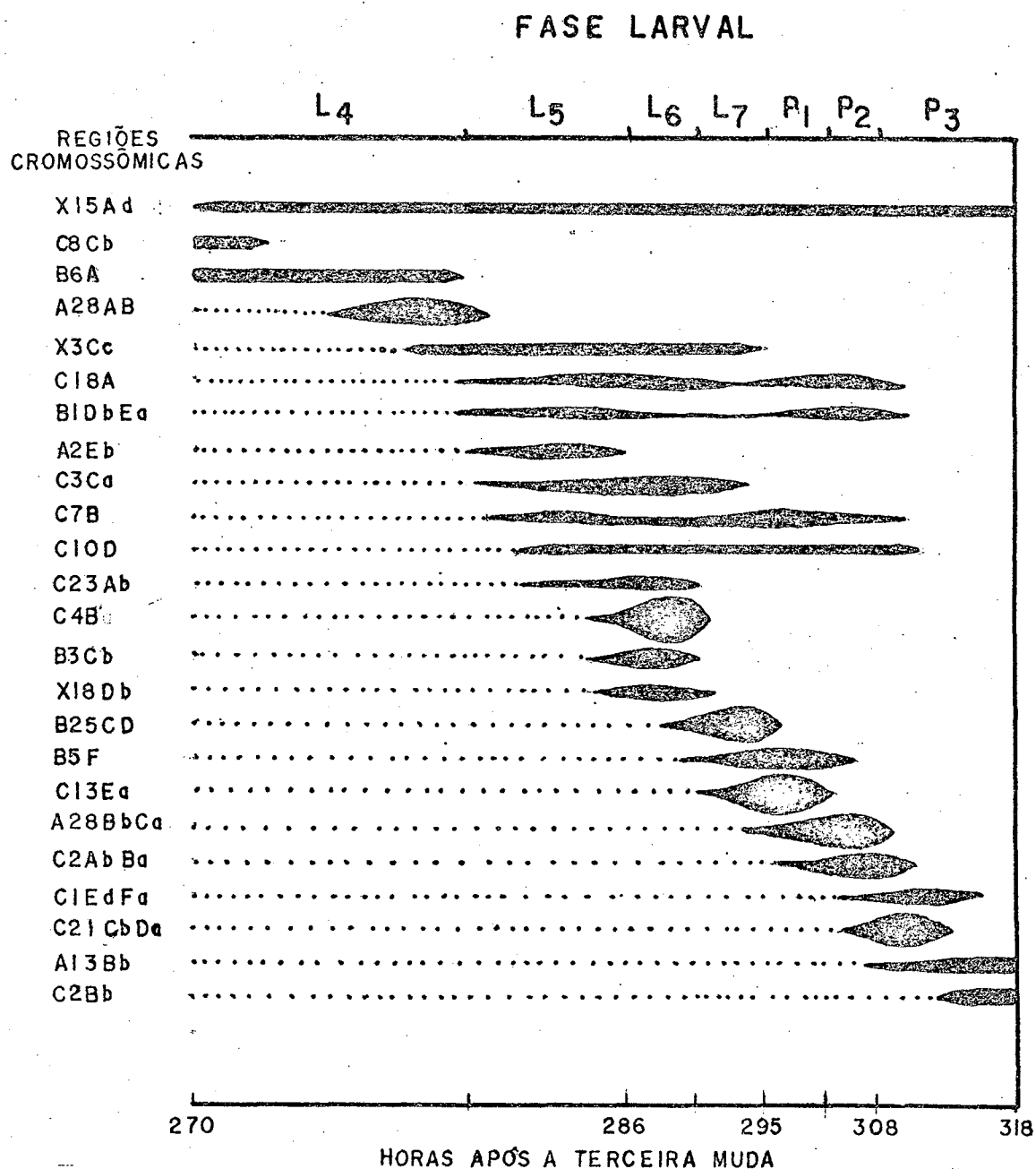


Figura 5- Representação esquemática do comportamento dos maiores pufes de DNA que ocorrem na região 51 de glândulas salivares de *Trichosia pubescens*, durante o fim do quarto estágio larval. A espessura das figuras indica o grau relativo de expansão dos pufes.

mesmo tempo em meio de cultura acrescido apenas do solvente do hormônio. As porções S2b das glândulas incubadas na presença e ausência do hormônio foram fixadas imediatamente após a dissecação e utilizadas para determinação do período do desenvolvimento das larvas utilizadas.

Nos experimentos aqui relatados foi utilizada apenas a concentração de $2 \times 10^{-4} M$ de ecdisterona. Essa concentração foi escolhida pois, em experimentos anteriores de injeção de ecdisterona em larvas em L1 (Amabis, 1977; Amabis & Amabis, 1984a) e de indução de pufes de DNA "in vitro" (Ferreira, 1981), foi a que proporcionou os melhores resultados. Da mesma forma, o meio de cultura utilizado foi o Tp (*Trichosia pubescen*); o melhor para incubação de glândulas dessa espécie, segundo resultados de Barbosa (1984). Quanto ao tempo de 4 horas para a maioria das incubações "in vitro", a escolha foi baseada em resultados anteriores (Ferreira, 1981) que mostraram ser esse tempo o ideal para induzir pufes de DNA como o A2BbCa, que foi o mais estudado nesse trabalho.

Em preparações citológicas das porções S1 e S2a de glândulas salivares, coradas com orceína, foi possível detectar-se 24 faixas que sofrem amplificação gênica ao longo dos diferentes períodos do desenvolvimento, entre L3 e P3. Essas regiões cromossômicas foram caracterizadas como sítios

de amplificação pelo aumento desproporcional da quantidade de DNA, visualizado pelo engrossamento e aumento de coloração das faixas em questão, em relação a faixas vizinhas.

Na Tabela 2, pode-se verificar o efeito da incubação de glândulas em meio de cultura isento de hormônio, sobre o padrão de pufes da porção S1 de glândulas em diferentes períodos do desenvolvimento. Dos locos que sofrem amplificação, não foram observados pufes nas seguintes regiões: A2Eb, A13Bb, C1Ed, C3Ca, C8Da, C23Ab e X18Db. Na Tabela 3, visualiza-se o efeito da incubação de glândulas em meio de cultura acrescido do hormônio. Dos locos que sofrem amplificação gênica, não foram observados os pufes: A2Eb, A13Bb, B6A, C1Ed, C3Ca, C23Ab e X18Db.

Um fato interessante é o do pufe B6A ter sido induzido em glândulas incubadas na ausência de ecdisterona e não ter sido detectado em glândulas incubadas na presença do hormônio.

Uma análise comparativa das Tabelas 2 e 3 nos mostra que, na grande maioria dos casos, na presença de ecdisterona, os pufes são precocemente induzidos, em relação ao que acontece na ausência do hormônio.

Tabela 2- Principais regiões cromossômicas que originam pufes de DNA em T. pubescens e seu grau de expansão na porção S1 de glândulas salivares de larvas em diferentes períodos do fim do quarto estágio larval e (C= Controle), e após tratamento "in vitro na presença do solvente da ecdisterona por 4 horas (T=Tratadas). Os números 1,2 e 3 representam respectivamente pequeno, médio e máximo grau de expansão do pufe. A ausência de numeração significa que o pufe não estava presente.

=====														
Grau de expansão nos diferentes períodos														
Regiões cromossômicas analisadas	L4		L5		L6		L7		P1		P2		P3	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
X15Ad	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1
C8Cb														
B6A	3	2		1										
A28AB	3	1		1		1								
X3Cc	2	2	3	1	3	1	3	1	3		3		3	
C18A			2	2	3		1		2		2			
B1DbEa			2		3	1	1		1		2	1		1
A2Eb			3											
C3Ca			1		2		3							
C7B			2	1	1	1	2	1	3		1			
C10D			1		3	1	3	2	3		3			2
C23Ab					3	1	1	2						
C4B					3	2		2						
B3Cb		1		1	3	1								
X18Db					3		1							
B25CD					1	1	2	3	3	2		1		
B5F							1		3	1	1	3		2
C13Ea						1	2	3	3	2	1	3		
A28BbCa							1		2	2	1	3		1
C2AbBa									1	2	3	2		1
C1EdFa										1	1	2		2
C21CbDa											2			3
A13Bb											1			2
C2Bb										1		3		3

Tabela 3- Principais regiões cromossômicas que originam pufes de DNA em T. pubescens e seu grau de expansão na porção S1 de glândulas salivares de larvas em diferentes períodos do fim do quarto estágio larval e (C= Controle), e após tratamento "in vitro na presença de ecdisterona $2 \times 10^{-4} M$ por 4 horas (T=Tratadas). Os números 1,2 e 3 representam respectivamente pequeno, médio e máximo grau de expansão do pufe. A ausência de numeração significa que o pufe não estava presente.

=====
 Grau de expansão nos diferentes períodos

Regiões cromossômicas analisadas	L4		L5		L6		L7		P1		P2		P3	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
X15Ad	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1
C8Cb										1				
B6A	3													
A28AB	3	1												
X3Cc	2		3		3		3	1	3		3		3	
C18A		1	2		3		1		2		2			
B1DbEa		1	2		3		1		1		2			
A2Eb			3											
C3Ca			1		2		3							
C7B			2	1	1		2	1	3	1	1			
C10D			1	2	3		3		3		3		2	
C23Ab			1		3		1							
C4B				2	3									
B3Cb					3									
X18Db					3									
B25CD					1	2	2		3					
B5F							2	3	3	3	1			
C13Ea			1		2		2	1	3	3	1			
A28BbCa					2		1	3	2	3	3	1	1	1
C2AbBa									1	2	3	2	3	3
C1EdFa											1		3	3
C21CbDa										2	2	3	3	1
A13Bb											1		3	3
C2Bb										1		2	3	

=====

A indução precoce dos pufes em meio de cultura suplementado com ecdisterona é evidente, quando se compara o padrão de pufes das glândulas incubadas com os padrões observados durante o desenvolvimento normal das larvas. Em geral, a glândula incubada por 4 horas na presença de ecdisterona apresenta um padrão de pufes similar ao que ocorreria 1 ou 2 períodos mais tarde no desenvolvimento normal.

A maioria dos pufes de DNA detectados após tratamento "in vitro", na presença e ausência de ecdisterona aparecem tanto na porção S1 quanto na porção S2a das glândulas salivares. Apenas os pufes A28AB e C10D apareceram somente em S1 e o pufe C3Cb somente em S2a. Foi possível observar, pelo menos em relação a alguns pufes, que a expansão inicia-se antes em S2a do que em S1. Da mesma forma, a expansão máxima de vários pufes é atingida antes em S2a do que em S1.

Alguns dos maiores pufes de DNA induzidos "in vitro" na presença de ecdisterona, são apresentados na Figura 6.

3. As alterações no padrão de pufes induzidos pela ecdisterona se refletem no padrão de síntese de polipeptídios. O pufe de DNA A28BbCa, em particular, pode ser correlacionado à síntese de um polipeptídio de 25.000 daltons.

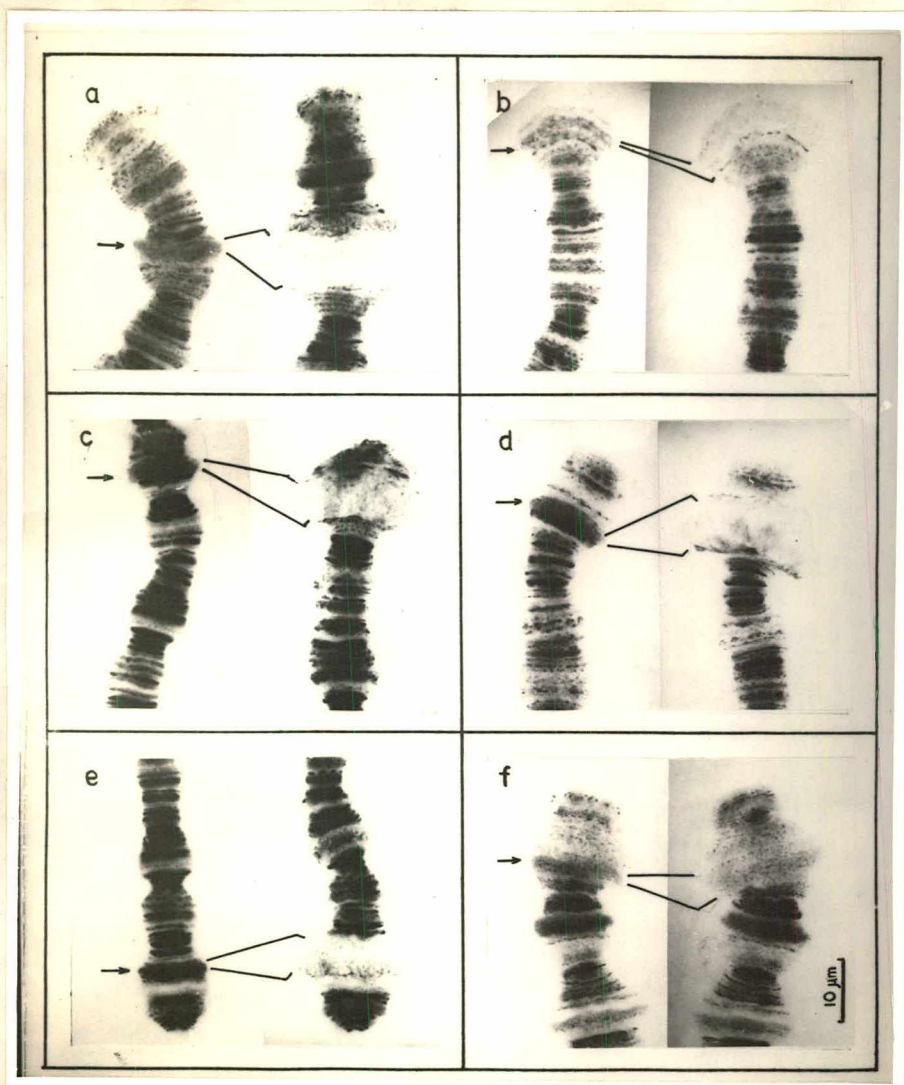
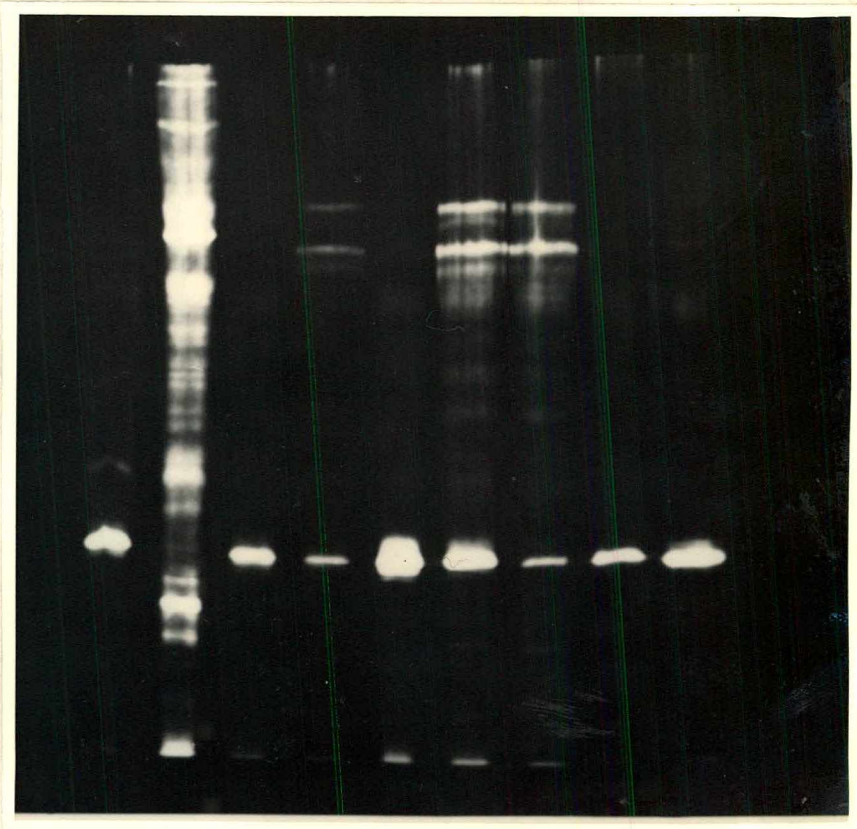


Figura 6- Aspecto de algumas regiões cromossômicas (setas) que desenvolvem pufes de DNA nas glândulas salivares de Trichosia pubescens. Em cada foto, à esquerda, aparece a região no momento da incubação e, à direita, depois da incubação por 4 horas na presença de ecdisterona $2 \times 10^{-4} M$. As fotos apresentam as regiões a) C4B; b) B25CD; c) C13Ea; d) A28BbCa; e) C21CbDa e f) C2Bb, cujos pufes foram induzidos em glândulas em período L5, L6, L6, L7, P1 e P2, respectivamente.

Figura 7- Fluorograma de eletroforese de glândulas salivares de Trichosia pubescens em diferentes períodos do desenvolvimento no fim do quarto estágio larval, incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona $2 \times 10^{-4} M$ e por 30 minutos em uma mistura de aminoácidos $L-^{14}C$. As setas indicam a posição das proteínas de pesos moleculares conhecidos. O quadro apresenta as principais regiões que originam pufes de DNA nos respectivos períodos do desenvolvimento, o tempo de incubação e o tamanho relativo do pufe após a incubação. Os números 1, 2 e 3 representam, respectivamente, pufes com grau relativo de expansão pequeno, médio e máximo. A ausência de numeração significa que o pufe não estava expandido. O * indica a região de 25.000 d.

