

WANDER CAIRO ALBERNAZ

INIBIÇÃO SELETIVA DO DESENVOLVIMENTO DOS PUFES DE  
DNA PELO 2,3-dihidro-1H-imidazo (1,2-b) pirazol  
(IMPY) E SÍNTESE DE PROTEÍNAS NA GLÂNDULA SALIVAR  
DE *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae).

Tese de Doutorado apresentada  
à Faculdade de Medicina de Ribeirã  
rão Preto da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título  
de Doutor em Ciências (Bioquímica).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Heni Sauaia

RIBEIRÃO PRETO

- 1 9 8 2 -

Como companheiro e pai dedicado  
esse trabalho, que representa  
o esforço de alguns anos, à  
Irlandes, Lister e Míriam.

## Agradecimentos

Ao Dr. Heni Sauaia, o "chefe", orientador seguro, dedicado e amigo.

À Universidade Federal de Goiás e, de modo particular ao Departamento de Bioquímica e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas, pela dispensa das atividades didáticas durante a realização desse trabalho.

À equipe de trabalho do Laboratório de Biologia Celular: Eduardo, Elizete, Jorge, José Maria, Maria Aparecida, Maria Luisa e Maurílio pela amizade, sugestões e colaboração.

À Maria Luisa Orsi Mendes (Malu) pela excelente colaboração técnica.

Ao Luiz Alberto e Joana Dalva pela manutenção da cultura de *Bradysia hygida*.

À Irlandes pelo desenho dos gráficos.

À Capes pela bolsa de estudo.

À todos que direta ou indiretamente nos auxiliaram na execução desse trabalho.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	9
2.1. Material biológico .....	9
2.2. Material químico .....	11
2.3. Injeção nas larvas .....	11
2.4. Remoção das glândulas e preparo das amostras .....	12
2.5. Eletroforese .....	13
2.6. Aplicação das amostras e eletroforese .....	14
2.7. Fixação, coloração e remoção do excesso de corante ...	15
2.8. Fluorografia .....	15
2.9. Secagem do gel .....	16
2.10. Exposição .....	17
2.11. Densitometria .....	18
2.12. Negativo fotográfico .....	19
a. Obtenção .....	19
b. Leitura .....	20
c. Varredura .....	20
2.13. Radiometria .....	22
<b>III. RESULTADOS</b> .....	23
1. Densitometria .....	23
2. Efeito do IMPY quando injetado na idade m3 .....	23
3. Efeito do IMPY em larva jovem .....	27
<b>IV. DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>V. SUMÁRIO</b> .....	35
<b>VI. SUMMARY</b> .....	36
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	37
<b>APÊNDICE A</b> .....	46
<b>APÊNDICE B</b> .....	48

## ABREVIATURAS

BIS	- N,N' - metileno-bis-acrilamida
DMSO	- Sulfóxido de dimetila
DNA	- Ácido desoxirribonuclêico
HCl	- Ácido clorídrico
IMPY	- 2-3 dihidro-1-H-imidazo(1,2-b)pirazol
PPO	- 2,5-difeniloxazol
RNA	- Ácido ribonuclêico
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
TCA	- Ácido tricloroacético
TEMED	- N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TRIS	- Tris (hidroximetil)-aminometano

## I. INTRODUÇÃO

A investigação dos processos de diferenciação celular emprega, por causa de sua complexidade, diversas abordagens, cada qual mais ou menos favorecida pela utilização de um certo tipo de material biológico. Um dos temas de interesse nessa área são as modificações que ocorrem na cromatina ao longo do desenvolvimento de um tipo celular, atividade especialmente ligada ao estudo de tecidos dotados de cromossomos politênicos, nos quais a cromatina se organiza de modo excepcionalmente favorável para a observação de mudanças restritas a partes diminutas do genoma.

Dentre as modificações funcionais da cromatina, têm recebido especial atenção os pufes cromossômicos, protuberâncias associadas a descompactações locais que ocorrem em padrões característicos de espécie, tecido e idade, em sequência muito reproduzível ao longo do desenvolvimento. O interesse por essas modificações exibidas pelo cromossomo politênico tornou-se particularmente forte desde o início da década de 50, ao ser proposta a hipótese de que os pufes correspondam a manifestações morfológicas de atividade gênica (Beermann, 1952; Breuer e Pavan, 1952).

Até os meados da década de 70, a hipótese apoiou-se principalmente na demonstração auto-radiográfica de que os pufes cromossômicos se marcam intensamente por precursores de RNA (Pelling, 1959, 1964) e em correlações, fortemente sugere

tivas, de pufes cromossômicos com entidades citoplasmáticas nas células glandulares (Beermann, 1961) ou com proteínas específicas na glândula salivar (Pannitz, 1967; Baudish & Panitz, 1968; Grossbach, 1969, 1973). Essas correlações se tornaram mais convincentes com a demonstração de que duplicações e deficiências de segmentos cromossômicos formadores de pufes na glândula salivar se acompanham de maior ou menor quantidade de determinadas frações protéicas, detectáveis por eletroforese (Korge, 1975, 1977; Velissariou & Ashburner, 1980, 1981). A linha de trabalho que conduziu às evidências mais persuasivas a favor da hipótese derivou da observação de que a transferência de larvas da temperatura usual para a temperatura de 37°C provoca rapidamente nos cromossomos politênicos da glândula salivar e de outros tecidos de *Drosophila* o aparecimento de pufes que não ocorrem no desenvolvimento normal e, ao mesmo tempo, faz regredir os pufes antes ativos (Ritossa, 1962, 1963, 1964a, 1964b). Ao serem induzidos os pufes de choque térmico, também é induzida a síntese de novas proteínas e inibida a síntese das que vinham sendo feitas, propriedade apresentada também por tecidos larvais desprovidos de cromossomos politênicos (Tissières et al., 1974; Lewis et al., 1975). Preparações de RNA polissômico poliadenilado, feitas após choque térmico, a partir de células cultivadas de *Drosophila* ou de tecidos larvais, hibridizam-se "in situ" seletivamente com DNA dos pufes induzidos pelo tratamento (Spradling et al., 1975; McKenzie et al., 1975; Bonner & Pardue, 1976) e traduzem-se "in vitro" em proteínas características de choque térmico (McKenzie & Meselson, 1977; Sondermeijer & Lubsen, 1978; Mirault et al., 1978, Moran et al., 1978). A utilização de métodos de DNA recombinante produziu boas confirmações de que há corres

pondência entre pufes individuais, espécies de RNAs mensageiros e proteínas específicas de choque térmico (Livak et al., 1978; McCarthy et al., 1978; Schedl et al., 1978; Holmgren et al., 1979; Craig et al., 1979). Linhagens de *Drosophila* deficientes quanto ao segmento cromossômico portador de dois desses pufes deixam de sintetizar a principal proteína induzida pelo choque térmico (Ish-Horowicz et al., 1979; ver também a revisão de Ashburner & Bonner, 1979).

Evidências de que pufes cromossômicos produzem RNA mensageiro foram obtidas também em *Chironomus*, com a demonstração de que frações de RNA citoplasmático poliadenilado marcam seletivamente os anéis de Balbiani 1 e 2 e que RNA extraído de anéis de Balbiani isolados por microdissecção têm propriedades semelhante às de RNA não ribossômico extraído de polissomos (ver as revisões de Edström & Tanguay, 1973; Danaholt & Hosick, 1973; Lambert, 1973; Daneholt, 1974; Edström, 1974; Edström & Lambert, 1975). Além disso, o RNA de alto peso molecular oriundo desses anéis de Balbiani é tradutível "in vitro" em proteínas que apresentam diversas propriedades das principais proteínas elaboradas pela glândula salivar (Rydlander & Edström, 1980; Rydlander et al., 1980; Edström et al., 1980).

Nos sciarídeos, tem sido dada atenção quase exclusiva aos pufes de DNA, alguns dos quais são os maiores pufes a ocorrer nessa família de dípteros. Os pufes de DNA restringem-se a uma etapa curta e tardia do desenvolvimento larval. Além de serem particularmente atraentes como objetos de estudo enquanto pufes cromossômicos, têm ainda a peculiaridade de se acompanharem de síntese adicional, localizada, de DNA (Breuer & Pavan, 1955; Ficq & Pavan, 1957; Rudkin & Corlete,

1957; Gabrusewycs-Garcia, 1964; Crouse & Keyl, 1968; Rasch, 1970). Na verdade, o desenvolvimento desses pufes não somente se acompanha de síntese desproporcionada de DNA mas depende de que tal síntese ocorra (Sauaia et al., 1971; Ribeiro, 1975; Almeida, 1977). Essas características sugerem fortemente que os pufes de DNA impliquem um processo de amplificação gênica com efeito regulador sobre a expressão do segmento cromossômico envolvido, interpretação já oferecida quando da descrição pormenorizada desses pufes em *Rhynchosciara americana* (Breuer e Pavan, 1955).

Diversas evidências produzidas em *Rhynchosciara americana* favorecem essa interpretação. Nesse organismo, há uma correlação temporal muito clara entre o desenvolvimento dos pufes de DNA e mudanças drásticas no perfil de síntese de proteínas (Winter et al., 1977a; Winter et al., 1977b). Foi possível demonstrar também que há uma correlação entre o perfil de RNAs mensageiros e pufes de DNA (Okretic et al., 1977) e obter, por tradução "in vitro" de uma das frações de RNA poliadenilado, um polipéptido com propriedades de uma das proteínas produzidas pela glândula (Toledo e Lara, 1978). Essa fração de RNA poli-A hibridiza-se "in situ" com o DNA desses pufes (Bonaldo et al., 1979). O grau de amplificação de uma sequência presente em um dos pufes de DNA de *Rhynchosciara americana*, avaliado por técnicas que envolvem o uso de DNA recombinante, é da ordem de 16 vezes (Lara, 1981, comunicação pessoal).

Em *Trichosia pubescens* também se observa correlação muito sugestiva entre o desenvolvimento dos pufes de DNA e mudanças no perfil de síntese de proteínas na glândula salivar (Amabis, 1980).

Em *Bradysia hygida* o perfil de síntese de proteínas na idade em que se desenvolve o primeiro grupo de pufes de DNA é claramente diferente do que se observa em idade anterior (Albernaz, 1977). Quando se comparam os perfis fluorográficos das três regiões glandulares desse organismo (S1, S2, S3), amostradas amiudadamente ao longo de todo o quarto estágio larval (Laicine et al., 1980), verifica-se com muita clareza a sucessão de três períodos distintos de síntese de proteínas. O primeiro período mantém-se virtualmente inalterado desde o primeiro dia do quarto estágio até a idade em que começam a expandir-se os primeiros pufes de DNA. O segundo período de síntese dura cerca de 14 horas e nele se observa a presença de algumas frações proeminentes do período anterior e de diversas frações novas. O terceiro período de síntese, cujo perfil difere muito dos anteriores dura também cerca de 14 horas ou seja até perto do fim da muda pupal. É particularmente interessante nessas observações a patente coincidência temporal entre o segundo e o terceiro período de síntese de proteínas e os tempos em que se expandem, respectivamente, o primeiro e o segundo grupos de pufes de DNA nas regiões S1 e S3. Nessas duas regiões glandulares, o padrão de pufes de DNA é o mesmo, exceto por um pufe e por diferenças de grau quanto ao tamanho máximo atingido neste ou naquele pufe. Coincidentemente, os perfis de síntese de proteínas de S1 e S3, muito díspares durante o primeiro período, convergem nos dois períodos seguintes. Na região glandular S2, que não forma pufes de DNA ou os tem muito discretos, não há mudanças patentes nos perfis fluorográficos, sempre bem menos marcados, do primeiro para o segundo períodos de síntese. Durante o terceiro período de síntese é que os perfis fluorográficos de

S2 passam a assemelhar-se aos das duas outras regiões glandulares. Coincide com isso o fato de que diversos segmentos cromossômicos em S2, homólogos a segmentos cromossômicos que em S1 e S3 formam pufes de DNA do segundo grupo, apresentam pufes evidentes, embora relativamente pequenos.

O fato de ser o desenvolvimento dos pufes de DNA dependente de síntese de DNA nos segmentos cromossômicos que os formam torna esses pufes alvo preferencial de agentes que inibam seletivamente a síntese de DNA ou que modifiquem as propriedades do DNA em que venham a incorporar-se. A administração, em idade e doses apropriadas, de hidroxiuréia, IMPY, ou bromodesoxiuridina suprime ou inibe fortemente o desenvolvimento dos pufes de DNA, sem impedir a continuação do desenvolvimento larval e sem perturbar o programa de formação dos pufes de RNA (Suaia et al., 1971; Ribeiro, 1975; Almeida, 1977; Alves, 1981). O efeito desses agentes é altamente reprodutível se aplicados em idade e doses adequadas, o que permite indagar das modificações apresentadas pelo perfil de síntese de proteínas na glândula salivar quando se inibe seletivamente o desenvolvimento dos pufes de DNA.

Se de fato as sugestivas correlações entre mudanças no perfil de síntese de proteínas e desenvolvimento dos pufes de DNA significam uma relação causal, é de prever-se que a inibição seletiva do desenvolvimento dos pufes de DNA resulte na inibição seletiva da síntese daquelas frações características do segundo e terceiro períodos referidos acima. Embora trabalhoso do ponto de vista experimental e ainda introduza uma nova variável implícita no tratamento, esse sistema oferece a possibilidade de uma ação seletiva sobre os pufes de DNA, sem que seja concomitantemente inibido o desenvolvi-

mento das dezenas de pufes de RNA, descritos por Rizzo )1980) e sem que seja impedido o programa de desenvolvimento que leva à histólise da glândula (Alves, 1981).

No presente trabalho, investigamos o efeito de um desses agentes, o 2-3 di-hidro-1-H-imidazo (1,2-b) pirazol (IMPY, Ciba 21,381-Ba), sobre o perfil de síntese de proteínas na glândula salivar em larvas jovens e em idades nas quais se expandem o primeiro e o segundo grupo de pufes de DNA. Essa substância inibe de modo seletivo e reversível a síntese de DNA em células de mamífero (Ennis et al., 1971), assim como no material aqui utilizado (Ribeiro, 1975), e pode ser usada para sincronizar células HeLa (Beer et al., 1974). O mecanismo de sua ação não está completamente esclarecido. Sabe-se que o IMPY interfere com o fornecimento de precursores em alguma etapa anterior à síntese dos trifosfatos de desoxinucleósides (Beer et al., 1974).