94.000 →
 67.000 →
 57.000 →
 43.000 →
 36.000 →
 30.000 →
 25.700 →
 25.000* →
 20.000 →
 17.200 →

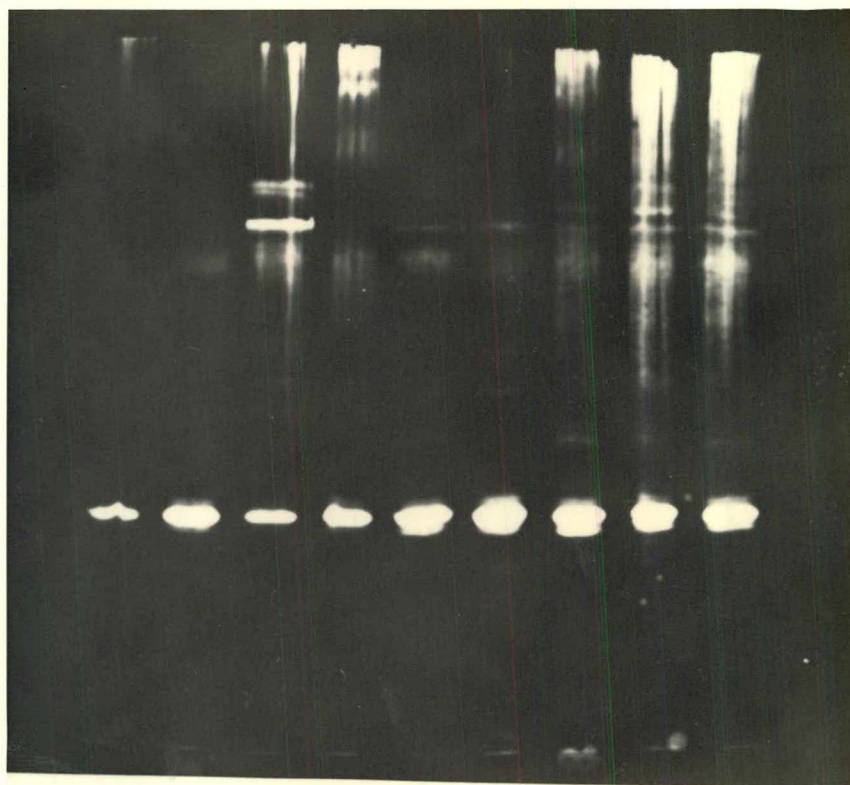


Tempo de Incubação (h) 1 4 1 2 4 2 4 4 4

Pufes de DNA	Tamanho do pufe após incubação								
	1	1	1	2	2	2	1	3	3
A28BbCa	1	1	1	2	2	2	1	3	3
B5F	1		3	2	3				
B25CD	1		2			1		2	1
C2AbBa									
C4B								3	
C13Ea	1		2	2	1	2	1	2	1
C21CbDa			1					1	
Período Larval	L6	L7	L6	L6	L6	L6	L5	L6→L7	

Figura 8- Fluorograma de eletroforese de glândulas salivares de Trichosia pubescens em diferentes períodos do desenvolvimento no fim do quarto estágio larval, incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona $2 \times 10^{-4} M$ e por 30 minutos em uma mistura de aminoácidos L- ^{14}C . As setas indicam a posição das proteínas de pesos moleculares conhecidos. O quadro apresenta as principais regiões que originam pufes de DNA nos respectivos períodos do desenvolvimento, o tempo de incubação e o tamanho relativo do pufe após a incubação. Os números 1, 2 e 3 representam, respectivamente, pufes com grau relativo de expansão pequeno, médio e máximo. A ausência de numeração significa que o pufe não estava expandido. O * indica a região de 25.000 d.

94.000 →
 67.000 →
 57.000 →
 43.000 →
 36.000 →
 30.000 →
 25.700 →
 25.000 * →
 20.000 →
 17.200 →



Tempo de
 Incubação (h)

1 1 1 1 1 2 2 2 2

Pufes de DNA

Tamanho após incubação

A28BbCa	1	1	1	2	1	2	2	3	3
B5F				3				1	1
B25CD			1	1	2	2			
C2AbBa									
C4B									
C13Ea	3	1	1	3	2	2			
C21CbDa				1	1				

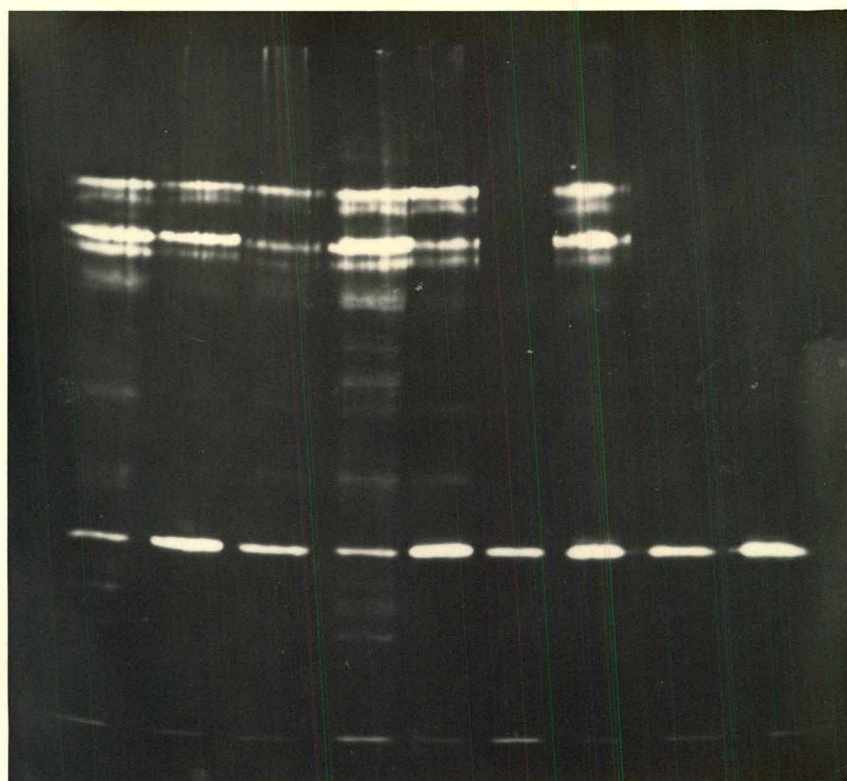
Período Larval

L6 → L7 L7 → P1 L7 L7 L7

Trichosia pubescens

Figura 9- Fluorograma de eletroforese de glândulas salivares de Trichosia pubescens em diferentes períodos do desenvolvimento no fim do quarto estágio larval, incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona $2 \times 10^{-4} M$ e por 30 minutos em uma mistura de aminoácidos $L-^{14}C$. As setas indicam a posição das proteínas de pesos moleculares conhecidos. O quadro apresenta as principais regiões que originam pufes de DNA nos respectivos períodos do desenvolvimento, o tempo de incubação e o tamanho relativo do pufe após a incubação. Os números 1, 2 e 3 representam, respectivamente, pufes com grau relativo de expansão pequeno, médio e máximo. A ausência de numeração significa que o pufe não estava expandido. O * indica a região de 25.000 d.

94.000 →
 67.000 →
 57.000 →
 43.000 →
 36.000 →
 30.000 →
 25.700 →
 25.000* →
 20.000 →
 17.200 →



Tempo de Incubação (h)	2	4	4	4	4	4	4	4	4
---------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Pufes de DNA	Tamanho do pufe após incubação								
--------------	--------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

A28BbCa	1	1	2	2	3	2	3	3
B5F				3		1	3	
B25CD	2	2						
C2AbBa						1		
C4B								
C13Ea	2	3	3					
C21CbDa								

Período Larval	L6	L6	→	L7	L7	L7
----------------	----	----	---	----	----	----

A incubação "in vitro" de glândulas de larvas entre os períodos L5 e P2, na presença de ecdisterona, provoca alterações no padrão de síntese dos polipeptídios. Nas Figuras 7, 8 e 9 são mostrados fluorogramas de eletroforeses de glândulas salivares em diferentes períodos do desenvolvimento larval, após incubação "in vitro", por diferentes intervalos de tempo, na presença de $2 \times 10^{-4} M$ de ecdisterona. Nota-se, nessas figuras, a predominância de síntese de algumas frações polipeptídicas, principalmente uma com cerca de 25.000 d, outra com aproximadamente 60.000 d e uma terceira com aproximadamente 70.000 d. Além dessas faixas bem evidentes, ocorreram, em alguns casos, outras muito mais fracamente marcadas.

Um resultado marcante em todos os fluorogramas de glândulas L5 a P1 incubadas com o hormônio foi a presença, com diferentes intensidades de marcação, do polipeptídio de cerca de 25.000 daltons. O índice de correlação entre a presença desse polipeptídio e a do pufe de DNA A28BbCa, em diferentes graus de expansão, foi de 97,5 %. Em vários casos, quando as larvas encontravam-se em período L7 no momento da dissecação, esse foi o único grande pufe presente nos cromossomos politênicos. Nessa situação, em diversos exemplos, principalmente quando o tempo de incubação "in vitro" foi de 4

horas, um dos únicos polipeptídios claramente marcados nos fluorogramas foi o de 25.000 daltons.

Quando são comparadas as figuras 3 e 4 com as 8 e 9, fica clara a alteração no padrão de síntese de polipeptídios nas glândulas salivares, após incubação "in vitro" na presença de ecdisterona. No caso de glândulas de larvas em período L7, é nítida a diminuição de síntese de uma série de polipeptídios e o aumento de síntese da fração de 25.000 d. Nesse caso, o padrão de síntese se torna semelhante ao de glândulas no período seguinte do desenvolvimento larval (P1 - P2), não incubadas "in vitro".

Os fluorogramas, após terem sido fotografados, foram cortados e as tiras correspondentes a cada amostra de glândula foram submetidas à análise densitométrica. Todos os valores obtidos nessas análises são relativos, uma vez que para cada tira de fluorograma, era feita uma leitura prévia e determinada a D.O. da chapa de Raio X. Em seguida, com base nesse valor, o espectrofotômetro era normalizado para um valor menor de absorbância, previamente estabelecido para todos os fluorogramas.

Na Figura 10a, encontram-se o fluorograma e a correspondente análise densitométrica de uma glândula de larva

caracteristicamente em período L7, incubada "in vitro" na presença de ecdisterona, por 4 horas. Nessa amostra, a única marcação bem definida é a da região de 25.000 d, apesar de na densitometria ocorrer uma outra região de absorvância muito pequena. A absorvância da região de 25.000 d representa, nessa amostra, 34% do total de absorvância do fluorograma. A análise citológica de porções dessa glândula mostrou que, no momento da dissecação, estavam presentes os pufes de DNA C7B, C13Ea, C21CbDa, B25CD e X3C e, após 4 horas de incubação com o hormônio, apenas o pufe A28BbCa, inicialmente ausente, estava presente em grau máximo de expansão; as demais regiões, antes expandidas, agora não apresentavam pufes.

A Figura 10b, apresenta o fluorograma e a correspondente análise densitométrica de uma glândula de larva entre os períodos L6 - L7, incubada "in vitro" por 4 horas, na presença de ecdisterona. Pode-se notar a grande absorvância na região correspondente a 25.000 d e a presença de alguns outros picos bem menores de absorvância. Nesse caso, a absorvância da região de 25.000 daltons representa 30,86 % do total de absorvância do fluorograma. A análise citológica de porções dessa glândula mostrou que, no início da incubação, estavam presentes os pufes de DNA C3Ca, C4Ba (em fase de regressão), C7B, C21CbDa, B25CD (em início de expansão) e X3C. Após 4

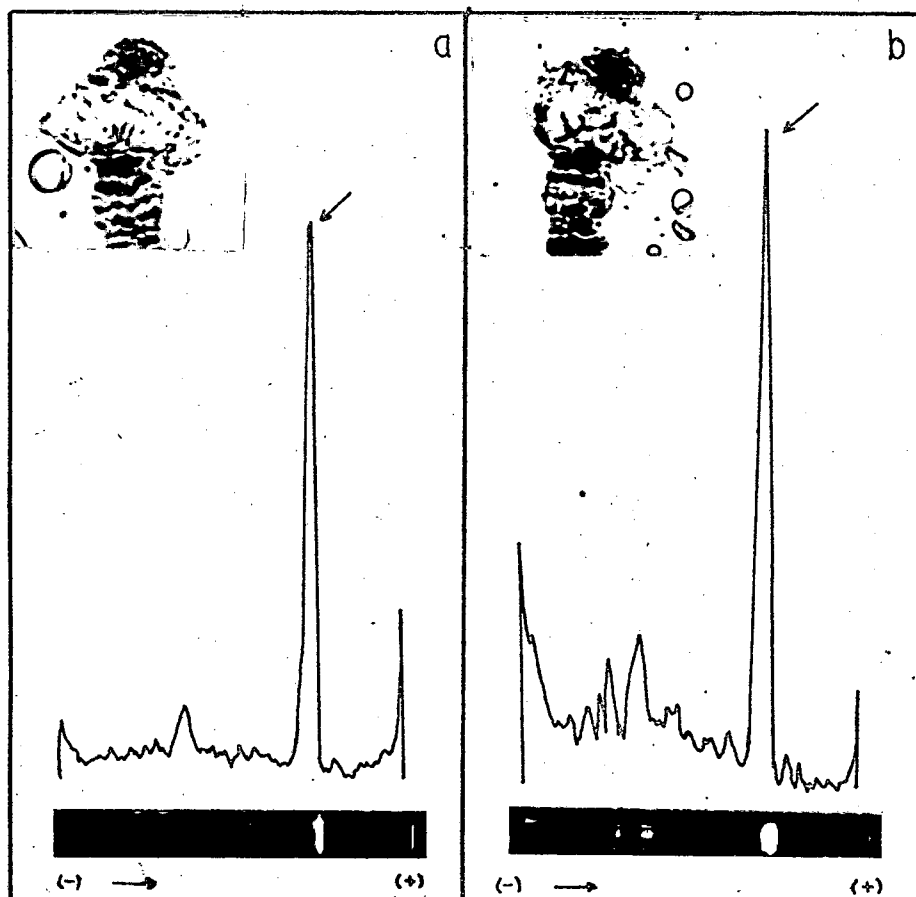


Figura 10- Densitogramas de dois fluorogramas de glândulas de larvas de Trichosia pubescens incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona $2 \times 10^{-4} M$ por 4 horas. Em A) glândula em período L7 e em B) glândula em período L6-L7. Em cada análise encontram-se inseridos o respectivo fluorograma e o aspecto do pufe A28BbCa no momento da eletroforese. A seta indica a região de 25.000 d.

horas de incubação na presença de ecdisterona, estavam presentes, ainda que com pequeno grau de expansão, os pufes C13Ea e B25CD. O pufe A28BbCa, ausente no início da incubação, apresentava-se em grau máximo de expansão.

A fim de melhor comparar os resultados das glândulas incubadas "in vitro", na presença do hormônio, com a situação que ocorre no desenvolvimento normal, foram feitas medidas densitométricas de fluorogramas de glândulas em diferentes períodos do desenvolvimento.

Na figura 11 apresentamos exemplos dessas análises. Nesse caso, os gráficos densitométricos estão ordenados em sequência correspondente aos períodos do desenvolvimento larval entre L6 e P2, justamente aqueles que foram detalhadamente estudados nas incubações "in vitro" e onde ocorre a expansão do pufe A28BbCa. Pode-se observar, nessa figura, a presença do polipeptídeo de 25.000 d e o aspecto da região A28bBCa, em cada uma das amostras de glândula salivar submetida à eletroforese.