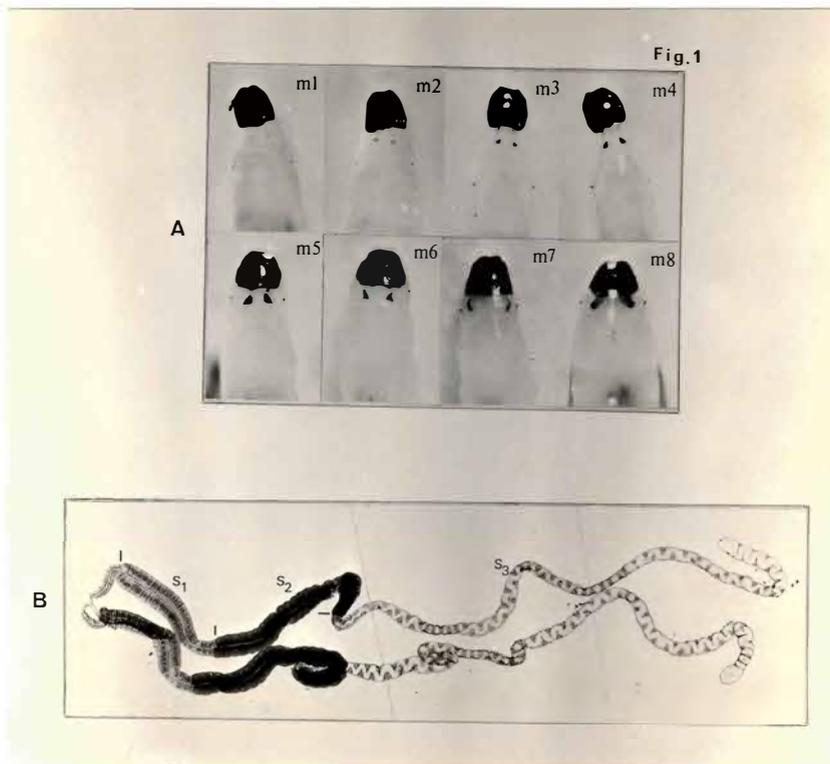


Fig. 1 - A: Padrões de manchas oculares. m1, 6º dia depois da 3a. muda; m2, 7º dia depois da 3a. muda; m3, fim do sétimo dia; m4, m5 e m6, durante o 8º dia; m7, fim do 8º dia; m8, de m7 à muda pupal, que se completa no 10º dia depois da 3a. muda.11X

B: Par de glândulas salivares, de larva fêmea, na idade m3. S1, região anterior; S2, região granulosa; S3, região posterior.13X

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material biológico

Foram usadas larvas fêmeas de *Bradysia hygida* (Suaia e Alves, 1968), cujo ciclo de vida dura cerca de trinta e seis dias quando mantida em cultura a 20°C. Da eclosão à muda pupal, as larvas passam por quatro estádios. O último inicia-se no 12º dia e nele as larvas atingem tamanho máximo, aproximadamente 12 mm de comprimento por 1 mm de diâmetro, para as fêmeas.

Pequenas manchas surgem logo atrás da cabeça, ao fim do sexto ou início do sétimo dia do quarto estádio, modificam-se no tamanho e na forma durante o desenvolvimento e prestam-se para avaliar a idade das larvas (Gabrusewycs-Garcia, 1964). Na figura 1A são mostrados vários padrões de manchas oculares características de diferentes idades de *Bradysia hygida* (Suaia, 1971).

A larva possui um par de glândulas salivares, aproximadamente do comprimento de seu corpo, constituídas por três regiões muito distintas (Figura 1B): anterior (S1), granulosa (S2) e posterior (S3). Em uma amostra de 50 pares de glândulas, as médias dos números de células foram 45 para S1, 53 para S2 e 88 para S3; o coeficiente de variação foi sempre inferior a 6% (Paçó-Larson, 1976).

Durante o padrão m3 de manchas oculares, começam a aparecer os primórdios dos pufes de DNA, que se expandem em duas épocas diferentes. Os do primeiro grupo, representado principalmente pelos formados nos segmentos C4, C5 e C7, atin

ge máxima expansão entre m6 e m7 + 6 horas e os do segundo grupo, representado principalmente pelos pufes A1, A14, B3d, C6, C8a e X4, atinge máxima expansão entre 12 e 18 horas depois de m7; o pufe B10 começa a expandir-se com os do primeiro grupo, atinge máxima expansão cerca de 8 horas depois de m7 e chega acompanhar os pufes do segundo grupo. Todos esses pufes de DNA são comuns às regiões S1 e S3 exceto o pufe C7, que falta em S3.

Ao tempo em que se expandem em S1 e S3 os pufes de DNA do primeiro grupo, a região glandular S2 não forma pufes nos segmentos cromossômicos correspondentes ou os tem relativamente muito pequenos; assim, não se detecta em S2 nessa idade, ao simples exame microscópico, pufe em C7 e são de tamanho reduzido os que aparecem em C4 e C5. Durante a expansão dos pufes de DNA do segundo grupo em S1 e S3, a região glandular S2 não forma pufes em A14, apresenta pufes pequenos em A1 e B3d, mas, exhibe pufes de tamanho considerável em C6, C8a e X4. Em S2, há um pufe B10, pequeno (Rizzo, 1980). O estudo autoradiográfico da incorporação de timidina tritiada deixa dúvidas quanto a ocorrência de amplificação em todos esses segmentos cromossômicos de S2 (Alves, 1975; Rizzo, 1980). É contudo muito claro que S2 forma pufes de tamanho considerável em pelo menos três dos segmentos cromossômicos que, em S1 e S3, formam pufes de DNA do segundo grupo; e que, durante o tempo de expansão dos pufes do primeiro grupo em S1 e S3, os segmentos correspondentes em S2 não formam pufes na mesma idade ou os formam muito pequenos.

## 2.2. Material Químico

O IMPY (2-3 dihidro-1-H-imidazo (1,2-b) pirazol ) foi utilizado em solução aquosa 0,3 M (Ribéiro, 1975). A solução era preparada em volumes pequenos no mesmo dia de sua utilização. As amostras do composto (Ciba 21,381-Ba) foram gentilmente cedidas pela Ciba-Geigy de Basiléia, Suíça.

A mistura de aminoácidos (14 aminoácidos marcados  $^{14}\text{C}$ ), adquirida da Amersham-Searle (CFB-104), apresentava uma atividade específica de 54 mCi/mÁtomo e concentração de 50  $\mu\text{Ci/ml}$ .

As demais substâncias utilizadas eram para análise ou melhores.

## 2.3. Injeção nas larvas

Foi utilizado o seguinte equipamento: em um suporte apropriado, são montados coaxialmente microsseringa de 100  $\mu\text{l}$  e micrômetro de precisão, de tal maneira que o êmbolo da seringa é empurrado pelo micrômetro. A seringa é conectada a um tubo de polietileno (PE-60 Clay-Adans) através de uma agulha hipodérmica. Na outra extremidade do polietileno é colocado um capilar de vidro; todo o sistema é carregado com óleo mineral (Sauaia & Almeida, não publicado). Usando-se uma seringa de tuberculina, carrega-se um pedaço do mesmo tubo de polietileno com a solução a ser injetada. A extremidade livre deste tubo é ligada ao capilar de vidro sem que se formem bolhas de ar. Retira-se então, com cuidado, a seringa de tuberculina e termina-se o sistema com uma agulha de vidro cujo diâmetro na ponta é de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ .

A larva é colocada ao estereomicroscópio sobre papel de filtro úmido. Introduzida a ponta da agulha entre dois segmentos medianos, gira-se o tambor do micrômetro (cada volta dispensa 1  $\mu$ l) e aguarda-se 30 segundos, antes de retirar a agulha, para permitir que todo o volume seja injetado. A larva é depositada em recipiente de plástico (formas para gelo) contendo terra umedecida e comida (rama de batata). Em todos os experimentos, foi injetado 1  $\mu$ l de água ou de solução 0,3 M de IMPY; da mistura de aminoácidos marcados foram injetados 2  $\mu$ l. O tempo de incorporação foi sempre de uma hora. Com uma hora de incorporação, o perfil de síntese de proteínas obtido é virtualmente idêntido ao que se obtém com glândulas incubadas "*in vitro*" (Laicine, comunicação pessoal).

#### 2.4. Remoção das glândulas e preparo das amostras

As glândulas salivares foram obtidas dissecando-se a larva sobre lâmina de vidro com auxílio de duas pinças de relojoeiro, uma aplicada logo atrás da cabeça e a outra na extremidade posterior do animal. Ligeira tração rompe o corpo ao nível da primeira pinça e juntos saem o par de glândulas salivares, tecido gorduroso e parte do trato digestivo. O conjunto era imediatamente transferido para vidro de relógio embriológico contendo TCA a 10% e agitado durante algum tempo, operação necessária para distender o par de glândulas e facilitar a retirada do corpo gorduroso. Nesse recipiente, as glândulas eram limpas e transferidas para outro vidro de relógio embriológico, também com TCA a 10%. Os vidros de relógio eram mantidos em banho de gelo. Em seguida, eram separadas com estilete as três regiões glandulares, S1, S2, S3, e

transferidas para tubos de ensaio com capacidade para 1 ml (mantidos em gelo moido) contendo TCA a 10%. Colhidas todas as regiões glandulares, substitui-se o TCA por um tampão (gelado) Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 contendo azul de bromofenol a 0,01% para neutralizar o resíduo de TCA (Laicine, comunicação pessoal). Os tubos eram agitados por rotação até que as regiões glandulares adquirissem cor ligeiramente azulada. Vertia-se o tampão e acrescentava-se 60 µl da solução de amostra (Apêndice A). Os tubos, fechados com plástico fino de PVC (Zapp) e fita adesiva, permaneciam assim até o dia seguinte. As amostras eram então utilizadas, ou armazenadas num congelador a - 12°C. Pouco antes da eletroforese, as amostras, equilibradas à temperatura ambiente, são aquecidas, todas ao mesmo tempo, em água fervente durante 90 segundos.

## 2.5. Eletroforese

Foi empregada célula vertical, construída em Plexiglass ou moldada em resina poliéster (Polylite), semelhante à descrita por Sauaia e Laicine (1977). O espaço livre contido na célula é 169 mm de largura, 162 mm de altura e 1,5 ou 2,0 mm de espessura. A composição das soluções utilizadas é dada no apêndice A.

A solução para gel de separação é colocada na célula até a altura de 126 mm com a ajuda de uma seringa prolongada por um tubo de polietileno. Uma peça de Plexiglass (Studier, 1973), um pouco mais estreita que o leito da célula, serve para que se obtenha plana a superfície do gel. Os pequenos espaços laterais são capeados com água. A polimerização ocorre entre 20 a 25 minutos. A peça sólida é então retirada e a

superfície do gel é lavada com água várias vezes. Os géis foram utilizados entre 4 e 16 horas após a polimerização.

Para a moldagem dos poços de amostras, empregamos um pente de Plexiglass, cujos dentes medem 18 mm de altura, 4 mm de largura e 2 mm de espessura. Sua largura é pouco menor que a da célula, o que permite a introdução ou remoção de líquido com uma pipeta de Pasteur. A solução para gel de empilhamento é introduzida até uma altura de 26 mm e capeada com água, de modo que a distância entre as extremidades dos dentes e o gel de separação seja de 14 mm. Vinte minutos depois, verte-se a água de capeamento e coloca-se tampão de eletrodo superior. Retirado o pente, os poços são lavados, por duas vezes, e cheios com o mesmo tampão.

## **2.6. Aplicação das amostras e eletroforese**

Os 60  $\mu$ l da cada amostra eram recolhidos em micropipetas (Micropet, Clay Adams) com auxílio de um dispositivo que permite controle preciso do volume e da velocidade de aplicação. Desses 60  $\mu$ l, 10 eram aplicados em frascos de cintilação (ver radiometria) e 50 em cada poço do gel.

As eletroforeses foram feitas com corrente constante de 35 mA. A tensão inicial era de 60 V, atingindo 180 - 190V ao término da corrida, que se considerava terminada quando a faixa azul (devida ao bromofenol) chegava a 1 cm da extremidade inferior da célula. As soluções utilizadas nos reservatórios superior e inferior são dadas no Apêndice A. O tempo de migração da eletroforese variou de 5 a 5,5 horas.

## 2.7. Fixação, coloração e remoção do excesso de corante

Retirado da placa, o gel era imerso em TCA a 50% (Laemmli, 1970), onde permanecia, em agitação suave, até o dia seguinte. Era tingido a 37°C durante duas horas com agitação esporádica, com solução corante recém-preparada. Seguiam-se banhos repetidos em ácido acético a 7%, até que se obtivesse contraste satisfatório entre as frações e o fundo. O gel era então fotografado.

## 2.8. Fluorografia

Empregou-se a técnica de Bonner e Laskey (1974) e Laskey e Mills (1975) com modificações.

Removido o excesso de corante, o gel é tratado em uma bateria de DMSO nas seguintes concentrações: 50, 75, 95 e 100%. Nos três primeiros banhos o tratamento é de 40 minutos, já o de 100% (são dois banhos) o tempo, em cada um, é de 80 minutos. Os volumes são cerca de 20 vezes o volume inicial do gel. Após esse tratamento o gel é imerso em uma solução de PPO a 22,2% em DMSO; nessa etapa o volume é de aproximadamente 4 vezes o volume do gel. Durante todo o processamento o gel é agitado continuamente. Decorridas 3 horas, verte-se a solução de PPO e o gel é imerso em água (20 vezes o volume inicial do gel). A água é renovada duas vezes, de 30 em 30 minutos, e o gel permanece no terceiro banho até o dia seguinte, quando se troca a água por mais duas vezes, com intervalos de aproximadamente 1 hora.

O PPO foi rotineiramente recuperado das soluções em que se impregnavam os géis. Adiciona-se 1 grama de carvão ati

vado muito fino para cada 100 ml de solução, a fim de remover o azul de Coomassie. O carvão é removido por filtração e o PPO recristalizado por adição muito lenta de três volumes de água. Filtra-se novamente e lava-se o PPO com aproximadamente 10 litros de água destilada. Seca-se a 37°C. O PPO recuperado tem o mesmo desempenho que o original em ensaios de radiometria por cintilação em líquido.

## 2.9. Secagem do gel

A técnica utilizada é semelhante à de Maizel (1969). O gel é posto sobre um retângulo de papel Whatmamm 3 MM. Este é colocado sobre uma pilha de 10 retângulos de papel de filtro de uso corrente e postos sobre uma placa porosa de esmeril (Carborundum) de 15 x 20 cm. Sobre o gel, é assentado um retângulo de borracha de silicone (Dow Chemical), ligeiramente maior que a placa, evitando-se a formação de bolsas de ar. O conjunto é emborcado (de modo que a borracha de silicone fique por baixo) e colocado sobre um tapete de borracha de 33 x 29 cm. Do teto de uma estufa (desligada), pende um tubo de alumínio que termina num disco do mesmo material. Por sobre o disco, um tapete de borracha com as mesmas dimensões do anterior e atravessado pelo tubo, assenta-se sobre a placa porosa. Conecta-se o tubo de alumínio através do teto da estufa a uma bomba de vácuo e em seguida liga-se a estufa para funcionar a 90°C aproximadamente. Os géis secos são armazenados entre lâminas de vidro presas uma à outra com fita adesiva.

## 2.10. Exposição

A pré-exposição, recomendada por Laskey e Mills (1975) para a película de raios-X foi realizada, mas, somente com a finalidade de aumentar a 0,15 a densidade de fundo. Em câmara escura a chapa Kodak XS-5, presa a um anteparo, foi pré-exposta a uma lanterna de segurança, situada a 130 cm, equipada com uma lâmpada de ampliador de 100 W e filtro constituído de duas chapas de raios-X, desprovidas de halogeneto de prata e tingidas em solução de ácido pícrico. A intensidade luminosa foi regulada com um auto-transformador (Keldian modelo 4422) ligado a um estabilizador de voltagem (Eletromar tipo EVT-D16E). O tempo de exposição (5 segundos) foi controlado com um relógio temporizador (Isgus).