No gráfico da Figura 12, estão comparadas as quantidades relativas da proteína de 25.000 d, expressa em % de absorbância da região correspondente, em diferentes períodos do desenvolvimento larval. Pode-se verificar que essa proteína

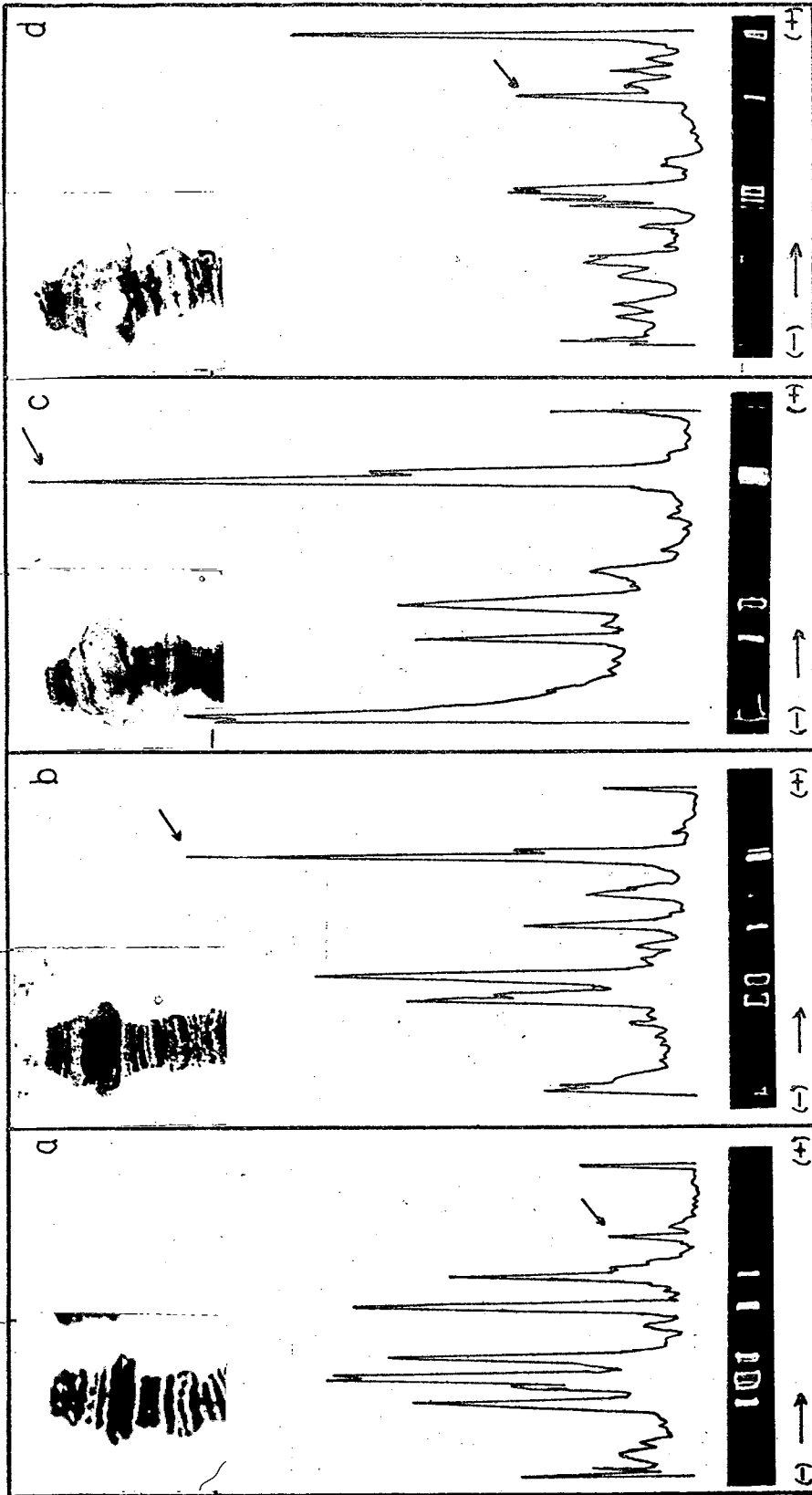


Figura 11- Densitogramas de fluorogramas de glândulas de Trichostema pubescens no fim do quarto estágio larval, nos períodos: a) L6-L7, b) L7-P1, c) P1 e d) P2. Em cada análise encontram-se inseridos o respectivo fluorograma e o aspecto do pufe A28BbCa no momento da eletroforese. A seta indica a região de 25.000 d.

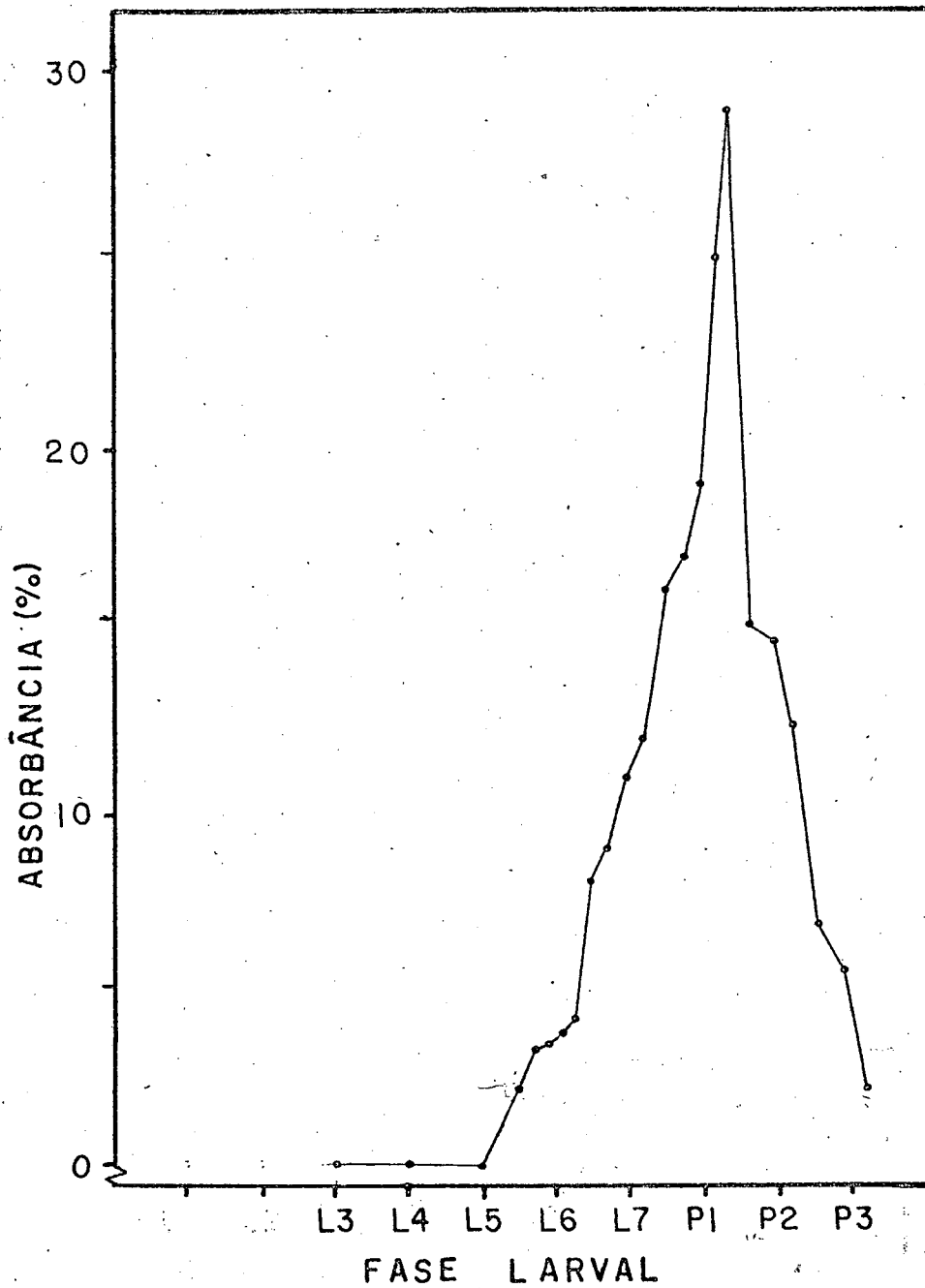


Figura 12- Medidas relativas de densidade óptica da região de 25.000 d, em densitogramas de fluorogramas de glândulas salivares de larvas de Trichosia pubescens, em diferentes períodos do fim do quarto estágio larval.

começa a ser sintetizada entre os períodos L5 e L6, aumenta gradativamente em quantidade até P1 e diminui progressivamente até P3. Todo o ciclo de síntese da proteína de 25.000 dura cerca de 12 a 15 horas.

Em dois experimentos de separação eletroforética de polipeptídios, utilizamos como amostras a secreção salivar de glândulas em diferentes períodos do desenvolvimento. Para a obtenção da secreção, a boca das larvas era tampada com parafina aquecida. Após 2 horas, as larvas eram dissecadas com cuidado, para evitar o rompimento das glândulas e essas eram, então, transferidas para uma gota de solução salina onde eram perfuradas com um estilete. A secreção que extravasava para a gota de salina era aspirada com auxílio de uma micro agulha de vidro. O material recolhido era, então, dissolvido em Tampão de Amostra e tratado para eletroforese da mesma maneira que as glândulas.

Na Figura 13 é apresentado um gel de separação eletroforética dos polipeptídios da secreção salivar, corado com Coomassie Blue. Nesse caso, é possível verificar a presença de um polipeptídio de 25.000 daltons, componente da secreção salivar de larvas entre os períodos L7 e P2 do desenvolvimento. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Benozzati M.L. (comunicação pessoal), que mostram

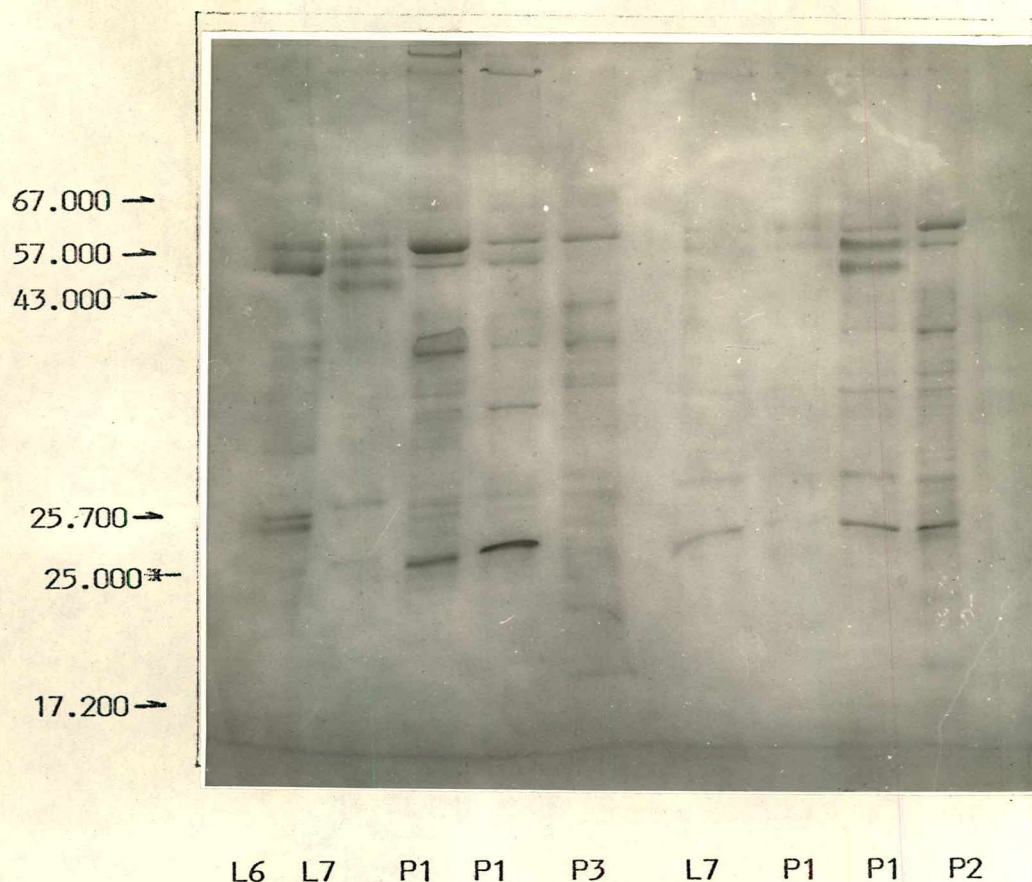


Figura 13- Separação eletroforética dos polipeptídios da secreção salivar de larvas de Trichosia pubescens, em diferentes períodos do fim do quarto estágio larval. As setas indicam as posições das proteínas de peso molecular conhecido. O * indica a região de 25.000 d.

ser o polipeptídeo de 25.000 d um dos componentes da secreção de larvas nesse período do desenvolvimento.

4- A transcrição na região A28BbCa inicia-se antes da expansão do pufe. O produto de transcrição desse pufe é um RNA poliadenilado, muito abundante em células de glândulas L7, incubadas na presença de ecdisterona.

A fim de se detectar a presença de RNA complementar à região A28BbCa, nos períodos anteriores e durante a expansão do pufe, foram utilizadas as técnicas de hibridização endógena e detecção imunológica dos híbridos.

Através dessa metodologia, foi possível verificar que RNA complementar à região A28BbCa está presente naquela região cromossômica a partir do período L5, isto é, cerca de 15 horas antes do início da expansão do pufe (Figura 14). A origem de híbridos endógenos em preparações cromossômicas não está totalmente esclarecida, mas tudo indica que a maior parte deles seja produzida pela hibridização do RNA recém-sintetizado do DNA molde no decorrer do processamento da preparação citológica. Assim, a fixação com ácido acético provocaria a denaturação do DNA cromossômico e, durante as lavagens com PBS, nas regiões ativas, ocorreria hibridização do

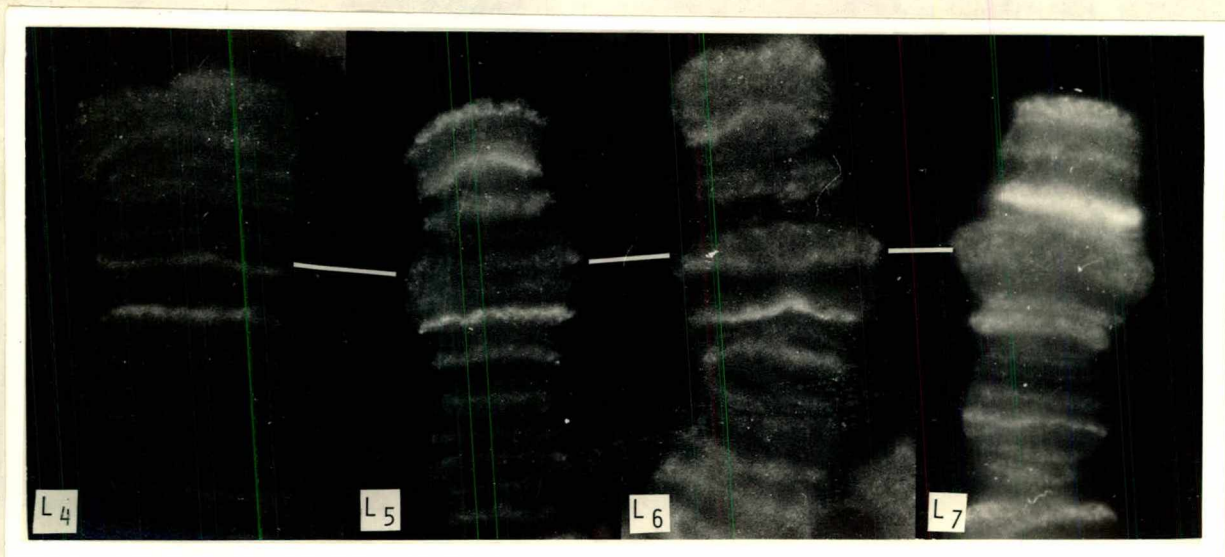


Figura 14- Seção do cromossomo A de Trichosia pubescens em preparações de glândulas salivares de diferentes períodos do desenvolvimento, após hibridização endógena e detecção dos híbridos DNA/RNA por imunofluorescência indireta. O traço indica a região A28BbCa.

RNA recém- sintetizado com o DNA complementar. Essa reação seria muito rápida em consequência, por um lado, da proximidade e talvez mesmo da ligação, através da RNA polimerase, do RNA recém- sintetizado ao DNA molde e, por outro lado, da grande concentração de RNA, quando se considera uma dada região cromossômica que se encontra em atividade.

Os híbridos presentes nas preparações de glândulas em diferentes fases do desenvolvimento foram detectados através de anticorpos específicos. Em preparações tratadas com RNase, a reação com o anticorpo foi totalmente negativa, não só na região A28BbCa como em todas as demais regiões cromossômicas.

Em glândulas de larvas em período L7 incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona e onde o pufe A28BbCa foi induzido a se expandir, foi possível detectar intensa fluorescência nessa região cromossômica, após tratamento para hibridização endógena (Figura 15).

Em glândulas de larvas em período L7, incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona e alfa- amanitina e tratadas para detecção de hibridização endógena, verifica-se que a intensidade de fluorescência na região nucleolar praticamente não se altera, sendo comparável à dos controles não tratados com o inibidor (Figura 16). Já na região do pufe de DNA

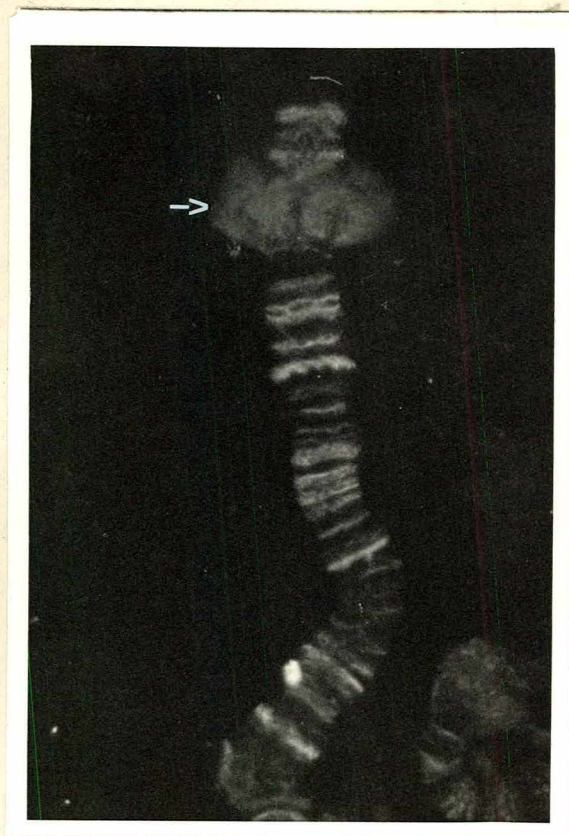


Figura 15- Seção do cromossomo A de Trichosia pubescens apresentando o pufe A28BbCa (seta), induzido a se expandir "in vitro" em glândulas salivares de larvas em período L7, incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona por 4 horas. As preparações foram submetidas a hibridização endógena e os híbridos DNA/RNA detectados por imunofluorescência indireta.