Imediatamente após a pré-exposição, a chapa de raios X era aposta ao gel seco pela face mais pré-exposta. O par era colocado entre lâminas de vidro, depois seguras com "clips" duplos para papel. Selava-se o conjunto em um saco de plástico preto em presença de um saquinho de sílica higroscópica. Uma caixa de papel fotográfico servia como proteção adicional. A exposição era feita em gelo seco ou num congelador a - 80°C. Decorridas 120 horas, transferia-se a caixa para um recipiente de isopor, que duas horas depois era aberto em câmara escura a 20°C. Revelava-se a película por 5 minutos com agitação contínua em revelador recomendado pelo fabricante. Ácido acético a 2% servia como interruptor antes do tratamento por 5 minutos com o fixador para película de raios-X, da Kodak. Lavada em água corrente e em água destilada, a película era posta a secar.

## 2.11. Densitometria

As medidas densitométricas foram feitas num citofotômetro Zeiss (modelo 05) dotado de platina de varredura de 10  $\mu$ m de passo, comandada por uma calculadora programável Wang 720 C. Como os fluorogramas medem 150 x 200 mm, não seria prático fazer a varredura diretamente sobre as partes desses objetos. A solução para essa dificuldade foi produzir dos fluorogramas negativos fotogrâficos de tamanho reduzido, em condições tais que a película fotogrâfica tivesse resposta linear à variação de brilho do fluorograma. Na ausência de um densitômetro de curso mais amplo, esse expediente, frequentemente empregado em outros estudos, permite utilizar um equipamento de alta qualidade disponível no laboratório.

A densidade de um objeto no fluorograma é inferida da diferença entre duas leituras no negativo: a densidade correspondente ao fundo do fluorograma e a densidade da imagem do objeto. Essas duas leituras no negativo são feitas contra a densidade no mesmo negativo na área que não recebeu luz provinda do fluorograma.

Os gráficos que a calculadora pode imprimir do perfil de absorbância ao longo das raias concordaram com o esperado da simples observação visual dos fluorogramas. É digna de nota uma limitação referente as leituras densitométricas: algumas faixas fluorográficas tinham densidade superior a 1,5 quando comparadas com a densidade de fundo. Essa limitação, todavia somente tenderia a diminuir as claras diferenças encontradas nesse trabalho entre material controle e experimental.

## 2.12. Negativo fotográfico

### a - Obtenção

Para iluminar o fluorograma foi contruída uma caixa de madeira dotada de uma série de lâmpadas fluorescentes. A caixa é fechada em cima por uma placa de acrílico fosco branco coberta com uma lâmina de vidro. Nessas condições, a iluminação era satisfatoriamente uniforme. Sobre o vidro foi colocado um tapete de borracha preta, de cujo centro fora re cortado um retângulo com as dimensões do fluorograma. Os negativos foram obtidos com uma câmara fotográfica de 35 mm (Olympus OM-1 com objetiva de 50 mm 1.8), montada em uma coluna vertical para uma redução de 1:10. Dessa maneira somente uma área central do negativo era atingida pela luz filtra da pelo fluorograma. Para padronizar a exposição e a revelação do negativo, foram feitas diversas séries de exposições de um fluorograma em cuja margem foram colocados filtros neu tros Inconel (Zeiss) de densidade 0,28, 0,85, 1,46. As medidas de densidades dos negativos nas áreas correspondentes aos filtros mostraram que resultados satisfatórios, quanto à li nearidade e ao contraste, eram obtidos com o filme Panatomic (Kodak) revelado com Microdol diluído (1+3) durante 15 minutos a 20°C após exposição com abertura 8 e velocidade 1/8. A linearidade dos resultados foi avaliada por análise de regres são dos valores obtidos da densitometria nos negativos sobre os valores de densidade dos filtros usados como padrões: o coeficiente de regressão foi mais que 121 vezes o seu desvio padrão de amostra.

## **b - Leitura**

Os negativos fotográficos foram montados em óleo de imersão entre lâminas de microscopia. Esse conjunto foi instalado na platina de varredura (10  $\mu\text{m}$  de passo) por meio de um dispositivo capaz de girar 360°, que permite orientar a direção da raia com o do movimento da platina. A horizontalidade do negativo era conferida verificando-se o foco em vários lugares ao longo da raia, inclusive nos extremos.

A densitometria foi feita nas seguintes condições: luz de 540 nm (régua monocromadora Zeiss), condensador de abertura 0,2, objetiva 2,5 X, optovar de 1,6, ocular de projeção de 10 X, aumento final de 25,6 X, fenda retangular ajustada para equivaler a uma fenda de 20  $\mu\text{m}$  X 400  $\mu\text{m}$  no plano do objeto.

## **c - Varredura**

A varredura foi feita automaticamente sob o comando da calculadora (Wang 720 C). O programa utilizado parte do princípio de que a raia fluorográfica pode ser subdividida em "fatias", à semelhança do que ocorre quando a distribuição da radioatividade é avaliada radiometricamente. Neste trabalho, cada "fatia" corresponde a 2 passos de 20  $\mu\text{m}$  da platina ou seja, a 0,4 mm no fluorograma original. A medida de densidade em cada passo foi a média de 2 leituras. Esse valor era subtraído do valor correspondente ao branco tomado logo acima da origem da raia. A soma das absorbâncias em cada "fatia" era arquivada na memória da calculadora. A extensão dessa memória foi o principal limite ao número de fatias utilizadas.

Todos os valores resultantes da densitometria de uma raia foram gravados em fita magnética para posterior processamento.

Dos dados assim obtidos, um segundo programa delimitava frações ou "picos", fornecendo a posição da primeira e última fatias de cada fração, assim como a absorbância média da fração e o número de suas fatias. Essa listagem de frações era comparada com o fluorograma original, de modo que o operador pudesse escolher as frações que desejasse levar em conta. Feita essa escolha, um terceiro programa permitia que o operador obtivesse para qualquer seqüência de fatias à sua escolha os seguintes parâmetros: número de ordem da primeira e última fatias da série; número de fatias incluídas; densidade média da fração delimitada; distância da fração à origem; produto da densidade média pelo número de fatias (Q).

Para determinar a correspondência entre valores densitométricos e quantidade de radioatividade em cpm, uma alíquota das amostras de eletroforese era separada para radiometria. Além disso, quatro raias foram ocupadas com amostras cujas radioatividades guardavam entre si proporção pré-determinada (1: 0,8: 0,5: 0,4). Essas amostras de referência foram obtidas por diluição de uma amostra inicial resultante de glândulas salivares que também tinham incorporado aminoácidos-<sup>14</sup>C. Desse modo, eram obtidos dois conjuntos de valores, um de natureza radiométrica e outro de natureza densitométrica. Uma análise de regressão linear fornecia os parâmetros da relação existente entre esses conjuntos de valores para cada fluorograma. Como não se dispunha de proteínas marcadas purificadas que servissem de padrões, era necessário inferir a quantidade de radioatividade numa certa secção do fluorograma a partir da reta de regressão assim estabelecida, o que supõe

linearidade de resposta da película de raios-X à quantidade de radioatividade ao longo da raia, assim como uniformidade da distribuição do "background". Essa linearidade de resposta foi objeto de atenção no trabalho de Laskey e Mills (1975). De acordo com esse estudo, importa que a densidade (local ao nível das faixas) não ultrapasse 1,5. Quanto ao "background", pareceu sempre de uniformidade satisfatória.

### **2.13. Radiometria**

Dez (10)  $\mu$ l de cada amostra foram usados para a radiometria. Eram colocados, com auxílio de micropipetas, no fundo de frascos de cintilação inclinados de aproximadamente 45°; em seguida eram adicionados a cada frasco 100  $\mu$ l de NCS (Nuclear Chicago Solubilizer) e fechavam-se os frascos que permaneciam assim até o dia seguinte. Adicionavam-se, então, 10 ml de solução cintiladora, 0,6% de PPO em tolueno (número de catálogo 8325 da Merck). Os frascos eram agitados por rotação e deixados no escuro durante 1 hora aproximadamente. As medidas radiométricas foram feitas num espectrômetro de cintilação em líquido modelo LS-150 da Beckman, gentilmente cedido pelo Prof. R.H. Migliorini, desta Faculdade. Para a contagem, foi usada a janela do carbono dentro de um erro 2 sigma de 5%. O método de radiometria aqui referido foi objeto de cuidadosa padronização na tese de mestrado de Almeida (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1973).

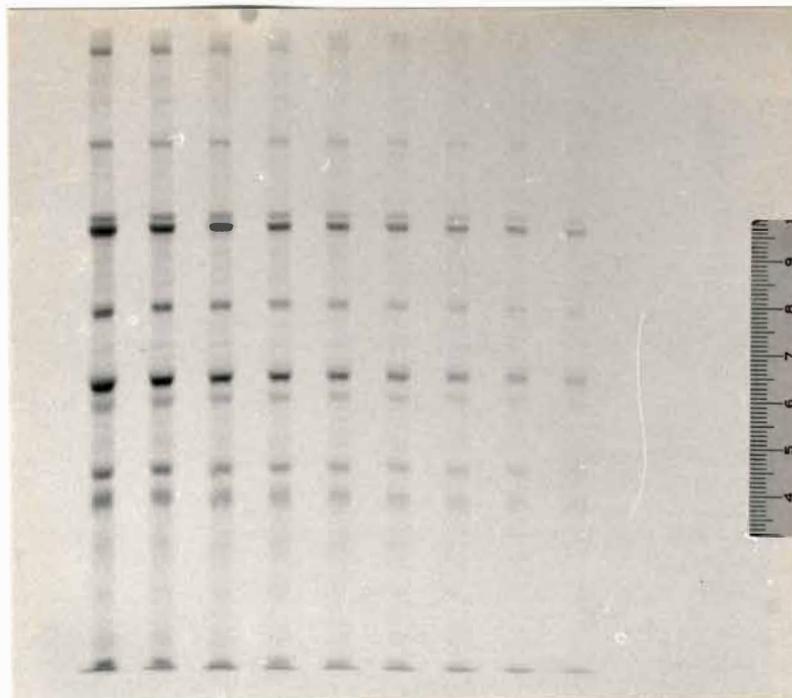


Figura 2 A - Fluorograma preparado segundo as indicações dadas no início da página 23 (ao lado), em "Resultados 1. Densitometria".

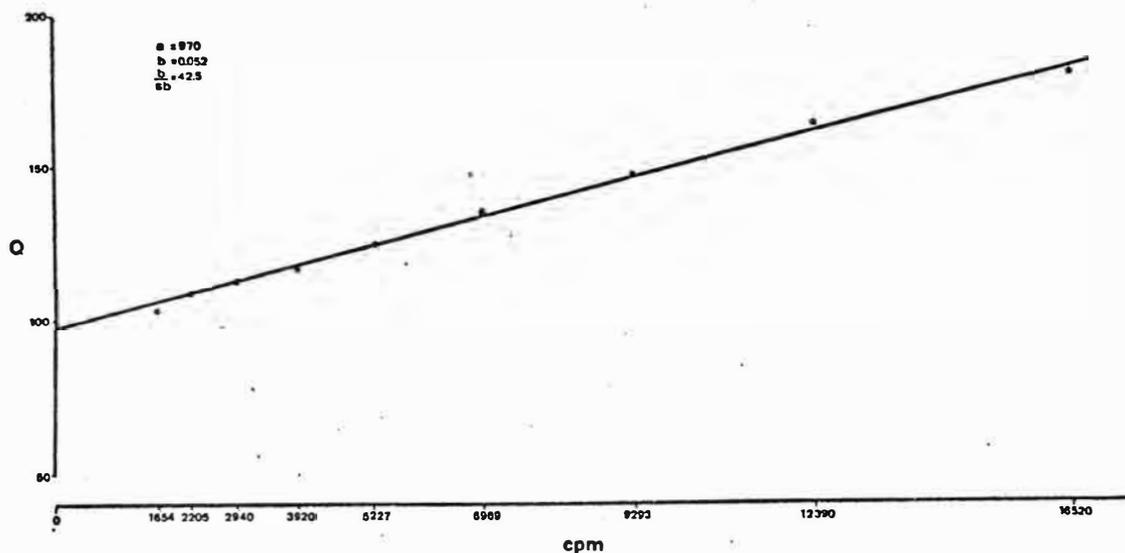


Figura 2 B - Regressão linear dos valores de densidade total (Q) sobre os valores de radiometria por cintilação em líquido (cpm), referentes às nove raias do fluorograma da figura 2 A.

### III. RESULTADOS

#### 1. Densitometria

Para uma avaliação inicial do desempenho do procedimento densitométrico empregado, foi feito o seguinte experimento: 30 larvas em idade m7 receberam injeção de aminoácidos-<sup>14</sup>C e suas 60 regiões S3 foram separadas e preparadas para eletroforese em 300  $\mu$ l de solução de amostra. De 200  $\mu$ l dessa solução, foram produzidas 9 amostras de concentração de crescente, à razão de 0,75, as quais foram submetidas a eletroforese nas condições já descritas. O fluorograma se apresenta na Figura 2 A.

Dos 100  $\mu$ l restantes, 6 amostras de 10  $\mu$ l foram submetidas a radiometria e foi calculada a quantidade da radioatividade de cada uma das amostras aplicadas no gel. Um sétimo frasco, sem amostras de proteínas radioativas, serviu para aferir o "background". A análise de regressão dos valores das densidades totais das raias sobre os valores radiométricos é apresentada na Figura 2 B. Em outros experimentos, o ajuste dos pontos nem sempre foi tão bom quanto o deste experimento.

#### 2. Efeito do IMPY quando injetado na idade m3

Como foi descrito em material e métodos, o primei-

ro grupo de pufes de DNA atinge máxima expansão no intervalo que vai de m6 a m7 + 6 horas e o segundo grupo de pufes de DNA atinge máxima expansão entre 12 e 18 horas depois de m7. O IMPY exerce máximo efeito inibidor sobre o desenvolvimento de todos os pufes de DNA quando injetado 16 a 26 horas antes da idade m7 (Ribeiro, 1975).

No primeiro experimento, 18 larvas foram injetadas com 1  $\mu$ l de solução 0,3 M de IMPY na idade m3 e igual número de larvas da mesma idade recebeu injeção de 1  $\mu$ l de água bi-distilada. As larvas que chegaram à idade m7 entre 16-26 horas após a injeção foram utilizadas no experimento. Em m7+6 horas, 6 larvas controles e 6 tratadas receberam injeção de aminoácidos- $^{14}$ C, foram dissecadas uma hora depois e suas glândulas salivares, separadas nas três regiões, foram processadas para serem submetidas a eletroforese em raias diferentes. Das larvas restantes, 6 controles e 6 tratadas receberam a injeção de aminoácidos- $^{14}$ C 20 horas depois de m7 e suas glândulas salivares foram preparadas da mesma maneira. Todas as amostras do experimento foram submetidas a eletroforese num mesmo gel. O número de regiões glandulares, empregado em cada raia é dado na legenda da Figura 3, que apresenta perfis das três regiões glandulares, de material controle e tratado com IMPY, nas idades m7 + 6 horas e m7 + 20 horas. Essas idades pertencem respectivamente ao segundo e terceiros períodos de síntese de proteínas na glândula salivar ao longo do quarto estágio.