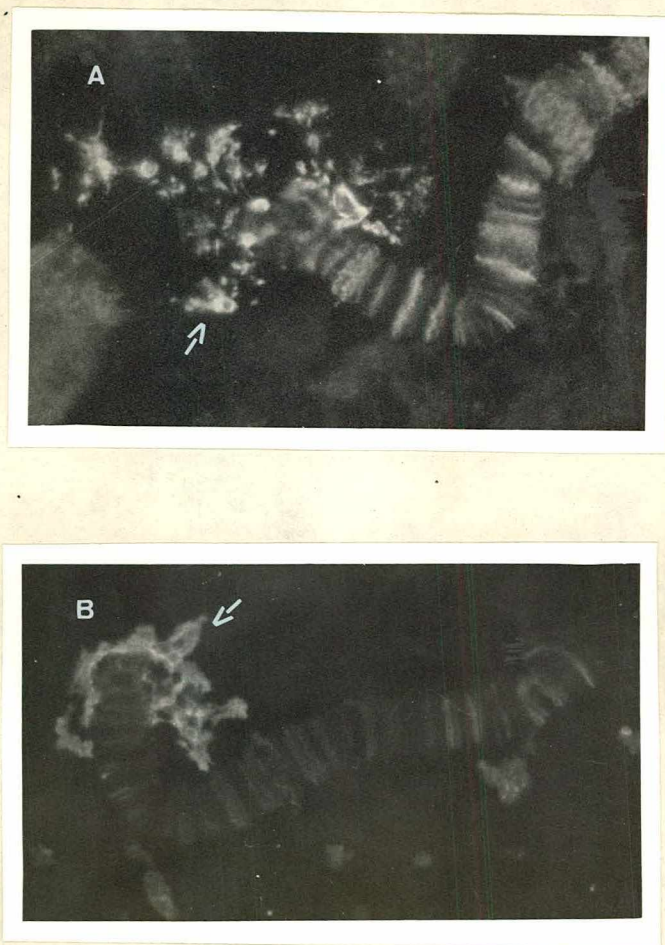


Figura 16- Seção do cromossomo X de Trichosia pubescens apresentando a região organizadora do nucléolo (seta), em glândulas incubadas na presença de : A) ecdisterona, B) ecdisterona e alfa -amanitina. As preparações foram submetidas a hibridização endógena e os híbridos DNA/RNA detectados por imunofluorescência indireta.

A28BbCa a fluorescência diminui muito em relação ao controle não tratado com inibidor e em relação às RONA da mesma preparação. Além disso, como mostra a Figura 17, nessas condições, esse pufe deixa de se expandir. Na verdade, nos experimentos com alfa-amanitina, ocorre uma variação dentro de cada preparação, sendo que tanto a diminuição de hibridização quanto a não expansão do pufe A28BbCa não é homogênea em todas as células. Em muitas células não se detecta mais hibridização, em outras ocorre diminuição da hibridização e, em algumas, a hibridização aparece em níveis semelhantes ao dos controles.

Com o objetivo de se verificar a abundância de transcritos da região A28BbCa em glândulas salivares de larvas L7, incubadas na presença e na ausência de ecdisterona, RNAs totais foram extraídos dessas glândulas e hibridizados "in situ" em preparações de cromossomos politênicos de glândulas salivares de larvas em período L4. Através da técnica de imunofluorescência indireta, foi possível determinar as regiões dos cromossomos politênicos com sequências de DNA complementares aos RNAs extraídos das glândulas, nas condições descritas acima. A Figura 18 mostra a hibridização com RNA extraído de glândulas de larvas em L7, incubadas na presença de ecdisterona. Pode-se notar a intensa fluorescência na porção terminal do cromossomo A. É possível verificar ainda que as

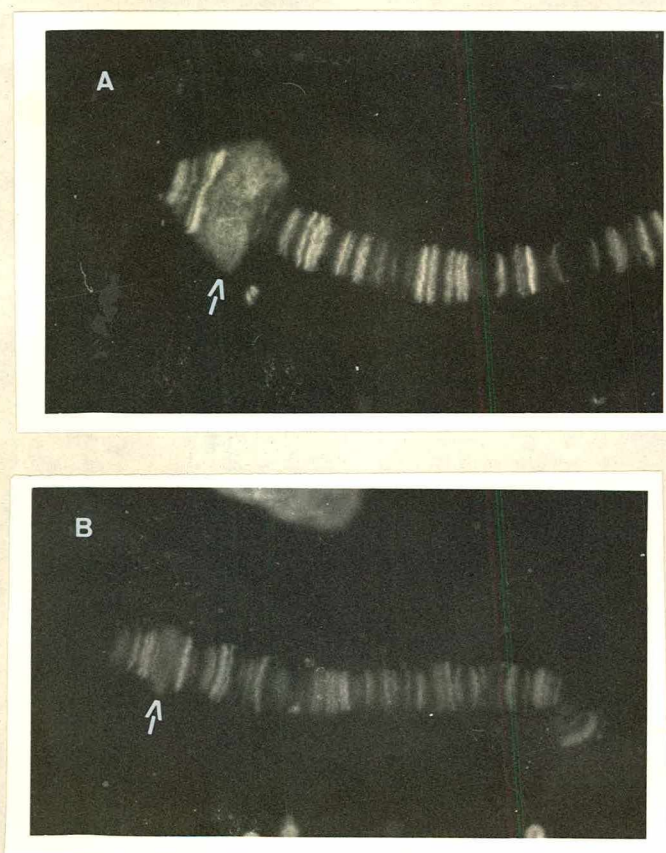


Figura 17- Seção do cromossomo A de Trichosia pubescens apresentando a região A28BbCa (seta), em glândulas incubadas na presença de : A) ecdisterona, B) ecdisterona e alfa -amanitina. As preparações foram submetidas a hibridização endógena e os híbridos DNA/RNA detectados por imunofluorescência indireta.

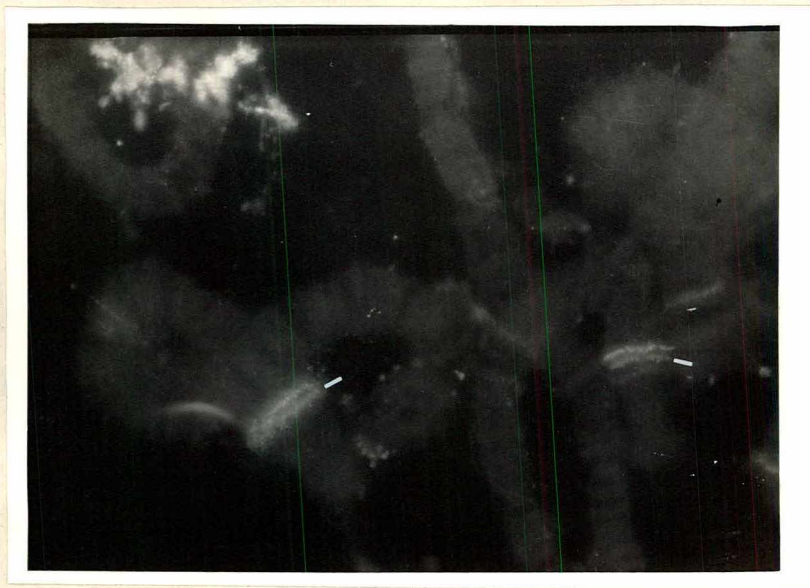


Figura 18- Hibridização "in situ" com RNA total extraído de glândulas de larvas de Trichosia pubescens, em período L7, incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona $2 \times 10^{-4}M$ por 4 horas. Os híbridos DNA/RNA foram detectados por imunofluorescência indireta. A seta indica a região A28BbCa.

marcações em outras regiões dos cromossomos politênicos foram muito fracas, com exceção da região nucleolar do cromossomo X, que apresentou uma intensidade de marcação relativamente grande.

Uma constância nas preparações descritas acima foi o aparecimento de duas faixas de fluorescência, na porção terminal do braço curto do cromossomo A. Essas faixas foram localizadas, respectivamente, nas regiões A28AB e A28BbCa. Nas preparações hibridizadas com RNA extraído de glândulas incubadas tanto na presença quanto na ausência de ecdisterona, as intensidades de fluorescência sobre as regiões A28AB foram semelhantes. Já com relação à região A28BbCa, observou-se uma maior fluorescência nas preparações hibridizadas com RNA de glândulas tratadas com ecdisterona, em relação às tratadas com RNA de glândulas incubadas na ausência do hormônio (Figura 19).

Uma evidência de que o RNA que hibridiza na região A28BbCa é transcrito a partir de um DNA que sofre amplificação gênica, foi obtida no experimento descrito a seguir. Nesse caso, foram feitas preparações mistas de glândulas em períodos L2 e L5-L6, de modo que na mesma lâmina coexistiam cromossomos com a região A28BbCa não amplificada e amplificada. As preparações foram hibridizadas com RNA extraído de glândulas de

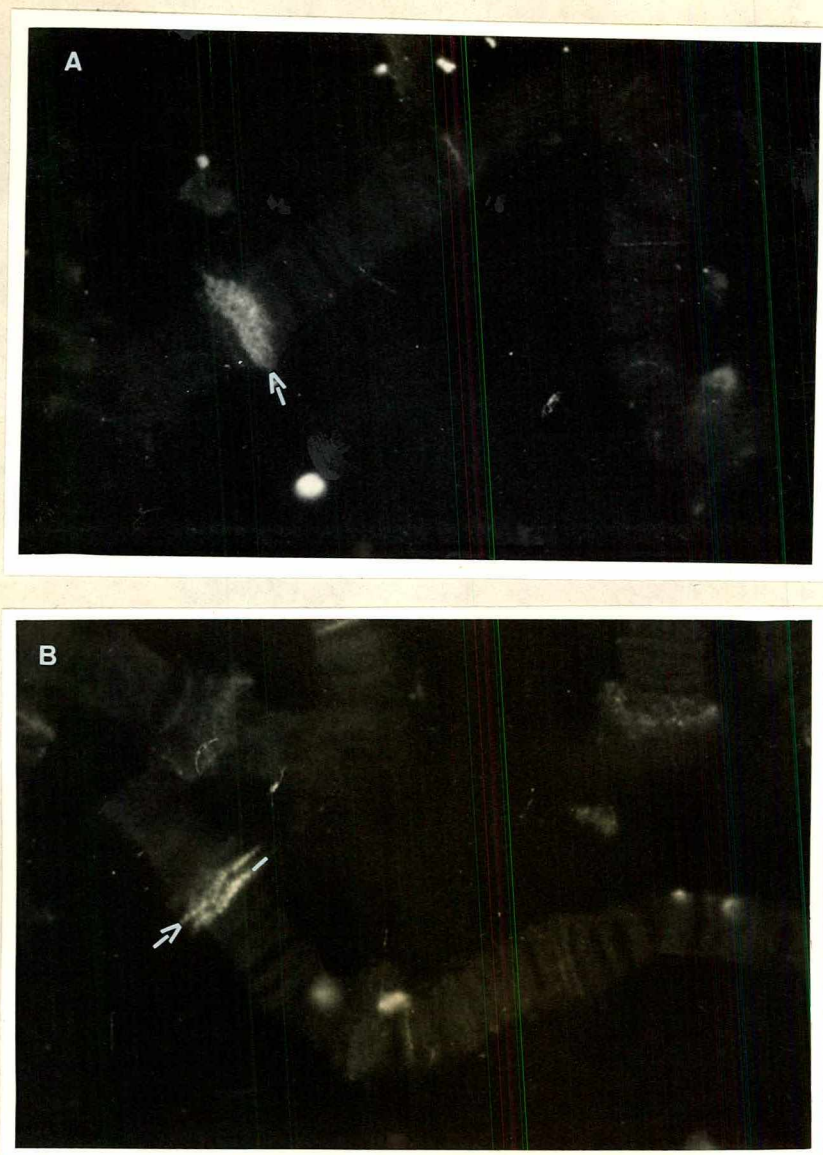


Figura 19- Hibridização "in situ" com RNA total extraído de glândulas de larvas de Trichosia pubescens, em período L7, incubadas "in vitro" por 4 horas na presença: A) de ecdisterona $2 \times 10^{-4}M$, B) do solvente do hormônio. Os híbridos DNA/RNA foram detectados por imunofluorescência indireta. A seta indica a região A28BbCa e, o traço, a região A28AB.

larvas em período L7 incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona. A intensidade de fluorescência na porção terminal do braço curto do cromossomo A foi comparada em cromossomos de período L2 e L5-L6, reconhecidos pelo tamanho e padrão de pufes. Verificou-se que enquanto a fluorescência na região A28AB é semelhante nos dois tipos de cromossomos, na região A28BbCa ela é maior nos cromossomos das larvas em fases mais avançadas do desenvolvimento (Figura 20).

O RNA total extraído de glândulas L7, incubadas "in vitro" na presença e na ausência de ecdisterona, foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de oligo dT- celulose, para separação da fração poliadenilada. A coluna testada com RNA poliadenilado sintético mostrou uma eficiência de retenção de 97,55%.

Para o RNA de glândulas incubadas na presença de ecdisterona, foi possível obter, a partir de 200 pares de glândulas, uma quantidade de aproximadamente 15 µg de RNA poliadenilado, o que representava cerca de 0,3% do RNA total passado na coluna de separação.

Os RNAs poliadenilados foram hibridizados "in situ", em preparações de cromossomos politênicos de glândulas de larvas em período L4. Nessas hibridizações, foi possível

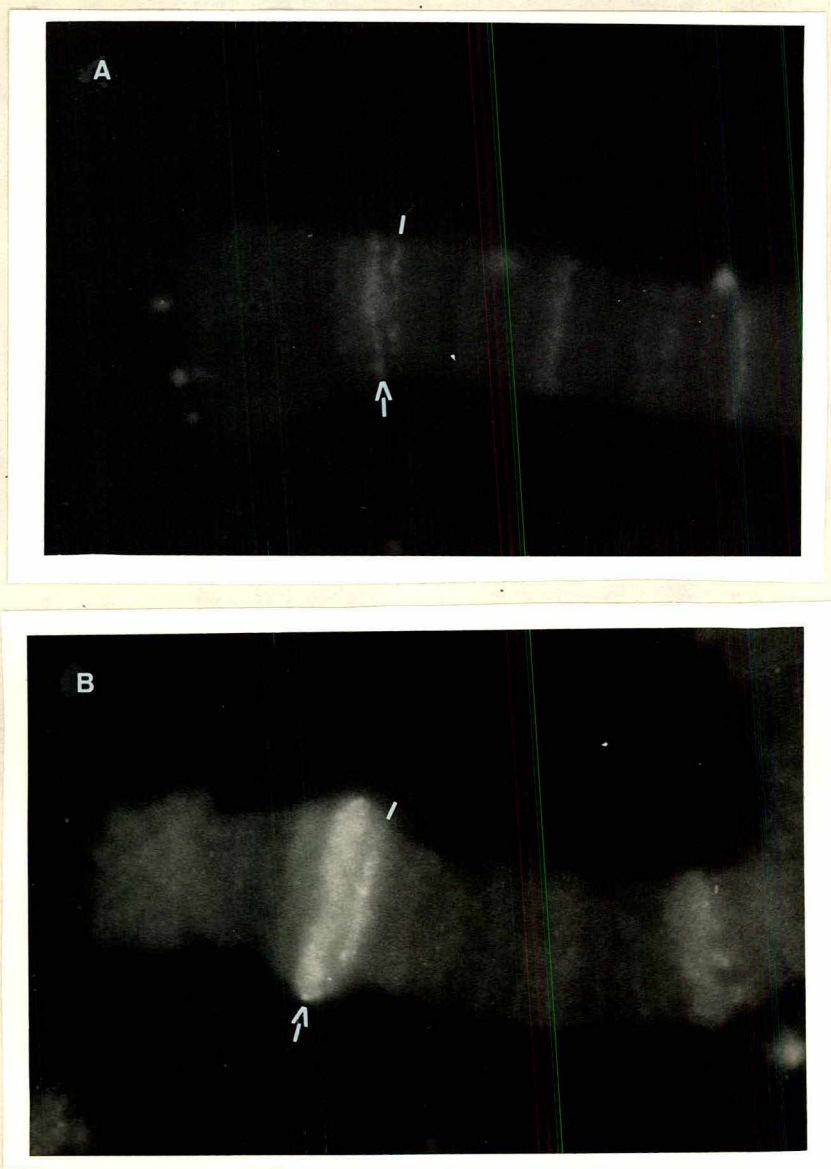


Figura 20- Hibridização "in situ" com RNA total, extraído de glândulas de larvas de *Trichosia pubescens*, em período L7, incubadas "in vitro" por 4 horas na presença de ecdisterona $2 \times 10^{-4} M$. O RNA foi hibridizado sobre preparações citológicas mistas, contendo cromossomos de glândulas de larvas em período: A) L2; B) L5-L6. Os híbridos DNA/RNA foram detectados por imunofluorescência indireta. A seta indica a região A28BbCa e, o traço, a região A28AB.

verificar que as duas faixas (A28AB e A28BbCa) da porção terminal do braço curto do cromossomo A, hibridizam com a fração poliadenilada. Como pode ser visto na Figura 21, a marcação na região A28BbCa foi maior nas hibridizações com RNA poliadenilado extraído de glândulas salivares, incubadas na presença de ecdisterona. Por sua vez, , na região A28AB, a intensidade de marcação foi semelhante para os RNAs poliadenilados provenientes de glândulas submetidas aos dois tipos de tratamento.

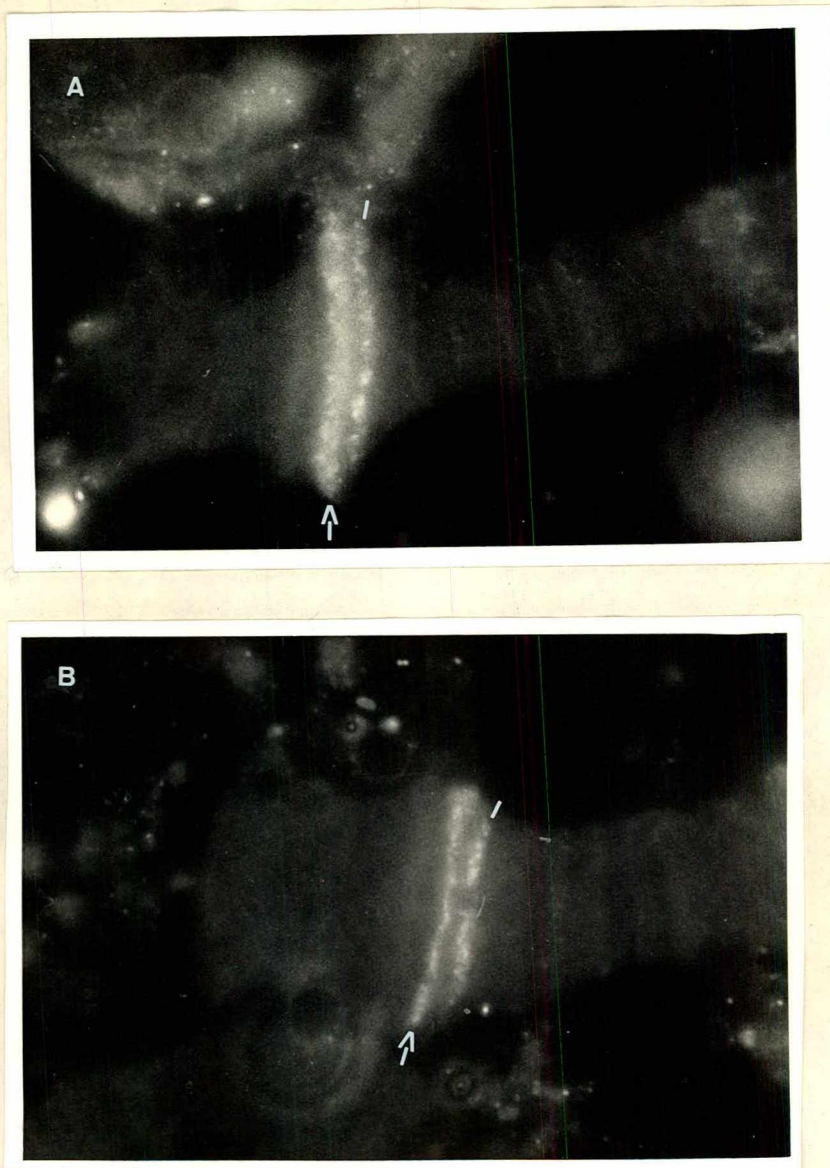


Figura 21- Hibridização "in situ" com RNA poliadenilado, extraído de glândulas de larvas de Trichosia pubescens em período L7, incubadas "in vitro" por 4 horas na presença: A) de ecdisterona $2 \times 10^{-4} M$; B) do solvente do hormônio. Os híbridos DNA/RNA foram detectados por imunofluorescência indireta. A seta indica a região A28BbCa e, o traço, a região A28AB.

DISCUSSÃO

Em Trichosia pubescens, como em outros dípteros, modificações no padrão de atividade gênica das células das glândulas salivares podem ser facilmente detectadas graças a modificações no padrão de pufes. Essa característica permitiu uma análise das variações no padrão de atividade gênica nos cromossomos dessa espécie, ao longo do desenvolvimento larval (Amabis, 1974; 1983b). Nesses trabalhos, foi verificado que o padrão de atividade gênica é bem constante durante a maior parte do quarto estágio larval e que ele passa a variar drasticamente nas fases que precedem a muda pupal.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam esses dados anteriores mostrando que, a partir da fase L3- L4, iniciam-se drásticas alterações no padrão de pufes das glândulas salivares. Essas alterações envolvem, principalmente, pufes de DNA. Alguns desses pufes iniciam a expansão ainda em período L3-L4, mas a fase de maior atividade, representada pelo número e dimensão dos pufes, é atingida nos períodos seguintes : L5, L6, L7 e P1. Em larvas mais velhas (períodos P2 e P3), próximas da época de pupação, o número de pufes de DNA diminui novamente. Pode-se verificar que, de modo geral, à medida que se avança no desenvolvimento, os pufes de DNA passam a ter

cinéticas de expansão e regressão mais rápidas, permanecendo menos tempo expandidos. Assim, por exemplo, os pufes de DNA C4B, B3Cb, X18Db, B25CD, B5F, C13Ea, A28BbCs, C2AbBa, C2Bb, C1EdFa, A13Bb e C21CbDa apresentam cinéticas de expansão e regressão rápidas; eles completam todo o ciclo entre 6 e 10 horas.

A época que precede a muda pupal é uma fase de drásticas alterações de atividade gênica nas glândulas salivares de larvas de diversas espécies de dípteros (Ashburner, 1970b). Este fato mostra que esses órgãos estão relacionados às grandes modificações morfológicas e fisiológicas que ocorrem com o animal durante a pupação, desde a construção do casulo até a histólise dos tecidos larvais. Os resultados em Rhynchosciara sugerem que, nos Sciarídeos, as drásticas alterações no padrão de pufes das glândulas salivares estão relacionadas à produção, por esses órgãos, de frações protéicas que participam da formação do casulo (Winter & cols., 1977b).

Em Trichosia pubescens, uma importante função das glândulas salivares é a síntese de polipeptídios que fazem parte da secreção salivar (Benozzati & Amabis, 1983). No decorrer do período L1, o padrão de síntese de polipeptídios nas glândulas é bem constante e as frações quantitativamente

mais importantes são componentes da secreção salivar. Essa constância no padrão de síntese de polipeptídios pode ser relacionada a uma constância no padrão de pufes, ao longo dessa fase do desenvolvimento larval (Amabis, 1983b, Benozzati & Amabis, 1983).

Por outro lado, nossos resultados mostram que a partir do período L4-L5, paralelamente às alterações no padrão de pufes, ocorre uma variação sequencial no padrão de síntese de polipeptídios das glândulas salivares. No entanto, durante as fases L2, L3 e L4, as alterações no padrão de pufes (Amabis, 1974, 1983b) não são acompanhadas por alterações no padrão de síntese de proteínas. Nessas fases, as glândulas continuam a sintetizar praticamente as mesmas frações protéicas que vinham sendo sintetizadas no período L1 (Benozzati & Amabis, 1983). Uma vez que os pufes presentes em L1, muitos dos quais devem codificar para as proteínas da secreção de larvas jovens (Benozzati & Amabis, 1983), regridem no período L2 (Amabis, 1974, 1983b; Amabis & Amabis, 1984a), o controle da síntese desses polipeptídios deve ser mais a nível de tradução do que de transcrição. Essas observações indicam, portanto, que nessas fases do desenvolvimento, os RNAs mensageiros que codificam para os polipeptídios da secreção são estáveis, com uma vida média relativamente grande.

As alterações no padrão de síntese de polipeptídios que ocorrem a partir da fase L5 são particularmente drásticas, com a síntese de algumas frações chegando a ser detectada em apenas uma fase larval, com duração menor do que 6 horas. Isso indica que muitos dos RNAs mensageiros que codificam para essas frações protéicas devem ser altamente instáveis. Uma vez que as alterações no padrão de síntese de polipeptídios são paralelas a alterações sequenciais no padrão de pufes de DNA, é possível supor-se que pelo menos alguns desses pufes sejam responsáveis pela síntese de RNAs mensageiros instáveis, que codifiquem para aquelas frações protéicas.

Essa hipótese explicaria o significado dos pufes de DNA : a produção de grandes quantidades de proteínas específicas em curtos espaços de tempo exigiria um sistema de mensageiros instáveis e, conseqüentemente, a amplificação dos genes codificadores. A sugestão de que os pufes de DNA codificam para proteínas sintetizadas por períodos de tempo relativamente curtos, tem apoio em trabalhos com outras espécies de sciarídeos. Em Bradysia hygida, foi verificado que a inibição seletiva de pufes de DNA provoca diminuição na síntese de algumas frações polipeptídicas nas glândulas salivares que são sintetizadas em fases específicas do fim do desenvolvimento larval (Laicine & cols., 1980). Em

Rhynchosciara americana, foi possível correlacionar pufes de DNA específicos com a síntese de RNAs poliadenilados instáveis e com a produção de frações protéicas presentes na secreção salivar (Winter & cols., 1977b; de Toledo & Lara, 1978; Bonaldo & cols., 1979; Alvarenga, 1980).

Como em outros dípteros (Ashburner & Berendes, 1978), as alterações no padrão de pufes de cromossomos politênicos de glândulas salivares de Trichosia pubescens são desencadeadas por um aumento da taxa de ecdisterona na hemolinfa de larvas em fim de quarto estágio (Amabis, 1977; Ferreira, 1981; Amabis & Amabis, 1984a,b). O efeito desse hormônio sobre pufes tem sido demonstrado em diversas espécies de dípteros, através da injeção do hormônio em larvas jovens e da incubação "in vitro" de glândulas salivares na presença do hormônio (Clever & Karlson, 1960; Clever, 1964a ; Clever & Romball, 1966; Crouse, 1968; Ashburner, 1970b; Ashburner, 1971a; Berendes & Thijsen, 1971; Stocker & Pavan, 1974; Ashburner & cols., 1974; Amabis, 1977; Alvarenga, 1980; Ferreira, 1981).

A indução de pufes "in vitro" pela ecdisterona tem sido observada em diversos sistemas. Em Chironomus (Kroeger, 1966) , a indução "in vitro" ficou restrita a pufes primários. Em Drosophila hydei (Berendes, 1967), um grande número de pufes

primários também foi induzido, após tratamento "in vitro" com ecdisona. Em Drosophila melanogaster, por outro lado, conseguiu-se a indução tanto de pufes primários quanto de secundários, após incubações por períodos de até 12 horas, em meio Grace contendo ecdisona (Ashburner, 1972). Em Rhynchozocara americana, Alvarenga (1980) cita a indução de um pufe de DNA em glândulas salivares de larvas em início de rede, após incubação em meio TEGPL, suplementado com ecdisterona e com hemolinfa. Em Trichozia pubescens, a incubação de glândulas de larvas jovens (período L1) "in vitro", em meio de cultura suplementado com ecdisterona, induz o rápido aparecimento dos pufes primários, mas o ciclo de indução não progride mesmo em incubações de até 24 horas (Barbosa, 1984). No entanto, nessa espécie, após a injeção de ecdisterona em larvas jovens são induzidos pelo menos 16 pufes entre meia hora e duas horas; 12 entre 2 e 6 horas e muitos outros aparecem a partir de 10 horas. O ciclo de atividade gênica induzido pela ecdisterona, que se reflete na expansão e regressão ordenada de pufes, dura cerca de 30 horas a partir da injeção do hormônio e é muito semelhante ao observado no fim do desenvolvimento larval (Amabiz & Amabiz, 1984a).

Com base nos resultados de indução de pufes de T. pubescens pela ecdisterona, pode-se indagar se, nesse sistema,

o hormônio atua apenas como um gatilho, desencadeando todo o processo de indução sequencial, ou se sua presença seria necessária continuamente para a manutenção do processo.

Experimentos de ligadura de larvas dessa espécie mostraram que a ecdisterona é necessária pelo menos até o período L4, ou seja, bem após a indução dos primeiros pufes secundários. A partir dessa fase, a indução sequencial dos pufes prossegue normalmente, mesmo na ausência do principal sistema endócrino (Amabis & Amabis, 1984b). Fenômeno semelhante foi observado em experimentos de ligadura de larvas de Rhynchosciara (Amabis & cols., 1977).

Esses resultados, no entanto, não nos permitem concluir se após o período L4, a presença de ecdisterona não é mais necessária para a manutenção do processo de indução sequencial dos pufes. Se nessa fase fosse atingida uma concentração crítica suficiente para dar continuidade ao processo de indução de pufes, ele progrediria normalmente, independente da eliminação do sistema endócrino. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade desse hormônio estar sendo sintetizado por outro órgão, após aquela fase crítica.

A dependência da presença de ecdisterona para a indução de pufes característicos de larvas após o período L5, foi demonstrada em experimentos de incubação "in vitro". Um estudo detalhado do pufe de DNA A28BbCa, característico de larvas em período P1-P2, mostrou a necessidade de ecdisterona no meio de cultura para sua indução "in vitro". Nesse caso, a presença de ecdisterona no meio de cultura na concentração de $2 \times 10^{-4} M$, é necessária, pelo menos, nos 15 minutos iniciais de incubação e o pufe atinge seu grau máximo de expansão após 4 horas (Ferreira, 1981).

No presente trabalho, verificamos que diversos pufes tardios de T. pubescens, da mesma forma que o A28BbCa, dependem da presença de ecdisterona no meio de cultura para serem induzidos. Foi possível detectar a indução de pelo menos 1/3 dos pufes de DNA de Trichosia, em glândulas entre os períodos L4 e P3, incubadas "in vitro" por 4 horas na presença de $2 \times 10^{-4} M$ de ecdisterona. Na Tabela 4 pode-se visualizar alguns desses pufes e os respectivos períodos do desenvolvimento da glândula incubada.

Além da indução propriamente dita, foi possível observar um aumento no grau de expansão de alguns pufes, após o tratamento "in vitro" com ecdisterona. Não houve grande diferença no comportamento dos pufes quando comparadas às

regiões S1 e S2a das glândulas salivares, a não ser pelo fato de que os pufes, de maneira geral, iniciam sua expansão em S2a, antes do que em S1.

Tabela 4 - Principais pufes de DNA de T. pubescens induzidos a se expandir "in vitro" na presença de ecdisterona.

=====
 Período larval Pufes induzidos

L5	C4B, C10D, C13Ea
L6	A28BbCa, B25CD, C13Ea
L7	A28BbCa, B5F
P1	C2Bb, C8Cb, C21CbDa
P2	C2Bb, C21CbDa

=====

Nossos resultados mostram que, alguns pufes mantem-se expandidos no meio isento de hormônio, enquanto que nas glândulas incubadas com ecdisterona eles regridem. Este foi o caso, por exemplo, do pufe A28AB que aparece expandido em glândulas L5 e L6 incubadas "in vitro", na ausência do hormônio, enquanto que, nas incubadas com o hormônio, ele regride. Durante o desenvolvimento larval este pufe regride

ainda no período L5. Por outro lado, em alguns casos, em incubações em meio não suplementado com ecdisterona ocorre a indução precoce de certos pufes. Assim, por exemplo, o pufe B3Cb é induzido em glândulas de larvas em L4 incubadas "in vitro" na ausência do hormônio, quando só deveria aparecer em L5, no desenvolvimento larval. Os pufes B25CD e C13Ea comportaram-se de modo semelhante, foram induzidos em glândulas de larvas em L6, incubadas "in vitro" na ausência do hormônio, quando só deveriam aparecer em L7. No entanto, esses dois pufes atingiram, nessas condições, um pequeno grau de expansão.

Os pufes precocemente induzidos em meio isento de ecdisterona exógena atingem, em geral, graus de expansão menores do que quando são induzidos a se expandir "in vitro", na presença de ecdisterona ou quando se expandem durante o desenvolvimento larval. Na verdade, acreditamos que esses pufes não foram induzidos precocemente em meio isento de hormônio, mas sim que eles se expandiram no seu devido tempo, após um certo período de incubação. Nesse caso, o que observamos foi a continuação "in vitro" de um processo que já estava em andamento quando da dissecação da larva. O fato desses pufes atingirem um tamanho menor do que nas glândulas incubadas na presença de ecdisterona, sugere que a presença do hormônio,

mesmo após iniciada a expansão do pufe, é necessária para o pleno desenvolvimento desse processo.

Um modelo para explicar o controle da atividade dos pufes pela ecdisterona, foi proposto para Drosophila por Ashburner & cols. (1974) e Ashburner & Richards (1976). Segundo esses autores, um complexo ecdisterona-receptor induz os pufes primários, enquanto mantém os pufes secundários inativos. À medida que cessa a ação do complexo hormônio-receptor, os pufes primários são inibidos e os pufes secundários são ativados, com a participação do produto dos pufes primários. Esse modelo não pode, no entanto, ser estendido aos Sciarídeos. Em Rhynchosciara, foi verificado que a indução dos pufes tardios é dependente da presença de glândulas endócrinas ativas e, portanto, de ecdisterona (Amabis & cols., 1977). Foi sugerido ainda, por Alvarenga (1980), que nessa espécie a indução do pufe de DNA B2, que é um efeito tardio da ecdisterona (Stocker & Pavan, 1977), é dependente "in vitro" da presença do hormônio em concentrações entre $2,26 \times 10^{-4}M$ e $4,46 \times 10^{-6}M$. Em Trichosia pubescens, os experimentos de ligadura de larvas (Amabis & Amabis, 1984b) e indução de pufes de DNA "in vitro" pela ecdisterona sugerem que, pelo menos até o período P3, a ecdisterona é continuamente

necessária para a progressão do ciclo de atividade gênica característico do fim da vida larval.

As alterações no padrão de pufes induzidos pela ecdisterona "in vitro" são acompanhadas por modificações no padrão de síntese de polipeptídios, nas glândulas salivares de Trichosia pubescens. Essas modificações, em geral, levam a um padrão de síntese que a glândula atingiria na fase seguinte àquela em que se encontrava no início da incubação.