Nas duas primeiras raias comparam-se os perfis fluorográficos da região S1 em m7 + 6 horas de material controle e tratado. Neste, é patentemente inibida a marcação das frações A5, B1, B3, B4 e C3. A fração A2, que neste experi-

FIG. 3

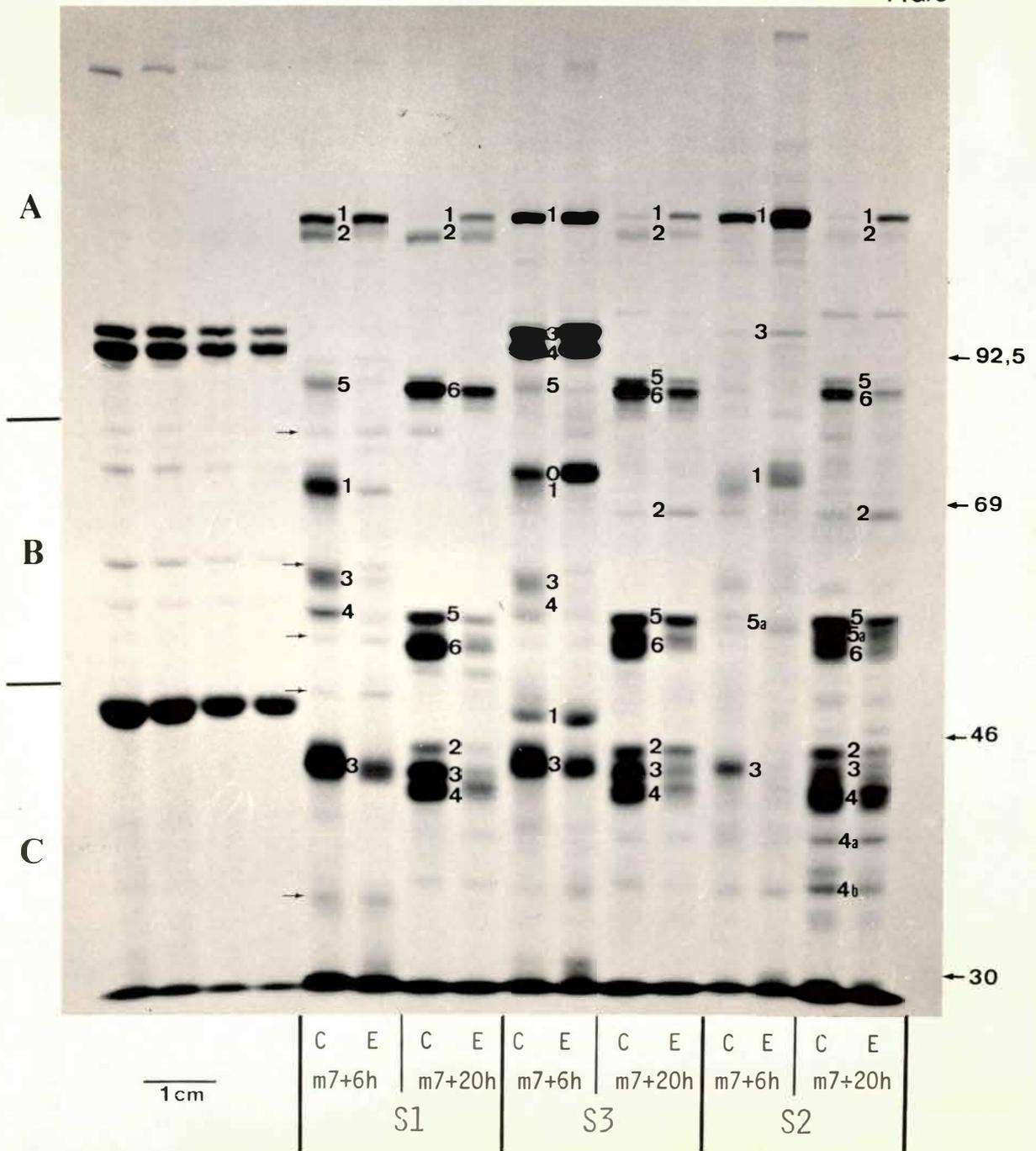


Figura 3 - Perfis fluorográficos das três regiões glandulares de larvas controladas (C) e tratadas com IMPY (E) em condições que exercem máxima inibição do desenvolvimento dos pufes de DNA. As regiões glandulares e as idades indicam-se ao pé do fluorograma. Número de regiões glandulares empregado nas amostras: 12 de S1, 6 de S3, 12 de S2. A quantidade de radioatividade em cada amostra é dada nos gráficos correspondentes do Apêndice B. O fluorograma foi arbitrariamente dividido em três secções, A, B e C; as frações contidas em cada secção foram numeradas em ordem crescente segundo sua migração a partir da origem. Essa numeração nem sempre é a mesma para regiões glandulares diferentes ou para idades diferentes. As quatro raias à esquerda são de amostras cujas quantidades de radioatividade guardam entre si a proporção 1 : 0,8 : 0,5 : 0,4. A primeira das quatro raias é de uma amostra cujo total de radioatividade foi de 5700 cpm. À direita, são dados os pesos moleculares em Kdaltons das seguintes proteínas de referência: fosforilase B, albumina de soro bovina, ovalbumina e anidrase carbônica. Exposição de 120 horas.

mento, aparece inibida no material tratado, não apareceu assim em outros experimentos independentes do mesmo tipo; ela tem comportamento variável com relação ao IMPY. É também perceptível clara inibição de marcação na área imediatamente seguinte à fração C3. Nessa mesma idade, notam-se uma fração proeminente (A1), cuja marcação é mais intensa no material tratado que no controle, e pelo menos cinco frações fracamente marcadas, não nomeadas no fluorograma, cuja densidade foi aumentada ou inafetada pelo tratamento: três na região B e duas na região C (setas). Em m7 + 20 horas (terceira e quarta raias), verifica-se que o IMPY exerce patente efeito inibidor sobre a intensidade de marcação de todas as frações proeminentes (A6, B5, B6, C2, C3 e C4), exceto a fração A1. Parecem pouco afetadas duas frações não nomeadas da região C do fluorograma, abaixo de C4.

Na região glandular S3, a 6 horas depois de m7 (quinta e sexta raias), o efeito inibidor do IMPY é claro para as frações A5, B1, B3, B4 e C3, à semelhança do que se vê para a região glandular S1. Note-se que as frações cuja marcação é deprimida em S3 nessa idade têm a mesma mobilidade que as frações cuja marcação foi deprimida em S1. Ao contrário, as frações, muito proeminentes, A1, A3, A4, B0 e C1 apresentam-se no material tratado com IMPY pouco afetadas ou com intensidades de marcação mais elevadas que no controle. Na idade m7 + 20 horas, o perfil de S3, agora ainda mais semelhante ao de S1, apresenta de novo drástico efeito inibidor do IMPY sobre quase todas as frações proeminentes, exceto A1 e B2, e sobre duas bem pouco proeminentes na região C do fluorograma.

Para S2, a intensidade de marcação do perfil fluorográfico é, em m7 + 6h, bem menos intensa do que para

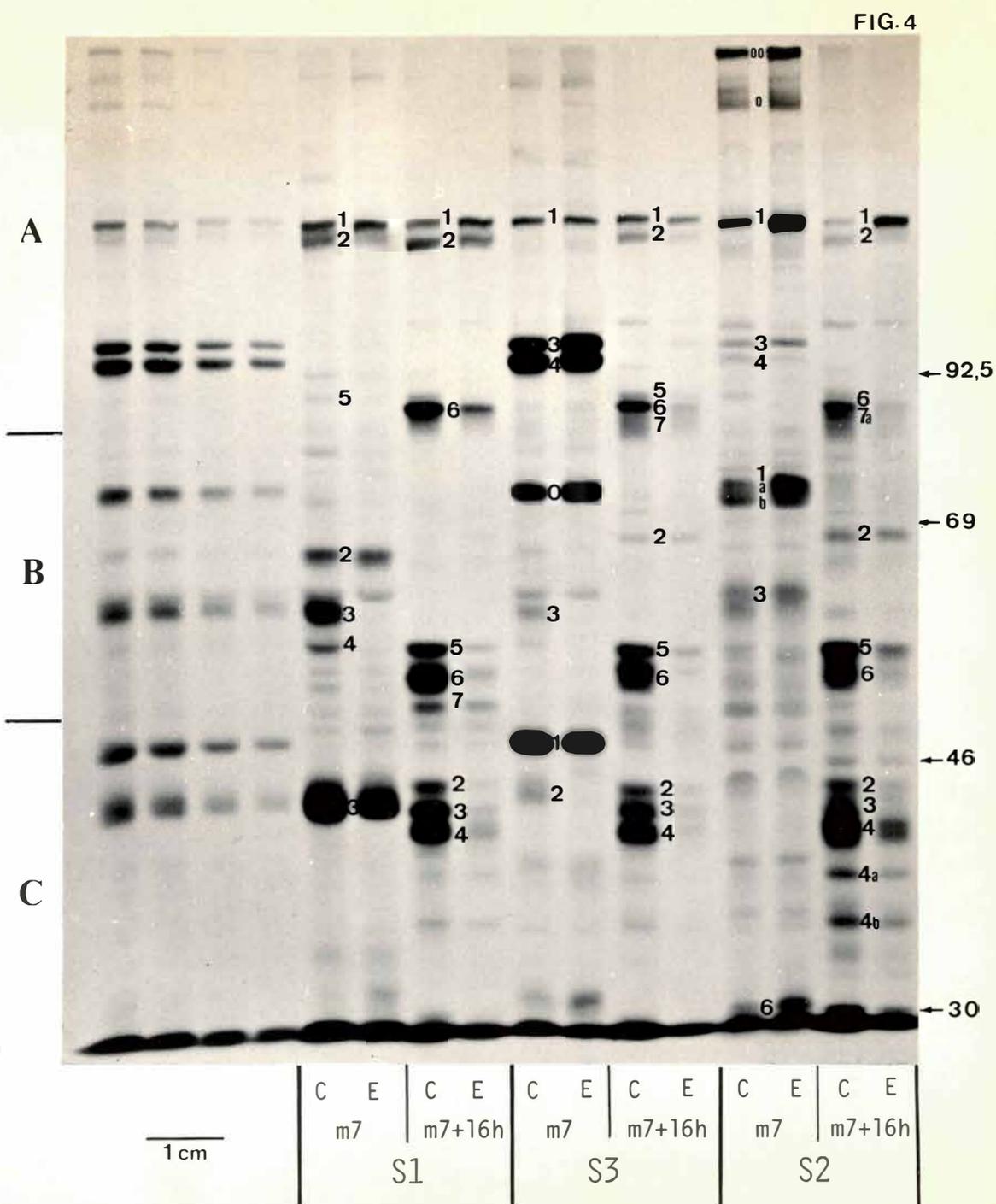


Figura 4 - Perfis fluorográficos das três regiões glandulares de larvas controles (C) e tratadas com IMPY (E) em condições que exercem máxima inibição do desenvolvimento dos pufes de DNA. Número de regiões glandulares empregado nas amostras: 10 de S1, 5 de S3, 10 de S2. A quantidade de radioatividade é dada nos gráficos correspondentes do Apêndice B. O fluorograma foi arbitrariamente dividido em três secções, como se explica na figura 3. As quatro primeiras raias à esquerda são de amostras cujas quantidades de radioatividade guardam entre si a proporção 1:0,8:0,5:0,4. A primeira das quatro raias corresponde a uma amostra cujo total de radioatividade foi de 6055 cpm. Exposição de 120 horas.

as outras regiões glandulares. Na eletroforese que produziu o fluorograma da Figura 3, foi empregado igual número de regiões glandulares S2 e S1; vale dizer que o número de células S2 foi cerca de 20% maior que os de S1 e S3. Na idade m7+6 horas, o IMPY inibe em S2 a intensidade de marcação de poucas frações, a mais evidente das quais é C3. Em 20 horas depois de m7, o perfil de S2 passa a assemelhar-se aos das outras duas regiões glandulares e é claramente afetado pelo tratamento com IMPY.

Resultados muito semelhantes a estes são obtidos quando se realiza o mesmo experimento para as idades m7 e m7 + 16 horas (Figura 4). Algumas frações, proeminentes em m7 nas larvas controles, não são tão proeminentes em m7 + 6 horas (experimento anterior), fato que reflete o caráter cambiante do perfil fluorográfico da glândula salivar da idade m5 à idade de m7 + 14 horas, isto é, durante o segundo período de síntese. Nas idades m7 + 16 horas e m7 + 20 horas, ao contrário, os perfis são muito semelhantes nos dois experimentos, fato que se deve à estabilidade dos perfis de síntese na glândula salivar de m7 + 16 horas até perto da muda pupal.

Esses experimentos, confirmados por outros independentes, mostram que, ao inibir seletivamente o desenvolvimento dos pufes de DNA, o IMPY provoca modificações seletivas no perfil de síntese de proteínas nas idades em que tais pufes se expandem. A marcação de um número considerável de frações é deprimida, a de outras frações é aumentada e a de algumas parece inalterada pelo tratamento.

Os resultados densitométricos referentes a esses experimentos estão nos gráficos do Apêndice B. As tabelas do mesmo Apêndice resumem as principais alterações provocadas

FIG. 5

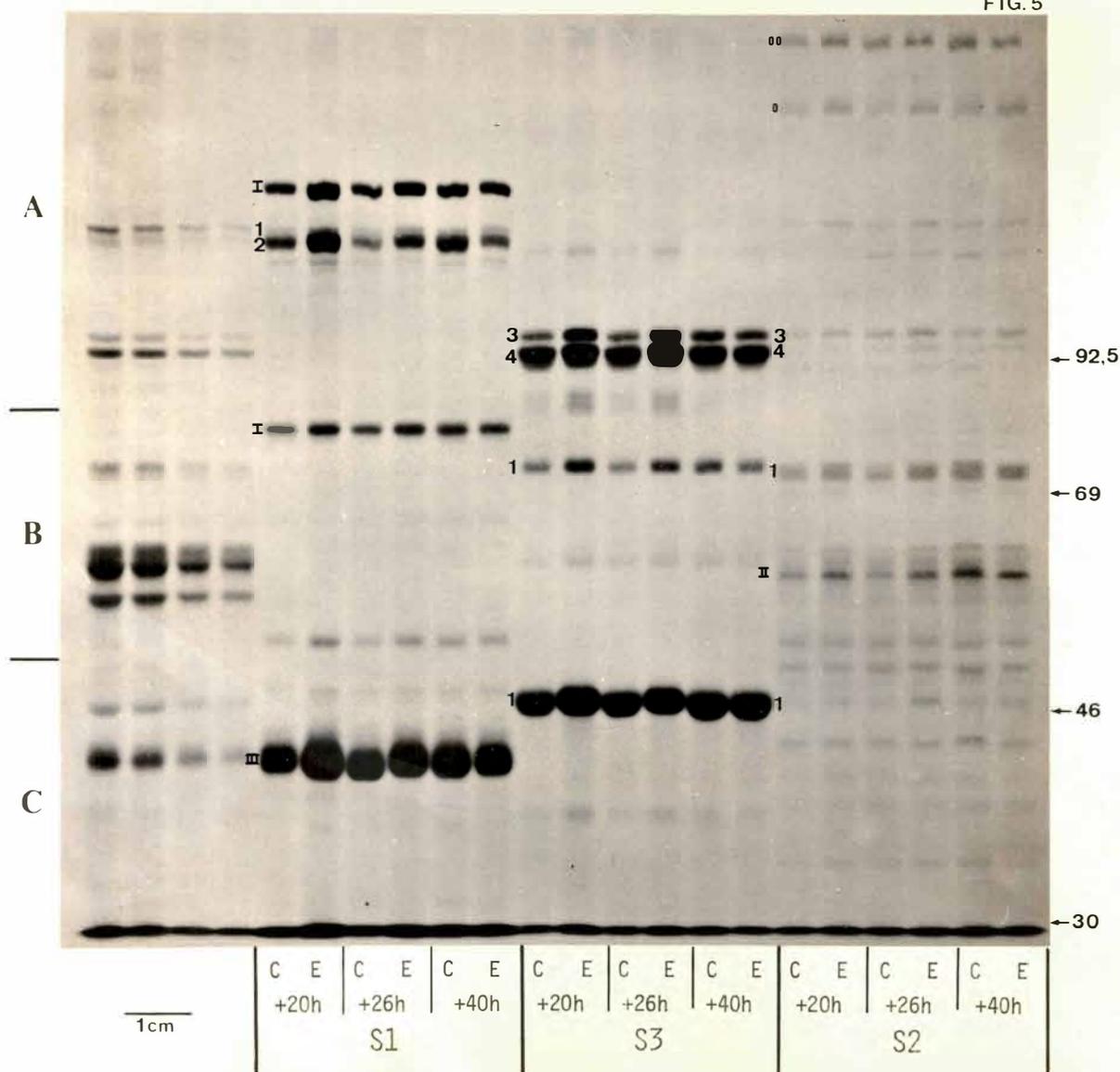


Figura 5 - Perfis fluorográficos das três regiões glandulares de larvas controles (C) e tratadas com IMPY (E) no quarto dia do quarto estágio e processadas 20, 26 e 40 horas depois do tratamento. Número de regiões glandulares empregado nas amostras: 12 de S1, 6 de S3, 6 de S2. O fluorograma foi arbitrariamente dividido em três secções, como se explica na legenda da figura 3. Nas raias de S3, a fração nomeada B1 corresponde à fração B0 nas figuras anteriores. As quatro primeiras raias à esquerda são de amostras cujas quantidades de radioatividade guardam entre si a proporção 1:0,8:0,5:0,4. A primeira das quatro raias corresponde a uma amostra cujo total de radioatividade foi de 7390 cpm. Exposição de 120 horas.

pelo tratamento com IMPY, avaliadas com base nos dados densitométricos normalizados para uma mesma quantidade de radioatividade no material controle e no experimental.