Nossos experimentos concentraram-se em glândulas de larvas entre as fases L6 e P2 por ser esse o período de maior atividade dos pufes de DNA e de maiores alterações no padrão de síntese dos polipeptídios glandulares.

Quando se compara o padrão de síntese de polipeptídios de glândulas L7 incubadas "in vitro" na presença de ecdisterona com o de glândulas não incubadas, verifica-se um aumento de síntese do polipeptídio de 25.000 d nas glândulas incubadas. Além disso, alguns polipeptídios sintetizados em glândulas L7 não são mais observados nas glândulas incubadas com ecdisterona, o que torna o padrão de síntese de polipeptídios dessas glândulas muito semelhante ao observado nas fases imediatamente seguintes (P1-P2) no desenvolvimento normal.

Em todos os experimentos de análise do padrão de síntese de polipeptídios de glândulas salivares incubadas "in vitro", dois controles citológicos foram realizados. Um deles consistiu na fixação de parte da glândula no momento da dissecação da larva, que serviu para a verificação do grau de expansão dos pufes de DNA no início da incubação. Um segundo controle era realizado no fim do período de incubação e serviu para verificarmos as alterações ocorridas no padrão de pufes de DNA, no decorrer do experimento. Com isso, foi possível verificar uma alta correlação entre a indução do pufe de DNA A28BbCa e a síntese do polipeptídio de 25.000 d. Em várias amostras de glândulas tipicamente em L7, onde apenas o pufe A28BbCa havia sido induzido a se expandir "in vitro" e nenhum outro grande pufe de DNA estava presente, a única fração polipeptídica nitidamente detectada nos fluorogramas foi a de 25.000 d. Em alguns desses casos, pelas análises densitométricas, pode-se verificar que a absorbância na região de 25.000 d chegava a representar 34% do total do fluorograma.

Tentativas de correlacionar a síntese de outras frações polipeptídicas com a indução de outros pufes não foram conclusivas. No entanto, em muitos casos onde os pufes B25CD e C13Ea estavam presentes após a incubação de glândulas L6-L7 em meio suplementado com ecdisterona, observou-se a síntese de

duas frações protéicas de aproximadamente 60.000 d e 70.000 d. Acreditamos que deve existir uma relação entre essas frações protéicas e aqueles pufes, uma vez que, durante o desenvolvimento larval, dois polipeptídios com pesos moleculares da ordem de 60.000 d e 70.000 d são sintetizados nas fases em que os pufes B25CD e C13Ea estão expandidos.

Correlações positivas entre polipeptídios específicos e pufes de cromossomos politênicos têm sido estabelecidas em diferentes espécies de dípteros (Beermann, 1961; Grossbach, 1969, 1973; Tissières, 1974; Korge, 1975, 1977; McKenzie & cols., 1975; Spradling & cols., 1975; Henicoff & Meselson, 1977; Biessmann & cols., 1981). Esses trabalhos, no entanto, foram restritos a espécies que não apresentam o fenômeno da amplificação gênica, em cromossomos politênicos das glândulas salivares e que, portanto, não desenvolvem pufes de DNA.

A restrição dos pufes de DNA a espécies da família Sciaridae fez com que durante muitos anos o próprio fenômeno da amplificação gênica fosse contestado ou, na melhor das hipóteses considerado um fenômeno restrito aqueles organismos. Pouco crédito foi dado à hipótese originalmente proposta por Pavan & Beuer (1955) de que os pufes de DNA serviriam para aumentar o número de cópias de genes específicos e facilitar a síntese de polipeptídios necessários em grande quantidade. Essa

hipótese só começou a ter suporte experimental com a demonstração de que alterações no padrão de pufes de DNA se refletem em alterações no padrão de síntese de proteínas nas glândulas salivares (Winter & cols., 1977a; Laicine & cols., 1980; Amabis, 1983b). Nesse sentido, foi possível ainda estabelecer-se correlações entre os pufes de DNA B2 e C3 de Rhynchosciara americana e frações polipeptídicas específicas, sintetizadas nas glândulas e presentes como componentes da secreção salivar (Winter & cols., 1977b, 1979).

No entanto, tentativas para se testar essa hipótese em outros sistemas especializados na síntese de grandes quantidades de proteínas específicas, mostraram que não ocorria amplificação dos genes que codificam para essas proteínas. (Suzuki & cols., 1972; Gage & Manning, 1972; Bishop & cols., 1972; Anderson & Schinke, 1976).

Nossos resultados vem reforçar a idéia de que os pufes de DNA estão relacionados com a síntese de frações polipeptídicas específicas no fim da vida larval. Como mencionado anteriormente, nos experimentos de incubação "in vitro" de glândulas salivares de Trichosia pubescens, foi verificada uma estreita correlação entre o pufe de DNA A28BbCa e a síntese de um polipeptídeo específico. Com relação a esse polipeptídeo, foi possível verificar que, no decorrer do

desenvolvimento larval, a sua síntese inicia-se entre os períodos L5-L6 e aumenta progressivamente até P1-P2 quando passa a diminuir. No entanto, a expansão do pufe A28BbCa só se inicia em L7-P1, sendo que o máximo de expansão é atingido em P2. Assim, é possível detectar síntese do polipeptídeo de 25.000 d mesmo em épocas onde ainda não é possível verificar a expansão do pufe A28BbCa. Isso poderia significar que a correlação observada nos experimentos "in vitro", não representa uma relação direta entre um loco gênico e seu produto de síntese. Por outro lado, a região A28BbCa poderia ser ativa em transcrição, mesmo antes da expansão do pufe.

Resultados anteriores (Ferreira, 1981), utilizando precursor radioativo (Uridina 3H) de RNA, sugeriam que o pufe A28BbCa é muito ativo na síntese de RNA nas fases em que está expandido. Os resultados autorradiográficos, no entanto, não permitiram verificar com precisão quando se inicia a transcrição na região que origina aquele pufe. Isto se deve a uma limitação da autorradiografia, que não apresenta resolução suficiente para esse tipo de estudo. A grande dispersão dos grãos de marcação sobre o cromossomo, não permite a localização precisa de marcação em uma faixa específica.

A possibilidade de detecção de híbridos DNA/RNA através de técnicas imunológicas, permitiu um estudo detalhado

da presença de RNA complementar à região A28BbCa, nas diferentes fases de expansão desse pufe. Como relatado por alguns autores, o tratamento de preparações de cromossomos politênicos com anticorpos anti híbridos DNA/RNA seguido de incubação na presença de um segundo anticorpo marcado com fluoresceína, resulta em uma série de faixas fluorescentes ao longo de todo o cromossomo politênico, com concentração nos pufes e nas regiões organizadoras de nucléolo (Rudkin & Stollar, 1977b; Bünsen & cols., 1982; Alcover & cols., 1981). Tudo indica que, pelo menos, a maior parte desses híbridos presentes em cromossomos politênicos sejam originados no decorrer da preparação das lâminas, pela hibridização do RNA recém-sintetizado ao DNA molde denaturado pela fixação com ácido acético. A favor dessa hipótese, existem os fatos de que o uso de fixador não denaturante abole a formação de híbridos (Bünsen & cols., 1982), enquanto que a incubação das preparações na presença de formamida, antes do tratamento imunológico, aumenta em muito a intensidade de fluorescência ao longo dos cromossomos (Bünsen & cols., 1982; Alcover & cols., 1981). Em nosso laboratório, foi verificado que o mesmo resultado da incubação na presença de formamida pode ser obtido, com a vantagem de que a estrutura do cromossomo é melhor mantida, conservando-se as preparações, antes do

esmagamento, na presença de 50% de ácido acético, por 10 a 20 minutos à temperatura entre 36° e 40°C. Acreditamos que esse tratamento provoque uma denaturação mais efetiva do DNA cromossômico, que fica assim mais disponível à hibridização com o RNA complementar presente nos cromossomos.

Na análise de preparações de glândulas em diferentes fases do desenvolvimento tratadas pelo método mencionado acima, detectou-se fluorescência na região A28BbCa, a partir da fase L5. A grande resolução do método imunológico permitiu que a faixa fluorescente, presente naquela região cromossômica, fosse relacionada à faixa cromossômica que sofre amplificação gênica e origina o pufe de DNA em questão. Como esse método detecta a presença de híbridos DNA/RNA, é possível sugerir que a região A28BbCa está ativa mesmo antes da expansão do pufe de DNA nessa região.

Verificamos ainda, através dessa técnica, que a incubação de glândulas salivares na presença de alfa -amanitina diminui muito a fluorescência na região A28BbCa e em outras regiões cromossômicas, em relação ao controle não tratado com o inibidor. No caso de algumas regiões cromossômicas e, principalmente, do nucléolo, a intensidade de fluorescência não foi praticamente afetada pelo inibidor. Além disso, o fato de algumas células responderem mais ao tratamento do que outras,

está de acordo com os resultados obtidos por Beer mann (1971) que mostram uma variação na ação da alfa-amanitina, principalmente em experimentos "in vitro". Esses resultados sugerem que o RNA transcrito na região A28BbCa tem características de mensageiro. A alfa-amanitina foi relacionada como inibidor específico de RNA polimerase II (Kedinger & cols, 1970; Bonner & Kerby, 1982) a qual é responsável pela síntese de RNA mensageiro (Plagens & cols, 1976; Jamvrich & cols, 1977; Kramer & cols., 1980)

Uma outra evidência de que o RNA transcrito na região A28BbCa é mensageiro, foi o fato de que RNA poliadenilado, purificado através de cromatografia de afinidade em coluna de oligo dT-celulose, hibridiza-se naquela região cromossômica.

Nossos resultados mostram que RNA poliadenilado, obtido de glândulas L7 incubadas "in vitro" por 4 horas na presença de ecdisterona e, onde o único pufe induzido era o A28BbCa, hibridiza "in situ" preferencialmente em duas faixas do cromossomo A: nas faixas A28AB e A28BbCa. A fluorescência da região A28BbCa foi maior no caso dessas hibridizações do que quando foi utilizado RNA poliadenilado, extraído de glândulas L7 incubadas na ausência do hormônio. Além da marcação nas regiões A28AB e A28BbCa, a única outra região bem marcada foi a organizadora do nucléolo. Essa marcação pode ser atribuída à

contaminação com RNA ribossômico, que normalmente ocorre em isolamentos de RNA poliadenilado pelo método de cromatografia de afinidade em coluna de oligo dT- celulose (Bantle & cols., 1976). Esses resultados sugerem ainda que, nas condições em que o pufe A28BbCa é induzido a se expandir "in vitro" em glândulas L7, um RNA mensageiro específico domina o perfil de síntese de RNAs poliadenilados.

No caso das hibridizações de RNA de glândulas L7 incubadas na presença de ecdisterona com preparações mistas, contendo cromossomos de glândulas em período L2 e L5-L6, verificamos que a fluorescência na região A28BbCa é maior nos cromossomos das glândulas mais velhas. Por outro lado, a intensidade de fluorescência na região A28AB foi semelhante em ambos os tipos de cromossomos.

Nossa interpretação é que a fluorescência desproporcional na região A28BbCa entre os cromossomos das glândulas de larvas das duas idades reflete uma quantidade maior de híbridos nos cromossomos L5-L6, em relação aos de L2. Isto ocorreria devido a um maior número de cópias de DNA complementar ao RNA em questão, naquela região cromossômica. Portanto, o RNA que se hibridiza na região A28BbCa, deve ser produto de genes que sofrem amplificação ao longo do desenvolvimento larval.

Esses resultados, em conjunto, não invalidam a hipótese de que o polipeptídeo de 25.000 d seja produto do pufe de DNA A28BbCa. A não relação entre a cinética de síntese daquele polipeptídeo e a cinética de expansão do pufe, durante o desenvolvimento larval, pode ser explicada com base nos resultados de hibridização com RNA endógeno. Foi verificado que a região A28BbCa é ativa em transcrição a partir do período L5, apesar do pufe só se expandir a partir de L7-P1.

Finalmente, nossos resultados mostram que uma fração polipeptídica de 25.000 d está presente na secreção salivar de larvas em período L7-P2, justamente na fase em que o pufe de DNA A28BbCa se expande. Acreditamos que essa fração corresponda àquela cuja síntese relacionamos à transcrição na região cromossômica A28BbCa. Assim, esses resultados sugerem que o pufe de DNA A28BbCa é responsável pela codificação de uma das proteínas da secreção salivar de Trichosia pubescens, no período em que a larva está formando o casulo. A relação entre um pufe de DNA e a síntese de uma proteína de secreção salivar, em um período específico da formação do casulo, vem de encontro à própria função dos pufes de DNA, sugerida inicialmente por Pavan & Breuer (1955). Essa fase de formação de casulo é muito curta em Trichosia pubescens e as mudanças no padrão de síntese protéica são muito rápidas. Em tal sistema, haveria demanda de

grandes quantidades de diferentes proteínas em curtos espaços de tempo, o que seria solucionado com a amplificação dos genes codificadores e o desenvolvimento dos pufes de DNA.

RESUMO

Neste estudo analisamos o padrão de síntese de polipeptídios nas glândulas salivares de larvas de Trichosia pubescens, em diferentes períodos durante o fim do quarto estágio. Foi verificado que nessa fase do desenvolvimento as glândulas salivares sofrem drásticas mudanças no padrão de síntese de polipeptídios. Essas mudanças podem ser correlacionadas a alterações no padrão de pufes dos cromossomos politênicos, principalmente com a atividade dos pufes de DNA.

Com a finalidade de determinar o papel da ecdisterona nas mudanças do padrão de pufes e de síntese de polipeptídios, realizamos experimentos "in vitro" incubando glândulas salivares na presença e ausência desse hormônio. Verificamos que, pelo menos entre os períodos L4 e P3, a presença do hormônio é continuamente necessária para a manutenção das alterações sequenciais no padrão de pufes de DNA e de síntese de polipeptídios. Em geral, a incubação de glândulas salivares na presença de $2 \times 10^{-4} M$ de ecdisterona por 4 horas modifica a atividade gênica para um padrão que seria atingido algumas horas mais tarde, durante o desenvolvimento normal. Por outro lado, a incubação de glândulas em meio sem o hormônio

normalmente bloqueia a progressão das alterações de atividade gênica que ocorrem no desenvolvimento normal.

Particularmente interessante foi a possibilidade de se estabelecer uma correlação entre o pufe de DNA da região 28BbCa do cromossomo A e a síntese de um polipeptídio com peso molecular de aproximadamente 25.000 d. Apesar do fato de que nos experimentos "in vitro" encontramos uma correlação significativa entre a síntese desse polipeptídio e a indução do pufe A28BbCa, durante o desenvolvimento normal a síntese do polipeptídio se inicia algumas horas antes da expansão do pufe. Essa aparente contradição foi, no entanto, elucidada pelos resultados obtidos em experimentos delineados para estudar a transcrição na região A28BbCa.

Através de técnicas imunológicas que utilizam anticorpos anti-híbridos DNA/RNA foi verificado que a partir do período L5, isto é, algumas horas antes da expansão do pufe A28BbCa, estão presentes no cromossomo moléculas de RNA complementares à faixa que origina aquele pufe. Nossa interpretação para esse fato é a de que a transcrição nessa região cromossômica particular se inicia antes do aparecimento do pufe. Nesse caso, não há contradição entre os resultados "in vitro" e "in vivo".

A partir de experimentos utilizando alfa-amanitina como inibidor de RNA polimerase II e através de hibridização "in situ" usando RNA poli A+, foi deduzido que o produto de transcrição do pufe A28BbCa tem características de mensageiro. Verificamos que a alfa-amanitina inibe a transcrição na região A28BbCa e que RNA poliadenilado obtido de glândulas nas quais aquele pufe tinha sido induzido, hibridiza intensamente nessa região cromossômica.

Finalmente pela análise eletroforética da secreção de larvas em diferentes períodos, pudemos concluir que o polipeptídeo de 25.000 d é um dos componentes da secreção salivar de larvas entre os períodos L6 e P2.

ABSTRACT

In this study we have analyzed the pattern of polypeptide synthesis in the salivary glands of Trichosia pubescens larvae at different stages during the late fourth instar. It was found that during these developmental stages the salivary glands undergo drastic changes in the pattern of polypeptide synthesis. These changes could be correlated with the alterations in the puffing pattern of the polytene chromosomes, essentially with the activity of the DNA-puffs

In order to ascertain the role of the ecdysterone in the changes of both the DNA-puffing pattern and polypeptide synthesis, we carried out experiments "in vitro" by incubating salivary glands in the presence and in the absence of this hormone. It was found that, at least during the period between stages L4 and P3, the presence of the hormone is continuously necessary to support the sequential alterations both in the DNA-puffing pattern and in the protein synthesis. As a rule, the incubation of a salivary gland in the presence of $2 \times 10^{-4} M$ of ecdysterone for 4 hours modifies the gene activity to a pattern that would be attained a few hours later during normal development. On the other hand, the incubation of gland in

medium lacking the hormone normally hinders the progression of the developmental alterations of gene activity.

Particularly interesting was the possibility to establish a correlation between the DNA-puff at the region 28BbCa of the chromosome A and the synthesis of a polypeptide of MW \approx 25,000 d. In spite of the fact that "in vitro" experiments we found a significant correlation between the synthesis of this polypeptide and the incubation of the puff A28BbCa, during normal development the synthesis of the polypeptide starts a few hours before the expansion of the puff. This apparent contradiction was, however, elucidated by results obtained in experiments delineated to study the transcription at region A28BbCa.

By means of immunological techniques using antibodies against hybrid DNA/RNA it was found that as early as stage L5, namely, a few hours before the expansion of puff A28BbCa, RNA molecules complementary to the band which originates that puff are present in the chromosome. Our interpretation for this fact is that transcription at that particular chromosomal region starts long before the appearance of the puff. In such a case there is no contradiction between "in vitro" and "in vivo" results.

The fact that the product of transcription of puff A28BbCa has characteristics of messenger was inferred from experiments using alfa-amanitin as an inhibitor of RNA polymerase II throughout "in situ" hybridisation using poly A+ RNA. It was verified that alfa-amanitin inhibits transcription at region A28BbCa and that polyadenilated RNA obtained from glands in which that puff had been induced strongly hybridises to that chromosomal region.

Finally, we could conclude by electrophoretic analysis of the secretion of larvae at different developmental stages that the polypeptide of MW \cong 25,000 d is a component of the salivary secretion of larvae from stages L6 until P2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAM, M.; ROBERTS, D.; RICHARDS, G. & ASHBURNER, M.- 1978.
Drosophila: the genetics of two major larval proteins.
Cell, 13: 215-225.
- ALCOVER, A.; IZQUIERDO, M.; STOLLAR, D.; MIRANDA, M. & ALONSO, C.-
1981. Analytical studies of chromosomal transcription
detected by an endogenous hybridization technique (EHT)
using autoradiography and indirect immunofluorescence in
Drosophila hydei. Acta Embryol. Morphol. Exper., n.º. 2:
131-140.
- ALFERT, M.- 1954. Composition and structure of giant
chromosomes. Int. Rev. Cytol., 3: 131-175.
- ALVARENGA, C.A.S.- 1980. Influência de ecdisonas sobre a síntese
de RNA e Proteínas nas glândulas salivares de
Rhynchosciara. Dissertação de Mestrado, Departamento de
Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São
Paulo. São Paulo.
- AMABIS, D.C.- 1977. Efeito da ecdisterona sobre o padrão de
pufes dos cromossomos politênicos de glândulas salivares de
Trichosia pubescens. Tese de Doutorado, Departamento de
Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São
Paulo. São Paulo.

AMABIS, D.C. & AMABIS, J.M.- 1984a. Effects of Ecdysterone in polytene chromosomes of Trichostia pubescens. Develop. Biol., 102: 1-9.

AMABIS, D.C. & AMABIS, J.M.- 1984b. Hormonal control of gene amplification and transcription in the salivary gland chromosomes of Trichostia pubescens. Develop. Biol., 102: 10-20.

AMABIS, D.C.; AMABIS, J.M. & SIMÕES, L.C.G.- 1977. Puffing activity in the salivary gland chromosomes of Rhynchosciara under experimental conditions. Chromosoma(Berl.), 62: 139-154.

AMABIS, J.M.- 1972. Indução e regressão de "puffs" em Rhynchosciara. Memória de Mestrado. Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo.

AMABIS, J.M.- 1974. Estudo dos cromossomos de Trichostia pubescens. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo.

AMABIS, J.M.- 1983a. The polytene chromosomes of the salivary gland of Trichostia pubescens (Diptera: Sciaridae). Rev. Bras. Genética, 7: 415-424.

- AMABIS, J.M. - 1983b. DNA-puffing patterns in the salivary glands of Trichosia pubescens (Diptera: Sciaridae). Genetica, 62: 3-13.
- AMABIS, J.M. & CABRAL, D. - 1970. RNA and DNA puffs in polytene chromosomes of Rhynchosciara: Inhibition by extirpation of prothorax. Science, 169: 692-694.
- AMABIS, J.M. & SIMÕES, L.C.G. - 1971. Puff induction and regression in Rhynchosciara angelae by the method of salivary gland implantation. Genetica, 42: 404-413.
- ANDERSON, J.M. & SCHINKE, R.T. - 1976. Partial purification of the ovalbumin gene. Cell, 7: 331-338.
- ASHBURNER, M. - 1970a. Patterns of puffing activity in salivary gland chromosomes of Drosophila. V. Response to environmental treatments. Chromosoma, 31: 356-376.
- ASHBURNER, M. - 1970b. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. Advanc. Insect Physiol., 1: 1-95.
- ASHBURNER, M. - 1971a. Induction of puffs in polytene chromosomes of "in vitro" cultured salivary glands of Drosophila melanogaster by ecdysone and ecdysone analogues. Nature New Biol., 230: 222-224.

ASHBURNER, M.- 1971b. Ecdysone induction of puffing in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Exp. Cell Res., 71: 433-440.

ASHBURNER, M.- 1972. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila. IV. Induction by ecdysone in salivary glands of DD. melanogaster cultured 'in vitro'. Chromosoma (Berl.), 38: 255-281.

ASHBURNER, M.- 1974. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. II. The effects of inhibitors of protein synthesis. Devlop. Biol., 39: 141-157.

ASHBURNER, M. & BERENDES, H.D.- 1978. Puffing of polytene chromosomes. IN: The genetics and biology of Drosophila". M. ASHBURNER & T.R.F. WRIGHT eds. Ac. Press. pp315-376.

ASHBURNER, M. & RICHARDS, G.- 1976. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. III. Consequence of ecdysone withdrawal. Develop. Biol., 54: 241-255.

ASHBURNER, M.; CHIHARA, C.; MELTZER, P. & RICHARDS, G.- 1974. Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quan. Biol., 38: 655-662.

AVIV, H. & LEDER, P.- 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo thymidilic acid-cellulose.

BALBIANI, E.G.- 1881. Sur la structure du novau des cellules salivaries chez les larves de Chironomus. Zool.Anz., 4: 662-666.

BANTLE, J.A.; MAXWELL, I.H. & HAHN, W.E.- 1976. Specificity of oligo (dT)-cellulose chromatography in the isolation of polyadenylated RNA. Analytical Biochem., 72: 413-427.

BARBOSA, M.L.- 1984. Efeito "in vitro" da ecdisterona sobre cromossomos de glândulas salivares de Trichosia pubescens (Diptera: Sciaridae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo.

BAUER, H.- 1935. Der ^{Aufbau} ~~aufbau~~ der Chromosomen aus den Speicheldrüsen von Chironomus thumi kiefer (Untersuchungen an den ^{Rie} ~~Res~~ ^{sen} chromosomen der Diptera I). Z.Zellforsch.Mikroök.Anat., 23: 280-313.

BAUER, H. & BEERMANN, W.- 1952. Die ^P polytanie der ^R Riesenchromosomen. Chromosoma (Berl.), 4: 630-648.

BAULIEU, E.E.; ATGER, M.; BEST-BELPOMME, M.; CORVOL, P.; COURVALIN, J.C.; MESTER, J.; MILCROM, E.; ROBEL, P.;

ROCHEFORT, H. & de CATALOGNE, D.- 1976. Steroid hormone receptors. Vitam. Horm., 33: 649-738.

BEERMANN, W.- 1952. Chromomerenkontanz und spezifische ^{Modi} Modifikationen der Chromosomenstruktur in der ^{Entwicklung} Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans. Chromosoma (Berl.), 5: 139-198,

BEERMANN, W.- 1956. Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 21: 217-232.

BEERMANN, W.- 1961. Ein Balbiani ring als Locus einer Speicheldrüsen-^m mutation. Chromosoma (Berl.), 12: 1-25.

BENOZZATI, M.L.- 1978. Estudo da síntese de proteínas da secreção salivar de larvas de Trichosia pubescens (Diptera: Sciaridae). Tese de Doutorado. Departamento de Biologia do Instituto de Biocências da Universidade de São Paulo. São Paulo.

BENOZZATI, M.L. & AMABIS, J.M.- 1983. Salivary secretion proteins in Trichosia pubescens: Composition and synthesis during late larval development. Insect Biochem., 13: 615-625.

- BERENDES, H.D.- 1967. The hormone ecdysone as effector of specific changes in the pattern of gene activity of Drosophila hydei. Chromosoma (Berl.), 22: 274-293.
- BERENDES, H.D. & THIJSSSEN, W.T.M.- 1971. Developmental changes in genome activity in Drosophila lebanonensis casteeli. Pipkin. Chromosoma (Berl.), 33: 345-360.
- BERENDES, H.D.; van BREUGEL, I.M.A. & HOLT, T.K.H.- 1965. Experimental puffs in Drosophila hydei salivary gland chromosomes. Chromosoma (Berl.), 16: 35-46.
- BERGER, C.A.- 1940. The uniformity of the gene complex in nuclei of different tissues. J.Hered., 31: 3-4.
- BIESSMANN, H.; GJERSET, R.A.; LEVY, W.B. & MCCARTHY, B.J.- 1967. Fidelity of chromatin transcription in vitro. Biochemistry, 15: 4356-4363.
- BISHOP, J.O.; PEMBERTON, R. & BAGLIONI, C.- 1972. Reiteration frequency of haemoglobin genes in the duck. Nature New Biol., 235: 231-234.
- BONALDO, M.F. & LARA, F.J.S.- 1978. Identification of a transcript from a DNA puff. Anais do 3^o Congresso Latinoamericano de Genética, pp 15-25.

A
 BONALDO, M.F.; SNTELLI, R.V. & LARA, F.J.S. - 1979. The transcript from a DNA puff of Rhynchosciara and its migration to the cytoplasm. Cell, 17: 827-833.

BONNER, J.J. & KERBY, R.L. - 1982. RNA polymerase II transcribes all of the heat shock induced genes of Drosophila melanogaster. Chromosoma(Berl.), 85: 93-108.

BONNER, W. & LASKEY, R. - 1974. A film detection method tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem., 46: 83-88.

BONNER, J.J. & PARDUE, M.L. - 1976. Ecdysone stimulated RNA synthesis in imaginal discs of Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 58: 87-99.

BRADFORD, M. - 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein -dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.

BRECHER, P.; VGERKY, R.; WOTIZ, H.S. & WOTIZ, H.H. - 1967. An "in vitro" system for the binding of estradiol to rat uterine nuclei. Steroids, 10: 635-650.

BREUER, M.E. & PAVAN, C. - 1952. Gens na diferenciação. Ciênc. Cult., 3: 115.

- BREUER, M.E. & PAVAN, C.- 1953. Salivary chromosomes and differentiation. Caryologia (supl.2):778.
- BREUER, M.E. & PAVAN, C.- 1955. Behavior of polytene chromosomes of Rynchosciara angelae at different stages of larval development. Chromosoma (Berl.), 7: 317-386.
- BREUGEL, F.M.A. van- 1966. Puff induction in larval salivary gland chromosomes of Drosophila hydei sturtevant. Genetica, 37: 17-28.
- BRIDGES, C.B.- 1935. Salivary chromosomes maps. J.Hered., 26: 60-64.
- BULLER, R.E.; SCHRADER, W.T. & O'MALLEY, B.W.- 1975a. Progesterone-binding components of chick oviduct. IX. The kinetics of nuclear binding. J.Biol.Chem., 250: 809-818.
- BULLER, R.E.; TOFT, D.O.; SCHRADER, W.T. & O'MALLEY, B.W.- 1975b. Progesterone-binding components of chick oviduct. VII. Receptor activation and hormone dependent binding to purified nuclei. J.Biol.Chem., 250: 801-808.
- BÜNSEN, W.; AMABIS, J.M.; LEONCINI, O.; STOLLAR, B.D. & LARA, F.J.S.- 1982. Immunofluorescent characterization of DNA-RNA hybrids on polytene chromosomes of Trichosia pubescens (Diptera: Sciaridae). Chromosoma (Berl.), 87: 247-262.

BUTENANDT, A. & KARLSON, P. - 1954. "Über die Isolierung eines
Metamorphosenhormons der Insekten in kristallisierter Form.

Z. Naturforsch., 9: 389-391.

CLEVER, U. - 1964a. Puffing in giant chromosomes of Diptera and
the mechanisms of its control. In: Nucleohistones. J. BONNER
& P. T'SO eds.. Holden-Day, San Francisco. pp 317-334.

CLEVER, U. - 1964b. Actinomycin and puromycin: effects on
sequential gene activation by ecdysone. Science, 146:
794-795.

CLEVER, U. & KARLSON, P. - 1960. Induktion von Puffänderungen in
den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch
Ecdyson. Exp. Cell Res., 20: 623-627.

CLEVER, U. & ROMBALL, C.G. - 1966. RNA and protein synthesis in
the cellular response to a hormone, ecdysone.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56: 1470-1476.

COFFEY, S. - 1971. Rodd's Chemistry of Carbon Compounds. vol. 12-
Steroids. 2nd ed.

CRIGUE, H.V. - 1968. The role of ecdysone in DNA puff formation
and the DNA synthesis in the polytene chromosomes of Sciara
coprophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61: 971-978.

DeSOMBRE, E.R. - 1969. Purification of an estr^ophilic protein from
calf uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64: 148-154.

DESSEN, E.M.B. & PERONDINI, A.L.P. - 1976. Evidence of hormonal control of the nucleolar activity in Sciara ocellaris. Cell Differentiation, 5: 275-282.

EMMERICH, H. - 1970. Ecdysonbindende ^P proteifractoren in den ⁿ Speicheldrüsen von Drosophila hydei. Z. Vergl. Physiol., 68: 385-402.

EMMERICH, H. - 1972. Ecdysone binding protein in nuclei and chromatin from Drosophila salivary glands. Gen. Com. Endocrin., 19: 543-551.

FERREIRA, J.F. - 1981. Efeito da ecdisterona sobre pufas de DNA de Trichosia pubescens. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo.

FLORKIN, M. & STOTZ, E.H. - 1963. Sterols, Bile and Steroids. In: Encyclopaedia Britannica Inc. 1980- Benton, H.H. publ.

FUKUDA, S. - 1940a. Induction of pupation in silkworm by transplantating the prothoracic gland. Pro. Imp. Acad. (Tokyo), 16: 414-416. appud - SMITH, S.L. 1985.

FUKUDA, S. - 1940b. Hormonal control of molting and pupation in the silkworm. Proc. Imp. Acad. (Tokyo), 16: 417-420. appud - SMITH, S.L. 1985.

- FUKUDA, S.- 1944. The hormonal mechanism of larval molting and metamorphosis in the silkworm. J.Fac.Sci. Tokyo Univ., 6: 477-482. appud- SMITH, S.L. 1985.
- GABRUSEWYCZ-GARCIA, N.- 1964. Cytological and autoradiographic studies in Sciara coprophila salivary chromosomes. Chromosoma(Berl.), 15: 312-344.
- GABRUSEWYCZ-GARCIA, N.- 1971. Studies in polytene chromosomes of Sciaridae. I. The salivary chromosomes of Sciara (lycoriella) paucisetata (II), Felt. Chromosoma (Berl.), 33: 421-435.
- GAGE, L.P. & MANNING, R.F.- 1976. Determination of the multiplicity of the silk fibroin gene and detection of fibroin gene-related DNA in the genome of Bombyx mori. J.Mol.Biol., 101: 327-348.
- GALL, J.G.- 1963. Chromosomes and cytodifferentiation. IN: M. LOCK ed. Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis. Ac Press, N.Y. pp 119-143.
- GILBERT, L.I.- 1964. Physiology of growth and development : Endocrine aspects. IN: M. ROCKSTEIN ed. The Physiology of Insecta. Ac Press. vol1, pp 153.

- GILBERT, L.I.- 1974. Endocrine action during insect growth. IN: R.O.GREEP ed. Recent Progress in Hormone Research. Ac Press, vol. 30, pp347-390.
- GOODWIN, T.W.; HORN, D.H.S.; KARLSON, P.; KOOLMAN, J.; NAKAMISHI, K.; ROBBINS, W.E.; SIDDALL, J.B. & TAKEMOTO, T.- 1978. Ecdysteroids: a new generic term. Nature, 272: 122.
- GRONEMEYER, H & PONGS, O.- 1980. Localization of ecdysterone on polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77: 2108-2112.
- GRONEMEYER, H.; HAMEISTER, H. & PONGS, O.- 1981. Photoinduced bonding of endogenous ecdysterone to salivary gland chromosomes of Chironomus tentans. Chromosoma (Berl.), 82: 543-559.
- GROSSBACH, U.- 1969. Chromosomenaktivität und biochemische Zell¹ differenzierung in den Speicheldrüsen^M von Comptochironomus. Chromosoma (Berl.), 28: 136-187.
- GROSSBACH, U.- 1973. Chromosome puffs and gene expression in polytene cells. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 38:619-627.
- GUEVARA PAREDES, M.- 1970. Estudo citológico da fisiologia e diferenciação cromossômica durante o desenvolvimento larval de Rhynchosciara angelse. Tese de Doutorado.

Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. São Paulo.

GUEVARA PAREDES, M. & BASILE, R. - 1973. DNA and RNA puffs in
Rhynchosciara. Caryologia, 26: 273-295.

HECHTER, O. & HALKERSTON, I. D. K. - 1965. Effects of Steroid
hormone on gene regulation and cell metabolism.
Ann. Rev. Physiol., 27: 133-167.

HEITZ, E. & BAUER, H. - 1933. Beweise für die chromosomen- natur
der kernschleifen in den knäuelbernen von Bibio
hortulanus. Z. Zell Forsch., 17: 68-82.

HELMSING, P. J. - 1972. Induced accumulation of nonhistone
proteins in polytene nuclei of Drosophila hydei.
II. Accumulation of protein in polytene nuclei and chromatin
of different larval tissues. Cell Differ., 1: 19-24.

HELMSING, P. J. & BERENDES, H. D. - 1971. Induced accumulation of
nonhistone proteins in polytene nuclei of Drosophila hydei.
J. Cell Biol., 50: 893-896.

HENIKOFF, S. & MESELSON, M. - 1977. Transcription at two heat
shock loci in Drosophila. Cell, 12: 441-451.