### 3. Efeito do IMPY em larva jovem

Ao fim das mudas, as larvas dos Sciarídeos passam por uma fase de curta duração, durante a qual, é branca a cápsula da cabeça. Isso permite selecionar lotes mais sincronizados de larvas. Sessenta larvas assim escolhidas ao fim da terceira muda foram colocadas num germinador preparado. Quatro dias depois, metade desse lote recebeu injeção de IMPY 0,3 M e a outra metade, injeção de água. Transcorridas 20, 26 e 40 horas, 10 larvas de cada lote foram injetadas com a mistura de amino-ácidos- $^{14}\text{C}$  e dissecadas uma hora depois. Essas são, portanto, larvas jovens, ainda sem manchas oculares. O fluorograma resultante está na Figura 5.

O efeito do IMPY sobre o perfil de síntese de proteínas em larvas jovens é manifestamente diferente do exercido na época em que se desenvolvem os pufes de DNA. Nos dois primeiros tempos de injeção do precursor (20 e 26 horas) as frações eletroforéticas quase sempre resultam mais intensamente marcadas do que no material controle e nenhuma das frações tem sua marcação deprimida. No tempo de 40 horas depois da injeção, o perfil fluorográfico do material tratado apresenta diminuição de densidade, relativamente muito discreta e menos seletiva.

A comparação dos perfis de síntese de S1 e S3 de larvas jovens (Figura 5) com os referentes às idades m7 e m7 + 6 horas e às idades m7 + 16 horas e m7 + 20 horas (Figuras 3 e 4) mostra que, ao inibir o desenvolvimento dos pufes de DNA, o IMPY exerce efeito inibidor seletivo sobre as prin-

principais frações próprias dos períodos de síntese que acompanham aqueles pufes. As frações proeminentes cuja marcação é estimulada pelo IMPY nos experimentos relativos às idades m7 e m7 + 6 horas (A1 de S1, A3, A4, B0 e C1 de S3) já são sintetizadas em larvas jovens. Ao contrário, as frações proeminentes, nomeadas em S1 como A5, B1, B3, B4 e C3, comuns a S1 e S3 e próprias dos perfis de síntese das idades m7 e m7+6hs, são inibidas pelo tratamento com IMPY. Nas idades m7+16 e m7 + 20 horas, são muito raras as frações comuns com os perfis de glândulas jovens e é nessas idades que se obtém efeito geral mais drástico do inibidor.

No tocante à região glandular S2, são discretas as modificações, em um perfil já discreto, do primeiro para o segundo períodos de síntese. No terceiro período, o perfil de S2 torna-se mais intenso, passa a assemelhar-se aos das outras regiões glandulares e a ser claramente sensível ao tratamento com IMPY.

Nas larvas jovens (Figura 5), os perfis fluorográficos de S1 e S3 diferem completamente quanto às frações proeminentes. Em m7 e m7+6hs, tendem a assemelhar-se principalmente por causa das frações A5, B3, B4 e C3; as principais diferenças nessas idades, entre S1 e S3, devem-se à ausência da fração A2 em S3 e à presença em S3 das frações A3, A4, B0 e C1, as quais já eram feitas em larvas jovens. Finalmente, em m7+16hs ou m7+20hs, isto é, durante o terceiro período de síntese, os perfis de S1 e S3 e também o de S2 assemelham-se muito mais entre si.

#### IV. DISCUSSÃO

A inibição do desenvolvimento dos pufes de DNA pelo IMPY é acompanhada da inibição da síntese de um certo número de frações proteicas na glândula salivar. Esses resultados são muito reprodutíveis. As variações de intensidade de marcação de uma ou outra fração segundo o experimento são principalmente devidas ao caráter gradual dos perfis fluorográficos ao longo do segundo período de síntese aqui estudado nas idades m7 e m7 + 6 horas. Por mostrarem que a inibição seletiva dos pufes de DNA corresponde a uma inibição seletiva no perfil de síntese de proteínas, esses resultados são perfeitamente consistentes com a hipótese de que os pufes de DNA estejam causalmente relacionados, a curto termo, com a síntese de frações proteicas definidas. Diversas observações apoiam a interpretação de que o efeito do IMPY sobre o perfil de síntese proteica se deve à ação da droga sobre os pufes de DNA e não a um eventual efeito colateral: 1º - resultados muito semelhantes são obtidos quando a inibição seletiva do desenvolvimento dos pufes de DNA é obtida pela hidroxiuréia e pela bromodesoxiuridina (Laicine et al., manuscrito em preparação; Sauaia et al., manuscrito em preparação). 2º - O estudo dos perfis fluorográficos da glândula salivar ao longo do desenvolvimento normal durante o quarto estágio define três períodos sucessivos bem distintos de síntese de proteínas. Quando se comparam o quadro citológico da descrição

dos pufes cromossômicos com o quadro fornecido pelos perfis fluorográficos verifica-se que há notável coincidência temporal entre a expansão do primeiro grupo de pufes de DNA (A4, B3c, C4, C5, C7) e o segundo perfil de síntese de proteínas assim como entre a expansão do segundo grupo de pufes de DNA (A1, A14, B3d, C6, C8a, X4) e o terceiro período de síntese de proteínas. 3º - Ao inibir-se o desenvolvimento dos pufes de DNA, é inibida a marcação de frações características do segundo e terceiro períodos de síntese, mas não é inibida a marcação de frações que já vinham sendo feitas anteriormente e que continuam a ser sintetizadas durante esses períodos. 4º - Em contraste com seu efeito sobre as frações próprias do segundo e terceiro períodos de síntese, o IMPY faz aumentar, até 26 horas depois de sua injeção em larvas jovens, a marcação das frações próprias deste período e deixa ligeiro efeito inibidor sobre as mesmas frações a 40 horas depois da injeção. 5º - Os perfis fluorográficos de S1 e S3 jovens são quase completamente diferentes, mas, durante o segundo período de síntese, tendem a assemelhar-se, mantendo diferenças evidentes, principalmente devidas a frações que já vinham sendo feitas anteriormente. Em ambas as regiões glandulares, ~~formam-se~~ pufes de DNA nos mesmos sítios cromossômicos durante o segundo período de síntese de proteínas, exceto o pufe C7, que não se forma em S3. A inibição do desenvolvimento desses pufes pelo IMPY inibe em ambas as regiões a síntese das frações que passaram a ser feitas no segundo período. No terceiro período de síntese, os perfis de S1 e S3 são muito semelhantes, assim como é semelhante o padrão de pufes de DNA e o efeito inibidor do IMPY. 6º - O perfil de síntese de proteínas em S2 parece alterar-se pouco do primei

ro para o segundo período de síntese e o efeito inibidor do IMPY sobre o perfil fluorográfico é aí muito discreto. Nessa região glandular, os sítios cromossômicos C4 e C5, que formam os maiores pufes de DNA do primeiro grupo em S1 e S3, apresentam pufes muito pouco conspícuos nas idades m7 ou m7 + 6 horas. Durante o terceiro período de síntese, aqui estudado nas idades m7 + 16 horas e m7 + 20 horas, o perfil fluorográfico de S2 passa a assemelhar-se com os de S1 e S3 e o IMPY nele exerce claro efeito inibidor. Coincidentemente, os segmentos cromossômicos A1, B3d, C6, C8a e X4, que em S1 e S3 formam pufes de DNA, em S2 também formam pufes, alguns dos quais de tamanho considerável (Rizzo, 1980).

É pouco plausível que sejam meramente colaterais e feitos tão seletivos obtidos com drogas diferentes e que afetam diferentemente o desenvolvimento dos pufes de DNA. O conjunto dessas observações demonstra que a modificação dos perfis fluorográficos da glândula salivar a partir de m5 depende de síntese de DNA a partir de m3. As modificações mais pronunciadas da cromatina nas células glandulares a partir de m3, modificações também dependentes de síntese de DNA, são representadas pelo desenvolvimento dos pufes de DNA.

A interpretação direta e simples desses resultados - assim como dos obtidos em *Rhynchociara americana* e *Trichosia pubescens* (Ver introdução) - é que os pufes de DNA comandem a síntese das principais frações protéicas elaboradas pela glândula salivar durante os períodos em que esses pufes se expandem. A noção de que o efeito dos pufes de DNA se faça a curto prazo ainda é corroborada pela observação de que diver

sos parâmetros morfológicos e bioquímicos, avaliáveis na glândula salivar durante a fase de pupa, não se modificam se o desenvolvimento dos pufes de DNA é seletivamente inibido pela hidrox*iu*rêia (Alves, 1981; Paço-Larson, comunicação pessoal, 1981).

Fica portanto fortemente apoiada a hipótese, proposta quando da descoberta dos pufes de DNA, de que esses pufes sejam manifestação morfológica de atividade gênica acompanhada de amplificação de significado regulador. A fim de atender a uma demanda de síntese em tempo curto demais para que sejam eficazes outros mecanismos de regulação, seriam amplificadas as matrizes gênicas implicadas nessa demanda. Tais eventos são de fato encontrados em outros programas de desenvolvimento que envolvem situações semelhantes. Em *Drosophila melanogaster*, uma região do cromossomo X e uma região de cromossomo III contêm genes que codificam para proteínas componentes do córion do ovo. Há pelo menos dois genes "coriônicos" em cada uma dessas regiões. Ambos os domínios cromossômicos são amplificados pouco antes de ser iniciada a síntese das proteínas coriônicas correspondentes. Em cada domínio, a amplificação é mais intensa para os genes coriônicos do que para as seqüências adjacentes. Os do cromossomo X são amplificados 14-16 vezes e os do III, cerca de 60 vezes (Spradling, 1981). Nos mutantes "ocelliless", uma pequena inversão cromossômica corta aproximadamente ao meio o domínio dos genes coriônicos do cromossomo X. Disso resulta que uma parte dessas seqüências de DNA deixa quase completamente de amplificar-se e a outra parte se amplifica menos que nas linhagens selvagens (Spradling & Mahowald, 1980, 1981). As fêmeas "ocelliless" são estéreis e as células foliculares

de seus ovários produzem menos proteínas coriônicas correspondentes ao domínio "coriônico" do cromossomo X (Spradling, 1979).

Programas de desenvolvimento como estes que implicam os pufes de DNA em sciarídeos ou a expressão dos genes para proteínas coriônicas em *Drosophila* diferem claramente de diversos outros em que a síntese prolongada de grande quantidade de uma proteína específica - tal como a ovalbumina (Sullivan et al., 1973), a fibroína (Susuki et al., 1972) e globina (Packman et al., 1972; Harrinson et al., 1974) - é sustentada por uma população de mensageiros estáveis para cuja elaboração o sistema dispõe de tempo também suficiente (Bonaldo et al., 1979; Spradling & Mahowald, 1980).

Ao contrário do que ocorre na linhagem "ocelliless" de *Drosophila*, o impedimento dos eventos de amplificação relacionada com os pufes de DNA não parece redundar por si só em resultado desastroso para o desenvolvimento. Isso não significa que os pufes de DNA e seus produtos careçam de importância. Embora não essenciais para a estrita sobrevivência individual, esses produtos devem conferir uma vantagem adaptativa definida. Assim, deve ter sido positivamente selecionada nos sciarídeos a propriedade de estar programado para amplificar em tempo oportuno na glândula salivar as matrizes gênicas correspondentes àqueles produtos.

Embora seja provável que tal interpretação alcance somente um dos aspectos do significado biológico da amplificação gênica e dos pufes de DNA, ela representa um claro progresso no entendimento desses processos e prevê sua possível ocorrência em situações semelhantes.

Apesar de não terem sido utilizados no presente es

tudo métodos analíticos de máxima resolução, os resultados são muito patentes e indicam seja promissora a utilização de eletroforese bidimensional, que muito provavelmente resolveria em diversos componentes frações que agora apresentam a mesma mobilidade e talvez permita relacionar pufes individuais com proteínas específicas. Com métodos de melhor resolução, os resultados deverão ser ainda mais nítidos, pois, além de outros efeitos, a superposição de frações distintas contribui para que a densidade local tenda a ultrapassar o âmbito de resposta linear da película detectora, fato que levaria a subestimar as diferenças entre material controle e experimental.

Permanecem por enquanto obscuros o destino e a função das frações proteicas cuja síntese é inibida quando se inibe o desenvolvimento dos pufes de DNA. Métodos de identificação diferentes dos que se baseiam somente em mobilidade eletroforética seriam úteis no trato de parte dessas questões e também importantes na confirmação de alguns dos resultados aqui expostos.

A interpretação dada aos resultados obtidos com IMPY, com hidroxiuréia e com bromodesoxiuridina em *Bradysia hygida* prevê que a inibição seletiva dos pufes de DNA deva acarretar modificações seletivas no perfil de RNAs mensageiros da glândula salivar. O estudo desses pufes, no desenvolvimento normal e em condições experimentais adequadas, poria novamente à prova a interpretação aqui discutida e abriria caminho para nova demonstração da relação entre pufes de DNA e síntese de proteínas específicas.

## V. SUMÁRIO

A inibição seletiva do desenvolvimento dos pufes de DNA, induzida em *Bradysia hygida* pela administração de IMPY em idade e dose adequadas, acompanha-se de modificações seletivas dos perfís de síntese de proteínas na glândula salivar, estudados por eletroforese e fluorografia.