HOFFMEISTER, H. - 1966. Isolierung eines neuen insektenhormones
aus seiden Spinnerpuppen. Z. Naturforsch., 21b: 335-336.

HUBER, R. & HOPE, W.- 1965. Zur chemie des ecdyson VII. Die kristall- u molekularstrukturanalyse insektenverpuppungshormone ecdyson mit der automatisierten. Falmdakulmethod Chem. Ber., 98: 2403-2424. appud- SMITH, S.L.-1985..

JAMRICH, M.; GREENLEAF, A.L. & BAUTZ, E.K.F.- 1977. Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74: 2079-2083.

JENSEN, E.V.- 1958. Studies of the growth using tritium labeled steroids. Proceedings of the 4th International Congress of Biochemistry, Viena, vol 15, pp 120.

JENSEN, E.V. & JACOBSON, H.I.- 1962. Basic studies to the mechanisms of estrogen action. Recent Progr.Horm.Res., 18: 387-414.

JENSEN, E.V.; SUSUKI, T.; KAWASHIMA, T.; STUMPF, W.E.;

JUNGBLUT, P.W. & DeSOMBRE, E.R.- 1968. A two step mechanism for the interactio of estradiol with rat uterus.

KAFATOS, F.C.- 1977. The eggshell of insects. IN: W.BEERMANN ed. Biochemical differentiation in Insect Glands. Springer-Verlag. pp 45-145.

KARLSON, P.- 1961. Biochemical mechanisms of hormone action. Dtsch.Med.Wochenschr., 86: 668-673. appudd HECHTER, O. 1965.

KARLSON, P.- 1963. New concepts on the mode of action of hormones. Perspectives Biol. Med., 6: 203-214.

KARLSON, P.; HOFFMEISTER, H.; HOPPE, W. & HUBER, R.- 1963. Zur Chemie des Ecdysons. Liebigs Ann. Chem., 662: 1-20. appud WIGGLESWORTH, V. B. 1972.

KEDINGER, C.; GNIAZDOWSKI, M.; MANDEL, J. L.; GISSINGER, F. CHAMBON, P.- 1970. Alfa-amanitine: a specific inhibitor of two DNA- dependent RNA- polymerase activities from calf thymus. Biochem. Biophys. Res. Commun., 38: 165-171.

KERKURT, G. A. & GILBERT, L. I.- 1985. Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Pergamon Press, Oxford.

KING, D. S.- 1972. Ecdysone metabolism in insects. Amer. Zool., 12: 343-345.

KITAGAWA, Y & STOLLAR, B. D.- 1982. Comparison of poly(A).poly(dT) and poly(I).poly(dC) as immunogens for the induction of antibodies to DNA/RNA hybrids. Molec. Immunol., 19: 413-420.

KOLTZOFF, N.- 1934. The structure of the chromosomes in the salivary glands of Drosophila. Science, 80: 312-313.

- KOPEC, S.- 1922. Studies on the inception of insects metamorphosis. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole, 42: 322-342.
- KORGE, G.- 1975. Chromosome puff activity and protein synthesis in larval salivary glands of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 4550-4554.
- KORGE, G.- 1977. Larval saliva in Drosophila melanogaster: production, composition and relationship to chromosome puffs. Develop. Biol., 58: 339-355.
- KRAMER, A.; HAARS, R.; KABISCH, R.; WILL, H.; BAUTZ, F.A. & BAUTZ, E.K.F.- 1980. Monoclonal antibody against RNA polymerase II of Drosophila melanogaster. Molec. Gen. Genet., 180: 193-199.
- KROEGER, H.- 1966. Potentialdifferenz und puff-muster elektrophysiologische und cytologische untersuchungen an den speicheldrüsen von Chironomus thummi. Expl. Cell Res., 41: 64-80.
- KURSTAK, E.; MARAMOROSCH, K. & DUBENDORFER, A. eds.- 1980. Invertebrate Systems in vitro. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 598pp.

LAEMMLI, U.K.- 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

LAICINE, E.M.; SAUAIA, H.; ALMEIDA, J.C.; ALVES, M.R. & ALBERNAZ, W.C.- 1980. Expressão gênica na glândula salivar de Bradysia hygida no último estágio larval. Abstr. II Congr. Bras. Biol. Celular.: 226-227.

LEHNINGER, A.L.- 1977. Biochemistry. Worth Publishers, Inc. 2nd ed. 1104pp.

LINDELL, T.J.; WEINBERG, F.; MORRIS, P.W.; ROEDER, R.G. & RUTTER, W.J.- 1970. Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alfa-amanitine. Science, 170: 447-449.

LISK, R.D.- 1971. The physiology of hormone receptors. Amer. Zool., 11: 755-767.

MAC GILLIVRAY, A.J.; CAMERON, A.; KRAUZE, R.J.; RICKWOOD, D. & PAUL, J.- 1972. The non-histone proteins of chromatin. The isolation and composition in a number of tissues. Biochem. Biophys. Acta, 277: 384-402.

MACHADO-SANTELLI, G.M. & BASILE, R.- 1975. DNA replication and DNA puffs in salivary chromosomes of Rhynchosciara. Ciência e Cultura, 27: 167-174.

- MAROY, P.; DENNIS, R.; BECKERS, C.; SAGE, B.A. & O'CONNOR, J.D.-
1978. Demonstration of an ecdysteroid receptor in a
cultured cell line of Drosophila melanogaster.
Prroc.Natl.Acad.Sci.USA, 75: 6035-6038.
- MAURER, H.R. & CHALKLEY, G.R.- 1967. Some properties of a
nuclear binding site of estradiol. J.Mol.Biol., 27:
431-441.
- McKENZIE, S.L.; HENIKOFF, S. & NIELSON, M.- 1975. Localization of
RNA from heat induced polysomes at puff sites in Drosophila
melanogaster. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72: 1117-1121.
- MECHELKE, F.- 1953. Reversible strukturmodifikationen der
speicheldrusenchromosomen von Acricotopus lucidus.
Chromosoma (Berl.), 5: 511-543.
- METZ, C.W.- 1935. The salivary gland chromosomes in Sciara.
J.Hered., 26: 177-188.
- MOHLA, S.; DeSOMBRE, E.R. & JENSEN, E.V.- 1972. Tissue- specific
stimulation of RNA synthesis by transformed estradiol-
receptor complex. Biochm.Biophys.Res.Commun., 46: 661-667.
- MORGANTE, J.S.- 1969. Three new species of brazilian Sciaridae
(Diptera, Nematocera). Rev.Bras.Biol., 29: 571-576.

- NOTEBOOM, W.D. & GORSKI, K.- 1965. Stereospecific binding of estrogens in rat uterus. Arch.Biochem.Biophys., 111: 559-568.
- O'CONNOR, J.D.- 1985. Ecdysteroid action at the molecular level. IN: G.A.KERKURT & L.I.GILBERT. Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Pergamon Press, Oxford. cap3, vol8 pp 85-102.
- OKRETIC, M.C.; PENONI, J.S. & LARA, F.J.S.- 1977. Messenger-like RNA synthesis and DNA chromosomal puffs in the salivary gland of Rhynchosciara americana. Biochem.Biophys.Acta, 178: 153-165.
- O'MALLEY, B.W.; SCHWARTZ, R.J. & SHRADER, W.T.- 1976. A review of regulation of gene expression by steroid hormone receptors. J.Steroid Biochem., 7: 1151-1159.
- O'MALLEY, B.W.; SPELSBERG, T.C.; SCHRADER, W.T.; CHYTIL, F. & STEGGLES, A.W.- 1972. Mechanisms of interaction of a hormone-receptor complex with the genome of a eukaryotic target cell. Nature, 235: 141-144.
- O'MALLEY, B.W. & TOFT, D.O.- 1971. Progesterone binding components of chick oviduct. II. Nuclear components. J.Biol.Chem., 246: 1117-1122.

- O'MALLEY, B.W.; TOWLE, H.C. & SCHWARTZ, R.J.- 1977. Regulation of gene expression in eucaryotes. Ann.Rev.of Gen., 11: 239-275.
- PAVAN, C.- 1965a. Nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and the problem of differentiation. Brookhasen Symp.Biol., 18: 222-241.
- PAVAN, C.- 1965b. Chromosomal differentiation. Natl. Cancer Inst. Monograph, 18: 309-323.
- PAVAN, C & BREUER, M.E.- 1952. Polytene chromosomes in different tissues of Rhynchosciara angelae. J.Hered., 43: 150-157.
- PAVAN, C. & BREUER, M.E.- 1955. Differences in nucleic acid content of the loci in polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae, according to tissue and larval stages. IN: Simpósio Sobre Secreção Celular, Belo Horizonte: 90-99.
- PAVAN, C. & Da CUNHA, A.B.- 1969. Chromosomal activities in Rhynchosciara and other Sciaridae. Ann.Rev.Gen., 3: 425-450.
- PERONDINI, A.L.P.- 1968. Estudo citológico e autorradiográfico dos cromossomos politênicos de Bradysia tritici (Coquillet, 1985). Tese de Doutorado. Departamento de Biologia,

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de
São Paulo. São Paulo.

REGGI, M. de- 1977. L'ecdysone, hormone de la differenciation
sexuelle. La Recherche, 8: 479-481.

REIFFEL, S.M. & CROUSE, H.- 1966 The elimination and
differentiation of chromosomes in germ line of Sciara.
Chromosoma (Berl.), 19: 231-276.

RICHARDS, G.- 1976a. Sequential gene activation by ecdysine in
polytene chromosomes of Drosophila melanogaster: IV. The mid
prepupal period. Develop. Biol., 54: 256-263.

RICHARDS, G.- 1976b. Sequential gene activation by ecdysone in
polytene chromosomes of Drosophila melanogaster: V. The late
prepupal puffs. Develop. Biol., 54: 264-275.

RIDDIFORD, M.L.- 1980. Insect endocrinology: action of hormones
at the cellular level. Ann. Rev. Physiol., 42: 511-528.

RITOSSA, F.- 1962. A new puffing pattern induced by heat shock
and DNP in Drosophila. Experientia, 18: 571-573

RITOSSA, F.- 1963. New puffs induced by temperature shocks, DNP
and salicylate in salivary chromosomes of Drosophila
melanogaster. Drosophila Inf. Serv., 37: 122-123.

- ROMER, F.; EMMERICH, H. & NOWOCK, J.- 1974. Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of Tenbrio molitor in vitro. J. Insect Physiol., 20: 1975-1987.
- RUDKIN, G.T. & STOLLAR, B.D.- 1977. Naturally occurring DNA.RNA hybrids. I. Normal patterns in polytene chromosomes. IN: ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. vol VII (R.S.SPARKERS; D.E.COMINGS & C.F.FOX eds.) Ac.Press, pp 257-269.
- SAGE, B.A.; TANIS, A. & O'CONNOR, J.D.- 1982. Characterization of ecdysteroid receptors in cytosol and native nuclear preparation of Drosophila Kc cells. J. Biol. Chem., 257: 6373-6379.
- SAKURAI, S.; IKEKAWA, N.; OHTAKI, T. & CHINO, H.- 1977. 3 β -hydroxy-5-cholestan-6-one: a possible precursor of alfa-ecdysone biosynthesis. Science, 198: 627-629.
- SAUAIA, H.; LAICINE, E.M. & ALVES, M.A.R.- 1971. Hydroxyurea induced inhibition of DNA puff development in the salivary gland chromosomes of Bradysia hygida. Chromosoma (Berl.), 34: 129-151.
- SCHALTMANN, K. & PONGS, O.- 1982. Identification and characterization of the ecdysterone receptor in Drosophila melanogaster by photoaffinity labeling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6-10.

- SCHRADER, W.T. & O'MALLEY, B.W.- 1972. Progesterone- binding components of chick oviduct: IV. Characterization of purified subunits. J. Biol. Chem., 247: 51-59.
- SCHRADER, W.T.; HEUER, S.J. & O'MALLEY, B.W.- 1975. Progesterone receptor of chick oviduct: Identification of 6S receptor. Biol. Repord., 12: 134-142.
- SCHWARTZ, R.J.; KUHN, R.W.; BULLER, R.E.; SCHRADER, W.T. & O'MALLEY- 1976. Progesterone- binding components of chick oviduct : XI. In vitro effects of purified hormone- receptor complexes on the initiation of RNA synthesis in chromatin. J. Biol. Chem., 251: 5166-5177.
- SEMESHIN, V.F.; BARICHEVA, E.M.; BELYAEVA, E.S. & ZHIMULEV, I.F.- 1985. Electron microscopical analysis of Drosophila polytene chromosomes. II. Development of complex puffs. Chromosoma, 91: 210-233.
- SIMÕES, L.C.G.- 1967. Síntese de DNA durante o desenvolvimento larval de Rhynchosciara sp. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- SIMÕES, L.C.G.- 1970. Studies on DNA synthesis during larval development of Rhynchosciara sp. Rev. Bras. Biol., 30: 191-199.

SMITH, S.L.- 1985. Regulation of ecdysteroid titer: synthesis.

IN G.A.KERKURT & L.I.GILBERT. Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Pergamon Press. vol 7, cap 8. pp 295-342.

SPRADLING, A.; PENMAN, S. & PARDUE, M.L.- 1975. Analysis of Drosophila mRNA by in situ hybridization : sequences transcribed in normal and heat shocked culture cells. Cell, 4: 395-404.

STOCKER, A.J. & PAVAN, C.- 1974. The influence of ecdysone on gene amplification, DNA synthesis and puff-formation in the salivary gland chromosomes of Rhynchosciara hollaendere. Chromosoma (Berl.), 45: 295-319.

SUZUKI, Y.; CAGE, L.D. & BROWN, D.D.- 1972. The genes for silk fibroin in Bombyx mori. J.Mol.Biol., 70: 637-649.

SWIFT, H.- 1962. Nucleic acid and cell morphology in Diptera salivary gland. IN: J.M.ALLEN org. The molecular control of cellular activity. McGraw-Hill Book Co., Inc. pp 75-105.

TISSIÈRES, A.; MITCHELL, H.K. & TRECY, U.M.- 1974. Protein synthesis in salivary glands of D. melanogaster: relation to chromosome puffs. J.Mol.Biol., 84: 389-398.

TOFT, D. & GORSKI, J.- 1966. A receptor molecule for estrogens isolation from the rat uterus and preliminary characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 55: 1574-1581.

deTOLEDO, S.M. & LARA, F.J.S.- 1977. Translation of a RNA transcribed from the puff B-2 from Rhynchosciara americana salivary gland chromosome. An. Acad. Bras. Ciênc., 50: 119.

TOMKINS, G.M. & MARTIN Jr., D.W.- 1970. Hormones and gene expression. Ann. Rev. Genetics, 4: 91-106.

VELISSARIOU, V. & ASHBURNER, M.- 1980. The secretory proteins of the larval salivary gland of Drosophila melanogaster- Cytogenetic correlation of a protein and a puff. Chromosoma (Berl.), 77: 13-27.

WHITE, M.J.D.- 1948. The cytology of the cecidomyidae (Diptera). IV. The salivary gland chromosomes of several species. J. Morphol., 87: 53-80.

WIGGLESWORTH, V.B.- 1934. The physiology of ecdysis in Rhodnius prolixus (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and metamorphosis. Quart. J. Mic. Sci., 77: 191-222.

WIGGLESWORTH, V.B.- 1936. The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of Rhodnius prolixus (Hemiptera). Quart. J. Mic. Sci. 79: 91-121.

WIGGLESWORTH, V.B.- 1940. The determination of characters at metamorphosis in Rhodnius prolixus (Hemiptera). J. Exp. Biol., 17: 201-222.

WIGGLESWORTH, V.B.- 1970. Insect Hormones. Oliver & Boyd ed. Edinburg.

WIGGLESWORTH, V.B.- 1972. The Principles of Insect Physiology. Chapman and Hall. 7th ed.

WILLIAMS, C.M.- 1947. Physiology of insect diapause. II. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of giant silkworm Platysamia cecropia. Biol. Bull., 93: 89-98.

WILLIAMS, C.M.- 1948. Physiology of insect diapause. III. The prothoracic glands in the cecropia silkworm, with special reference to their significance in embryonic and postembryonic development. Biol. Bull., 94: 60-65.

WILLIAMS, C.M.- 1952. Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the cecropia silkworm. Biol. Bull., 103: 120-138.

WINTER, C.E.; BIANCHI, A.G. TERRA, W.R. & LARA, F.J.S.- 1977a. Relationships between newly synthesized proteins and DNA puff patterns in salivary glands of Rhynchosciara americana. Chromosoma (Berl.), 61: 193-206.

WINTER, C.E.; BIANCHI, A.G. TERRA, W.R. & LARA, F.J.S.- 1977b. The giant DNA puffs of Rhynchosciara americana code for polypeptides of the salivary gland secretion. J. Insect Physiol., 23: 1455-1459.

WINTER, C.E.; BIANCHI, A.G. TERRA, W.R. & LARA, F.J.S.- 1980. Protein synthesis in the salivary glands of Rhynchosciara americana. Develop. Biol., 75: 1-12.

YUND, M.A.; KING, D.S. & FRISTOM, J.W.- 1978. Ecdysteroid receptor in imaginal discs of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 6039-60433.

ZALOKAR, M.- 1961. Control mechanisms in cellular processes. Ronald Press. pp 87-140. appud: HECHTER, D. & HALKERSTON, I.D.K. 1965.

ZHIMULEV, I.F.; SEMESHIN, V.F. & BELYAEVA- 1981. Informational content of polytene chromosome bands and puffs. CRC Crit. Rev. Biochem., 11: 303-340.