Nas regiões glandulares em que são proeminentes os pufes de DNA, a síntese de frações protéicas características dos períodos em que esses pufes se expandem é inibida pelo tratamento, ao passo que a síntese de frações que já vinham sendo feitas anteriormente é estimulada ou inafetada. Na região glandular em que os pufes de DNA inexistem ou são relativamente pouco conspícuos, o tratamento provoca alterações pouco evidentes nos perfís de síntese, a não ser no período em que diversos segmentos cromossômicos, nessa região homólogos dos que formam grandes pufes de DNA nas outras duas, também apresentam pufes de tamanho considerável.

Os resultados apoiam fortemente a hipótese de que os pufes de DNA são manifestações morfológicas de expressão gênica, acompanhadas de amplificação de significado regulador. Indicam também que a função associada a pelo menos alguns pufes de DNA realiza-se durante a expansão desses pufes. Discutem-se esses e outros resultados afins, obtidos no mesmo material, em outros sciarídeos e em *Drosophila*.

## VI. SUMMARY

The selective inhibition of DNA puff development imposed in *Bradysia hygida* by an adequate dose of IMPY given to larvae at a proper age is paralleled by selective changes in the profiles of protein synthesis in the salivary gland, as shown by electrophoresis and fluorography.

In the gland regions where the DNA puffs are prominent the treatment inhibits the synthesis of protein fractions which are characteristic of the periods at which these puffs expand, whereas protein fractions which are also synthesized in younger larvae are unaffected or become more strongly labelled. With regard to the gland region where DNA puffs do not form or are comparatively un conspicuous the treatment induces less evident alterations in the fluorographic profiles, unless in the period when several chromosomal segments, homologous to those forming DNA puffs in the other two gland regions, also present puffs of considerable size.

The results strongly support the hypothesis that the DNA puffs are morphological manifestations of gene expression accompanied by amplification with a regulatory significance. They also indicate that the function associated with at least some DNA puffs is accomplished while they expand. The results are discussed in connection with other ones obtained in the same material, in other sciarids, and in Drosophila.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERNAZ, W.C. (1977). Estudo eletroforético dos polipeptídeos da glândula salivar de Bradysia hygida no desenvolvimento. Dissertação de Mestrado. F.M.R.P. - USP.
- ALMEIDA, J.C. de (1977). Efeito da 5-bromodesoxiuridina sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA dos cromossomos politênicos da região anterior da glândula salivar de Bradysia hygida (Diptera, Sciaridae). Tese de Doutorado F.M.R.P. - USP.
- ALVES, M.A.R. (1981). Pufes de DNA e histólise da glândula salivar em Bradysia hygida (Diptera, Sciaridae). Tese de Doutorado. F.M.R.P. - USP.
- AMABIS, J.M. (1980). Biologia dos cromossomos politênicos: seu papel na diferenciação celular. Res. IIº Congresso Brasileiro de Biologia Celular. pg. 28-29.
- ASHBURNER, M. and BONNER, J.J. (1979). The induction of gene activity in Drosophila by heat shock. *Cell*, **17**:241-254.
- BAUDISCH, W. und PANITZ, R. (1968). Kontrolle eines biochemischen Merkmals in den Speicheldrüsen von Acricotopus lucidus durch einen Balbiani-Ring. *Exp. Cell. Res.* **49**: 470-476.
- BEER, C.T.; KAJIWARA, K. and MUELLER, G. (1974). Synchronization of HeLa cells with 2,3-dihydro-1-H-imidazo[1,2-b]Pyrazole. *Bioch. Pharmacol.* **23**:1115-1122.
- BEERMANN, W. (1952). Chromomerenkonstans und Spezifische Modifikation der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans. *Chromosoma* **5**:139-198.
- BEERMANN, W. (1961). Ein Balbiani-Ring als locus einer Speicheldrüsen-mutation. *Chromosoma* **12**:1-25.

- BONALDO, M.F.; SANTELLI, R.V. and LARA, F.J.S. (1979). The transcript from a DNA puff of Rhynchosciara and its migration to the cytoplasm. *Cell*, 17:827-833.
- BONNER, W.M. and LASKEY, R.A. (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur.J.Biochem.* 46:83-88.
- BONNER, J.J. and PARDUE, M.L. (1976). The effect of heat shock on RNA synthesis in Drosophila tissues. *Cell*, 8:43-50.
- BREUER, M.E. and PAVAN, C. (1952). Gens na Diferenciação. *Ciência e Cultura*, 3(4): 115.
- BREUER, M.E. and PAVAN, C. (1955). Behaviour of polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae at different stages of development. *Chromosoma* 7: 371-386.
- CRAIG, E.A., MCCARTHY, B.J. and WADSWORTH, S.C. (1979). Sequence organization of two recombinant plasmids containing genes for the major heat shock-induced protein of Drosophila melanogaster. *Cell*, 16:575-588.
- CROUSE, H.V. and KEYL, H.G. (1968). Extra replications in the "DNA-puffs" of Sciara coprophila. *Chromosoma* 25:357-364
- DANEHOLT, B. (1974). Transfer of genetic information in polytene cells. *Int.Rev.Cytol.(suppl.)* 4:417-462.
- DANEHOLT, B. and HOSICK, H. (1973). The transcription unit in Balbiani Ring 2 of Chironomus tentans. *Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.* 38:629-635.
- EDSTRÖM, J.E. (1974). Polytene chromosomes in studies of gene expression. In: *The Cell Nucleus*. Ed. H.Busch, Acad. Press Inc., vol. II, pg.. 293-332.
- EDSTRÖM, J.E. and LAMBERT, B. (1975). Gene and information diversity in eukaryotes. *Prog.Biophys.Molec.Biol.* 30: 57-82.

- EDSTRÖM, J.E. and TANGUAY, R. (1973). Chromosome products in Chironomus tentans salivary gland cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **38**: 693-699.
- EDSTRÖM, J.E.; RYDLANDER, L. and FRANCKE, C. (1980). Concomitant induction of a Balbiani Ring and a giant secretory proteins in Chironomus salivary glands. Chromosoma **81**: 115-124.
- ENNIS, H.L.; MÖLLER, L.; WANG, J.J. and SELAWRY, O.S. (1971). 2,3 Dihydro-1H-imidazo[1,2-b]pirazole. A new inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. Bioch. Pharmacol. **20**: 2639-2646.
- FICQ, A. and PAVAN, C. (1957). Autoradiography of polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae at different stages of development. Nature **180**: 983-984.
- GABRUSEWYCZ-GARCIA, N. (1964). Cytological and autoradiographic studies in Sciara coprophila salivary chromosoma. Chromosomes, **15**: 312-344.
- GROSSBACH, U. (1969). Chromosomen-Aktivität und Biochemische Zelldifferenzierung in den Speicheldrüsen von Camptochironomus. Chromosoma **28**: 136-187.
- GROSSBACH, U. (1973). Chromosome puffs and gene expression in polytene cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **38**: 619-627.
- HARRINSON, P.R.; BIRNIE, G.D.; HELL, A.; HUMPHRIES, S.; YOUNG, B. D. and PAUL, J. (1974). Kinetic studies of gene frequency I. Use of a DNA copy of reticulocyte 9S RNA to estimate globin gene dosage in mouse tissues. J. Mol. Biol., **84**: 539-554.
- HOLMGREN, R.; LIVAR, K.; MORIMOTO, R.; FREUND, R. and MESELSON, M. (1979). Studies of cloned sequences from four Drosophila heat shock loci. Cell, **18**: 1359-1370.

- ISH-HOROWICZ, D.; PINCHIN, S.M.; GAUSZ, J.; GYURKOWICS, H.; BEN-CZE, G.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. and HOLDEN, J.J. (1979) Deletion mapping of two D.melanogaster loci that code for the 70,000 dalton heat-induced protein. *Cell*, **17**: 565-571.
- KORGE, G. (1975). Chromosome puff activity and protein synthesis in larvae salivary glands of Drosophila melanogaster *Proc.Natn.Acad.Sci. USA* **72**:4550-4554.
- KORGE, G. (1977). Direct correlation between a chromosome puff and the synthesis of a larval saliva protein in Drosophila melanogaster. *Chromosoma* **62**:155-174.
- LAEMMLI, V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, **227**: 680-685.
- LAEMMLI, V.K. and FAVRE, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *J.Mol.Biol.* **80**: 575-599.
- LAICINE, E.M.; SAUAIA, H.; de ALMEIDA, J.C.; ALVES, M.A.R. and ALBERNAZ, W.C. (1980). Expressão gênica na glândula salivar de Bradysia hygida no último estágio larval. Res. IIº Congresso Brasileiro de Biologia Celular. pg. 226-227.
- LAMBERT, B. (1973). Repeated nucleotide sequences in a single puff of Chironomus tentans polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.* **38**:637-644.
- LASKEY, R.A. and MILLS, A.D. (1975). Quantitative film detection of <sup>3</sup>H and <sup>14</sup>C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur.J.Biochem.* **56**: 335-341.
- LEWIS, M.; HELMSING, P.I. and ASHBURNER, M. (1975). Parallel changes in puffing activity and patterns of proteins synthesis in salivary glands of Drosophila. *Proc.Nat. Acad.Sci.USA.* **72**: 3604-3608.

- LIVAK, K.J.; FREUND, R.; SCHNWEBER, M.; WENSINK, P.C. and MESELSON, M. (1978). Sequence organization and transcription on at two heat shock loci in Drosophila. Proc.Nat.Acad.Sci.USA **75**: 5613-5617.
- MAIZEL, J.V. (1969). Fundamental Techniques of Virology. Ed. Habel, K. and Salzman, N.P. pag. 334 - Academic Press-N.Y.
- MAUER, H.R. (1971). Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis, pg. 1, W. de Gruyter, Berlin.
- MCCARTHY, B.J.; COMPTON, J.L.; CRAIG, E.A. and WADSWORTH, S.C. (1978). Transcription at the heat shock loci of Drosophila. Tenth Miami Winter Symposium (New York: Academic Press), pp. 317-333.
- MCKENZIE, S.L.; HENIKOFF, S. and MESELSON, M. (1975). Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in Drosophila melanogaster. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. **70**:1117-1121.
- MCKENZIE, S.L. and MESELSON, M. (1977). Translation in vitro of Drosophila heat-shock messages. J.Mol.Biol. **117**:279-283.
- MIRAULT, M.E.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M.; MORAN, L.; ARRIGO, A.P. and TISSIÈRES, A. (1978). The effect of heat shock on gene expression in Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol. **42**: 819-827.
- MORAN, L.; MIRAULT, M.E.; ARRIGO, A.P.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. and TISSIÈRES, A. (1978). Heat shock of Drosophila melanogaster induces the synthesis of new messenger RNAs and proteins. Phil.Trans.Roy.Soc.Lond. B **283**: 391-406.
- OKRETIC, M.C.; PENONI, J.S. and LARA, F.J.S. (1977). Messenger-like RNA synthesis and DNA chromosomal puff in the salivary glands of Rhynchosciara americana. Arch.Biochem. Biophys. **178**: 158-165.

- PACKMAN, S.; AVIV, H.; ROSS, J. and LEDER, P. (1972). A comparison of globin genes in duck reticulocytes and liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**: 813-819.
- PAÇÓ-LARSON, M.L. (1976). Análise quantitativa do conteúdo de DNA da glândula salivar de Bradysia hygida. Dissertação de mestrado. F. M. R. P. - USP.
- PANITZ, R. (1967). Funktionelle Veränderungen an den Riesenchromosomen nach Behandlung mit Gibberellinen. *Biol. Zentralb. (Suppl.)* **86**: 147-156.
- PELLING, C. (1959). Chromosome synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of uridine labelled with tritium. *Nature* **184**: 655-656.
- PELLING, C. (1964). Ribonucleinsäure-synthese der Riesenchromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an Chironomus tentans. *Chromosoma* **15**: 71-122.
- RASCH, E.M. (1970). Two-wavelength cytophotometry of Sciara salivary gland chromosomes. - In: Introduction to Quantitative cytochemistry. Vol. II. Ed. Wied and Bahr. Acad. Press. pag. 357-397.
- RIBEIRO, W.R. (1975). Efeito do 2,3, dihidro-1H-imidazo(1,2-b)pirazol (IMPY) sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA de Bradysia hygida. Dissertação de Mestrado. FMRP-USP.
- RITOSSA, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experientia* **18**: 571-573.
- RITOSSA, F. (1963). New puffs induced by temperature shock, DNP and salicylate in salivary chromosomes of Drosophila melanogaster. *Drosoph. Inf. Serv.* **37**: 122-123.
- RITOSSA, F. (1964a). Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of Drosophila. *Exp. Cell. Res.* **35**: 601-607.
- RITOSSA, F. (1964b). Behavior of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of Drosophila. *Exp. Cell. Res.* **36**: 515-523.

- RIZZO, E. (1980). Descrição dos pufes cromossômicos da Glândula salivar de Bradysia hygida (Diptera, Sciaridae). Dissertação de Mestrado - FMRP-USP.
- RUDKIN, G.T. and CORLETTE, S.L. (1957). Disproportionate synthesis of DNA in polytene chromosome region. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **43**: 964-968.
- RYDLANDER, L. and EDSTRÖM, J.E. (1980). Large sized nascent protein as dominating component during protein synthesis in Chironomus salivary glands. Chromosoma **81**: 85-99.
- RYDLANDER, L.; PIGON, A. and EDSTRÖM, J.E. (1980). Sequences translated by Balbiani ring 75S RNA in vitro are present in giant secretory protein from Chironomus tentans. Chromosoma **81**: 101-113.
- SAUAIA, H. (1971). Cromosomas politênicos de Bradysia hygida. Inibição do desenvolvimento dos pufes de DNA pela hidroxilurêia. Tese de Doutorado - FMRP-USP.
- SAUAIA, H. and ALVES, M.A.R. (1968). A description of a new species of Bradysia (Diptera, Sciaridae). Pap. Avul. Zool. **22**: 85-88.
- SAUAIA, H. and LAICINE, E.M. (1977). Vertical slab electrophoresis apparatus. Anal. Biochem. **80**: 125-132.
- SAUAIA, H.; LAICINE, E.M. and ALVES, M.A.R. (1971). Hydroxyurea inhibition of DNA puff development in the salivary gland chromosomes of Bradysia hygida. Chromosoma **34**: 129-151.
- SCHEDL, P.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; STEWARD, R.; GEHRING, W.J.; MIRAULT, M.E.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M.; MORAN, L. and TISSIÈRES, A. (1978). Two hybrid plasmids with Drosophila melanogaster DNA sequences complementary to mRNA coding for the major heat shock protein. Cell **14**: 921-929.

- SONDERMEIJER, P.J.A. and LUBSEN, N.H. (1978). Heat shock peptides in Drosophila hydei and their in vitro synthesis. Eur.J.Biochem. **88**: 331-339.
- SPRADLING, A.C. (1981). The organization and amplification of two chromosomal domains containing Drosophila chorion genes. Cell **27**: 193-201.
- SPRADLING, A.C. and MAHOWALD, A.P. (1981). A chromosome inversion alters the pattern of specific DNA replication in Drosophila follicle cells. Cell **27**: 203-209.
- SPRADLING, A.; PENNMAN, S. and 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.
- SPRADLING, A.C., WARING, G.L. and MAHOWALD, A.P. (1979). Drosophila bearing the ocelliless mutation underproduce two major chorion proteins both of which map near this gene. Cell **16**: 609-616.
- SULLIVAN, D.; PALACIOS, R.; STAVNEZER, J.; TAYLOR, J.M.; FARAS, A.J.; DILLY, M.L.; SUMMERS, N.M.; BISHOP, J.M. and SCHIMKE (1973). Synthesis of a deoxyribonucleic acid sequence complementary to ovalbumin messenger ribonucleic acid and quantification of ovalbumin genes. J.Biol.Chem. **248**: 7530-7539.
- SUZUKI, Y.; GAGE, L.P. and BROWN, D.D. (1972). The genes for fibroin in Bombyx mori. J.Mol.Biol. **63**: 409-429.
- TISSIÈRES, A.; MITCHELL, H.R. and TRACY, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. J.Mol.Biol. **84**: 389-398.
- TOLEDO, S.M. and LARA, F.J.S. (1978). Translation of messages transcribed from DNA puffs of Rhynchosciara. Biochem. and Biophys.Res.Commun. **85**: 160-166.

VELISSARIOU,V. and ASHBURNER,M. (1980). The secretory proteins of the larval salivary gland of Drosophila melanogaster. Chromosoma **77**: 13-27.

VELISSARIOU,V. and ASHBURNER,M. (1981). Cytogenetic and genetic mapping of a salivary gland secretion protein in Drosophila melanogaster. Chromosoma **84**: 173-185.

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

WINTER,C.E.; BIANCHI,A.G.; TERRA,W.R. and 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.

## APÊNDICE A

### ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA - SDS (Laemmli, 1970)

#### Soluções empregadas

##### Amostra

Tris - HCl 0,25 M pH 6,8 .....	375	µl
Glicerina .....	150	µl
2 - Mercaptoetanol .....	75	µl
SDS a 4% .....	750	µl
Azul de Bromofenol 0,01% .....	150	µl

##### Gel de separação

Tris - HCl 2,25 M pH 8,8 .....	8,0	ml
Sol. de acrilamida (30%) e bis (0,8%) .....	12,0	ml
SDS a 4% .....	1,2	ml
Temed .....	20	µl
Persulfato de amônio a 10% .....	200	µl
Água q.s.p. ....	48	ml

Essa solução corresponde a um gel com  $T = 7,7\%$   
e  $C = 2,6\%$ ; (conferir a notação de Hjerten  
(Maurer, 1971))

##### Gel de Empilhamento

Tris - HCl 0,5 M pH 6,8 .....	2,0	ml
Sol. de acrilamida (30%) e bis (0,8%) .....	1,3	ml

SDS a 4% .....	200	μl
Temed .....	8	μl
Persulfato de amônio a 10% .....	40	μl
Água q.s.p. ....	8,0	ml

Essa solução corresponde a um gel com T = 5% e C = 2,6%.

**Tampão de eletrodo, pH 8,3 - Superior**

Glicina .....	28,8	g
Tris .....	6,0	g
SDS .....	1,0	g
Água q.s.p. ....	1000	ml *

**Tampão de eletrodo, pH 8,3 - Inferior**

Tris .....	6,0	g
Água q.s.p. ....	1000	ml *

\* O pH foi acertado com HCl 4N antes de completar o volume.

**Corante**

TCA a 50% .....	120	ml
Coomassie Blue R .....	120	mg

## APÊNDICE B

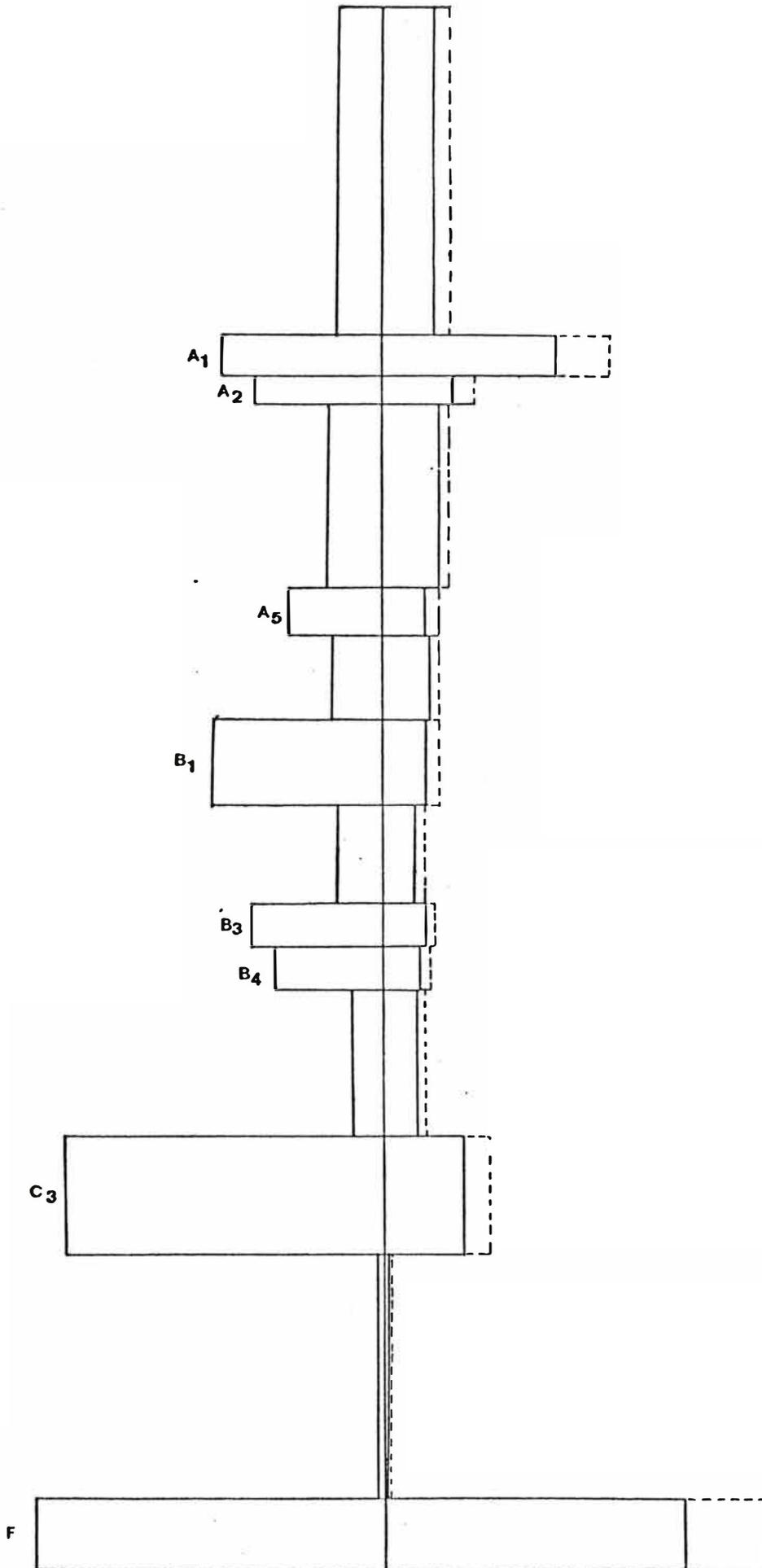
Os gráficos seguintes resumem os resultados densitométricos referentes às raias de material controle e tratado com IMPY dos fluorogramas das figuras 3, 4 e 5. A dimensão horizontal de cada retângulo representa a densidade média de uma fração fluorográfica e a dimensão vertical representa seu número de "fatias"; a área do retângulo representa, pois, a densidade total da fração. Em cada retângulo, a linha cheia assinala a densidade correspondente à existente no fluorograma e a linha tracejada assinala o produto desse valor pela razão entre a quantidade total de radioatividade da raia de material controle e a quantidade total de radioatividade da raia de material tratado com IMPY; com as linhas tracejadas, representa-se a inferência de quais teriam sido os resultados se, nas raias que se comparam, tivesse sido aplicado o mesmo número de cpm e não o mesmo número de regiões glandulares.

As tabelas deste Apêndice explicam-se nas próprias legendas.

AGUA  
6622 CPM

S1  
M7+6H

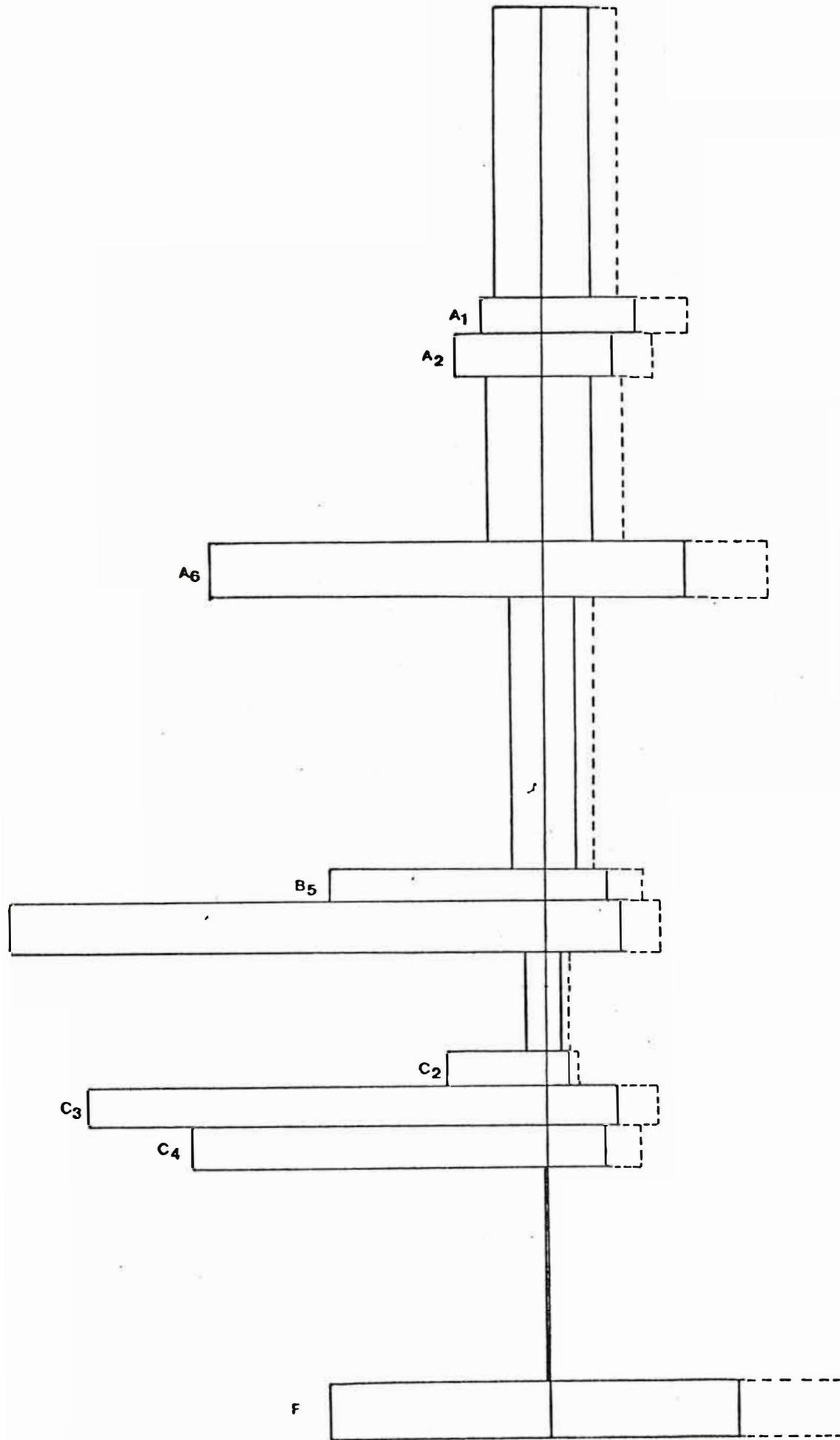
IMPY  
5153 CPM



AGUA  
6630 CPM

S1  
M7+20H

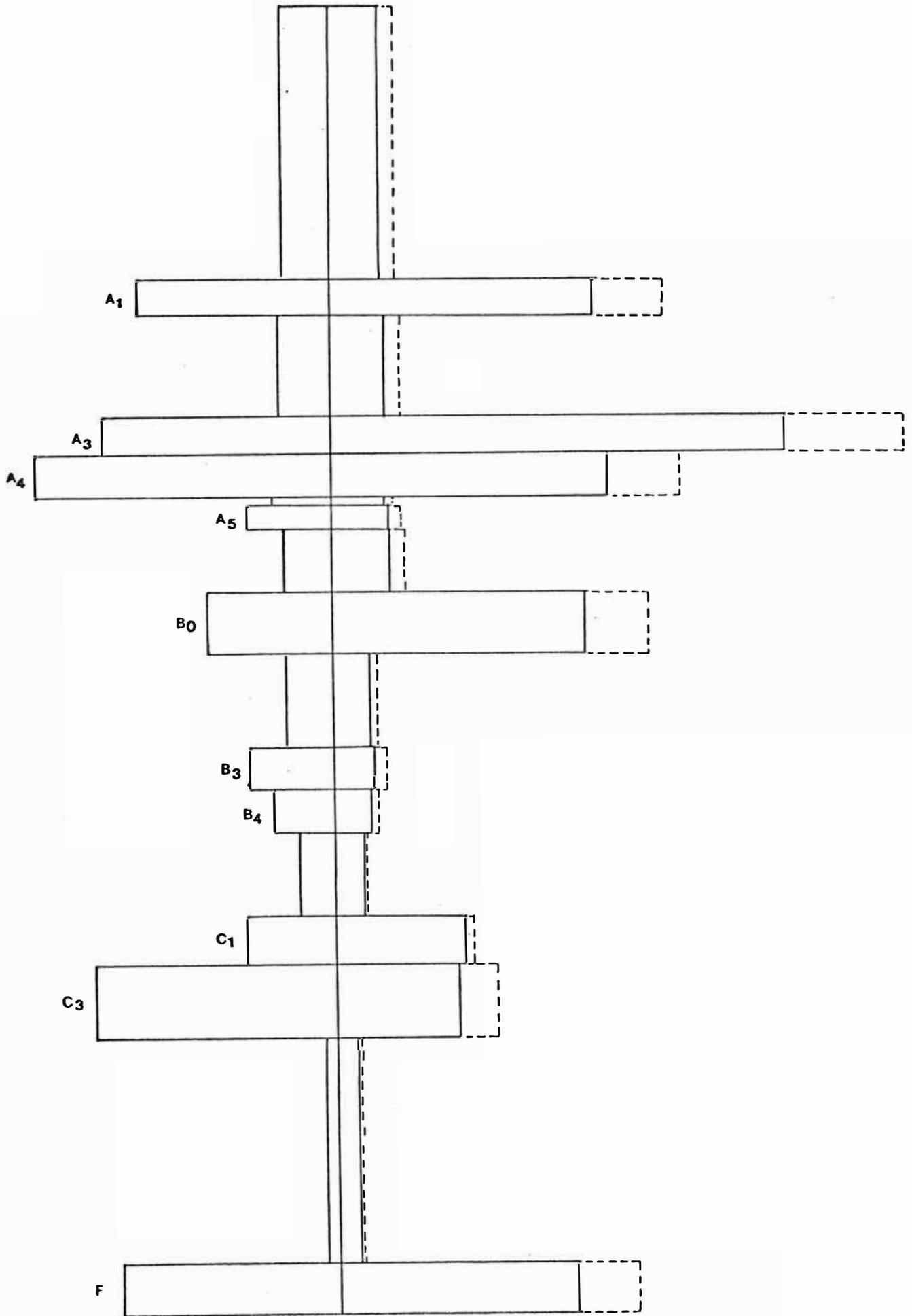
IMPY  
4198 CPM



AGUA  
6722 CPM

S3  
M7+6H

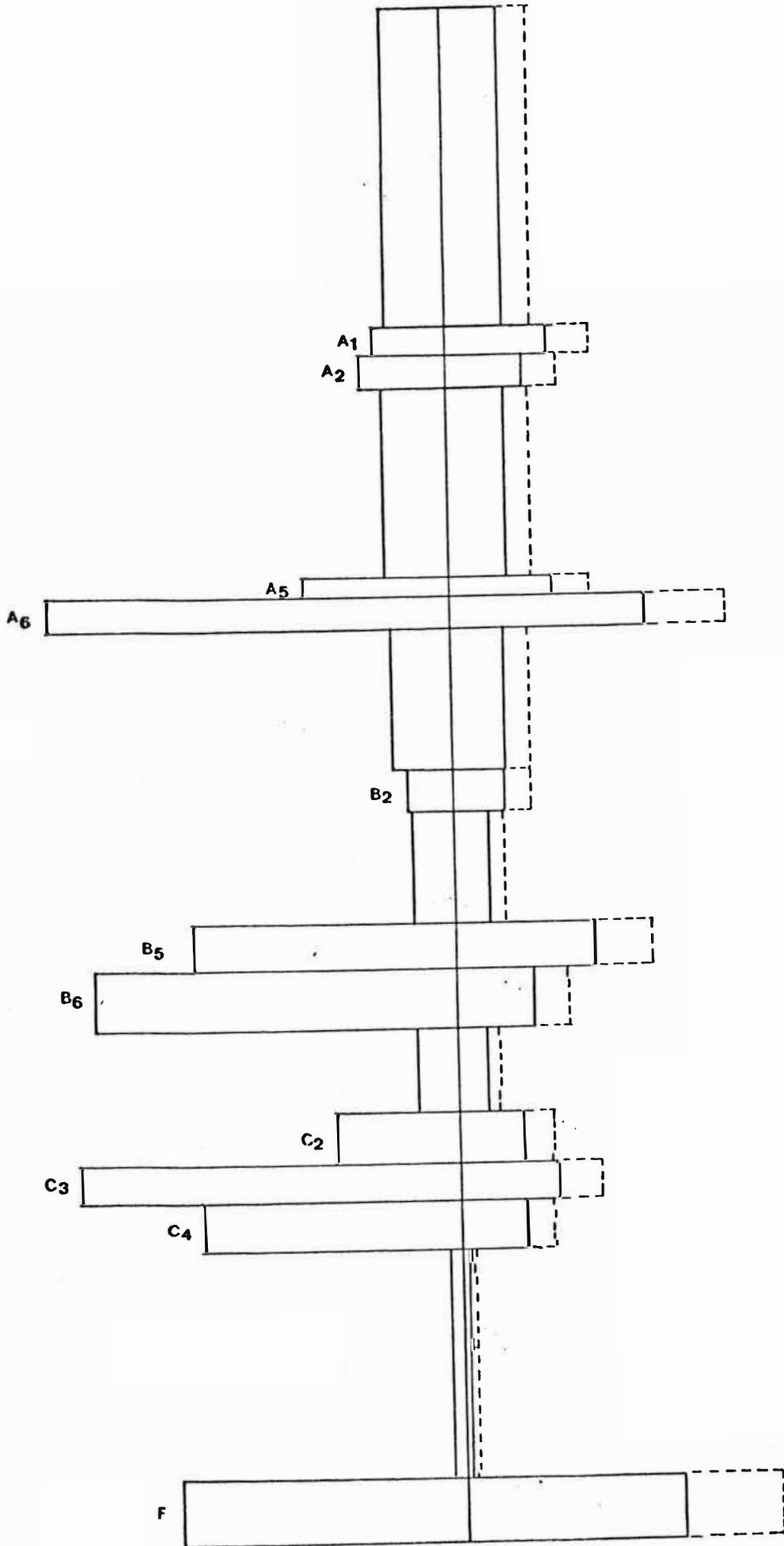
IMPY  
5355 CPM



AGUA  
5788 CPM

S3  
M7+20H

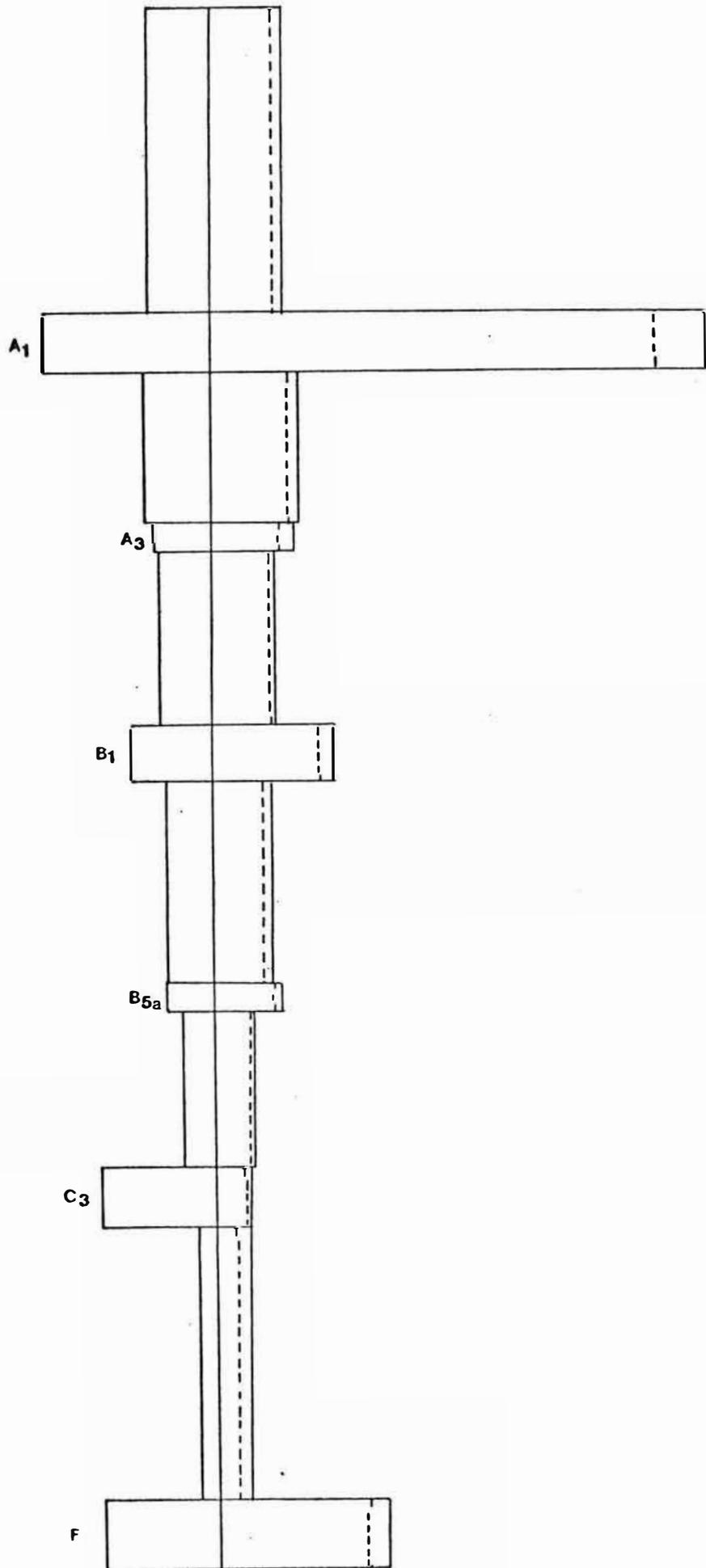
IMPY  
4040 CPM



AGUA  
4859 CPM

S2  
M7+6H

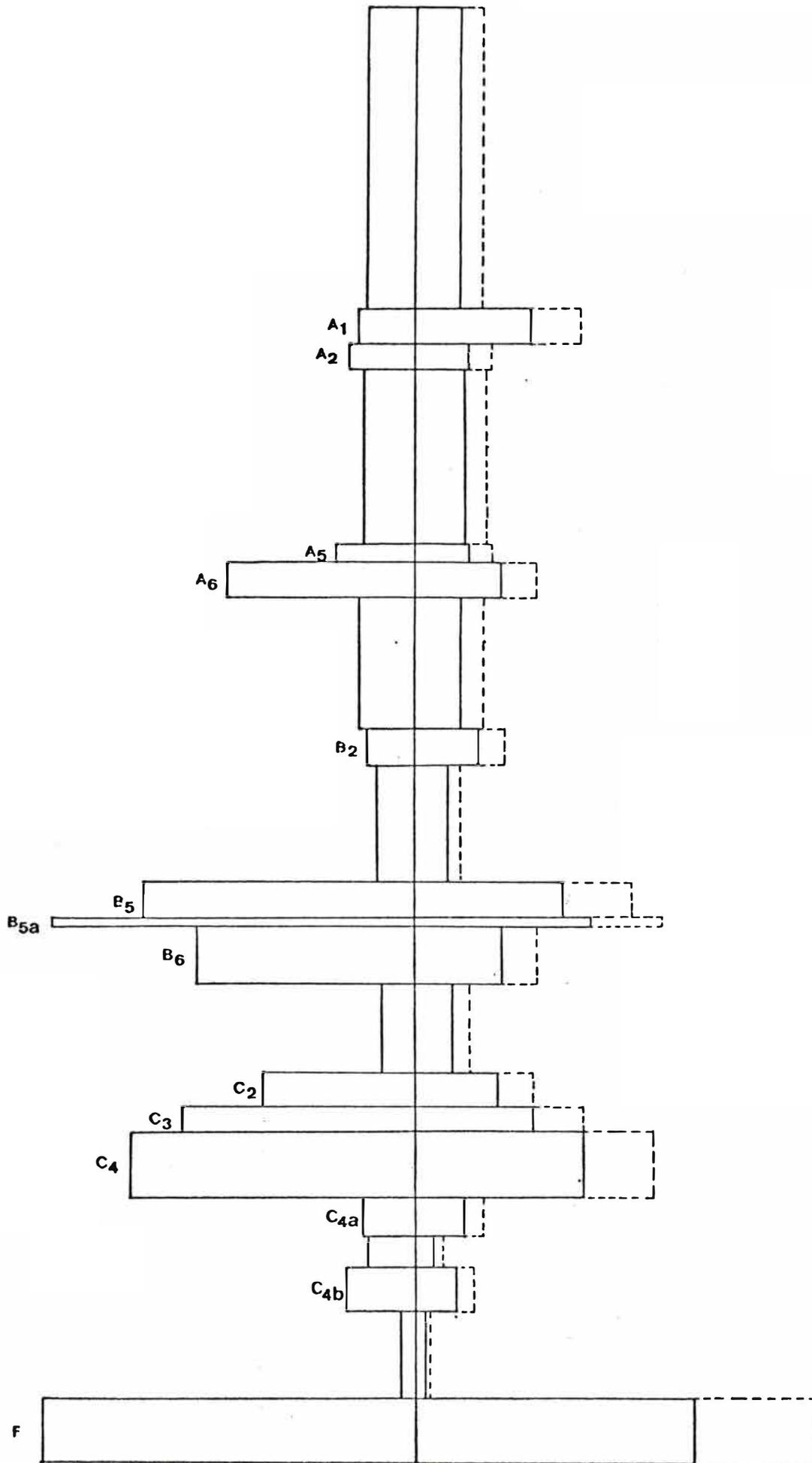
IMPY  
4328 CPM



AGUA  
7844

S2  
M7+20H

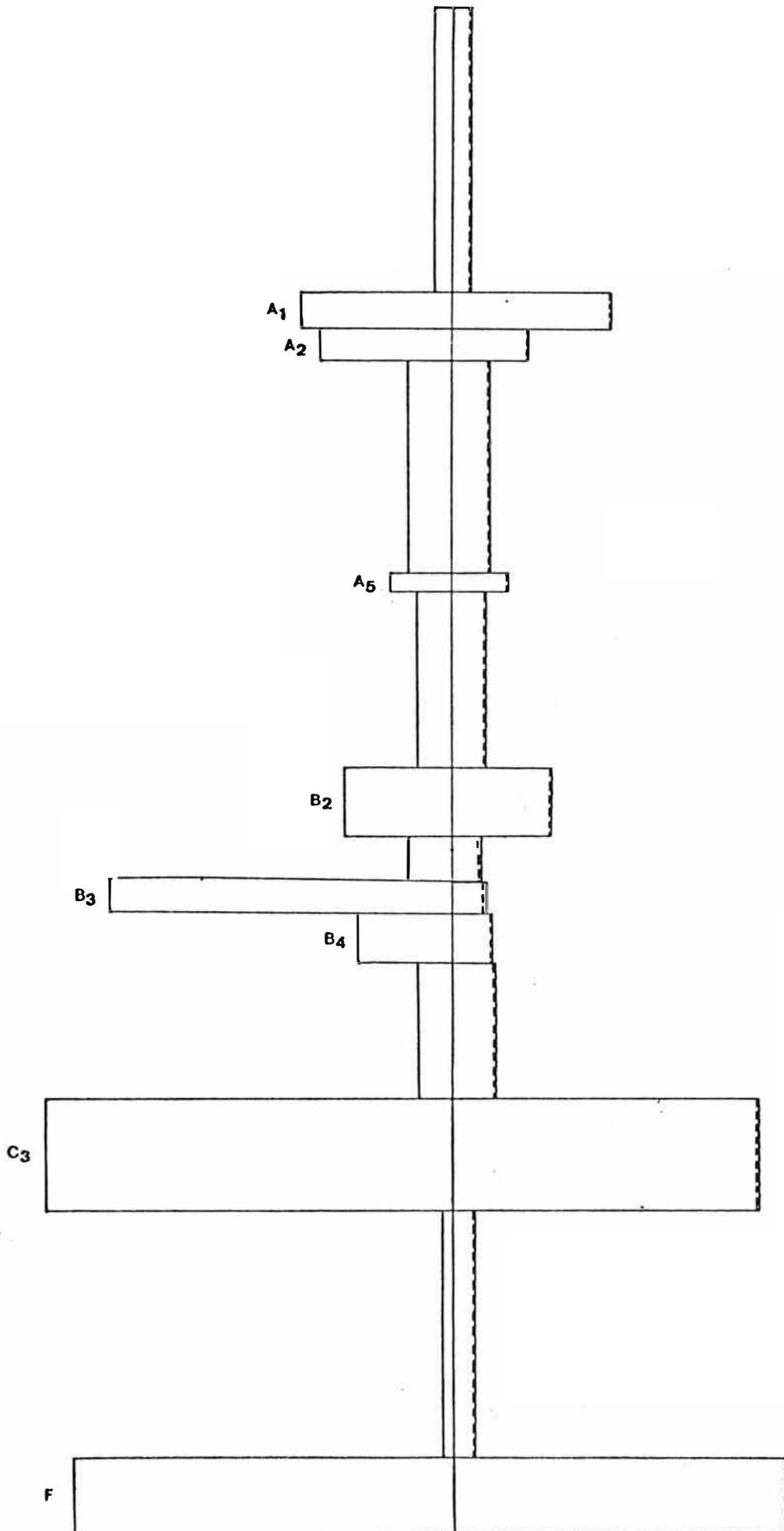
IMPY  
5477 CPM



AGUA  
8890 CPM

S1  
M7

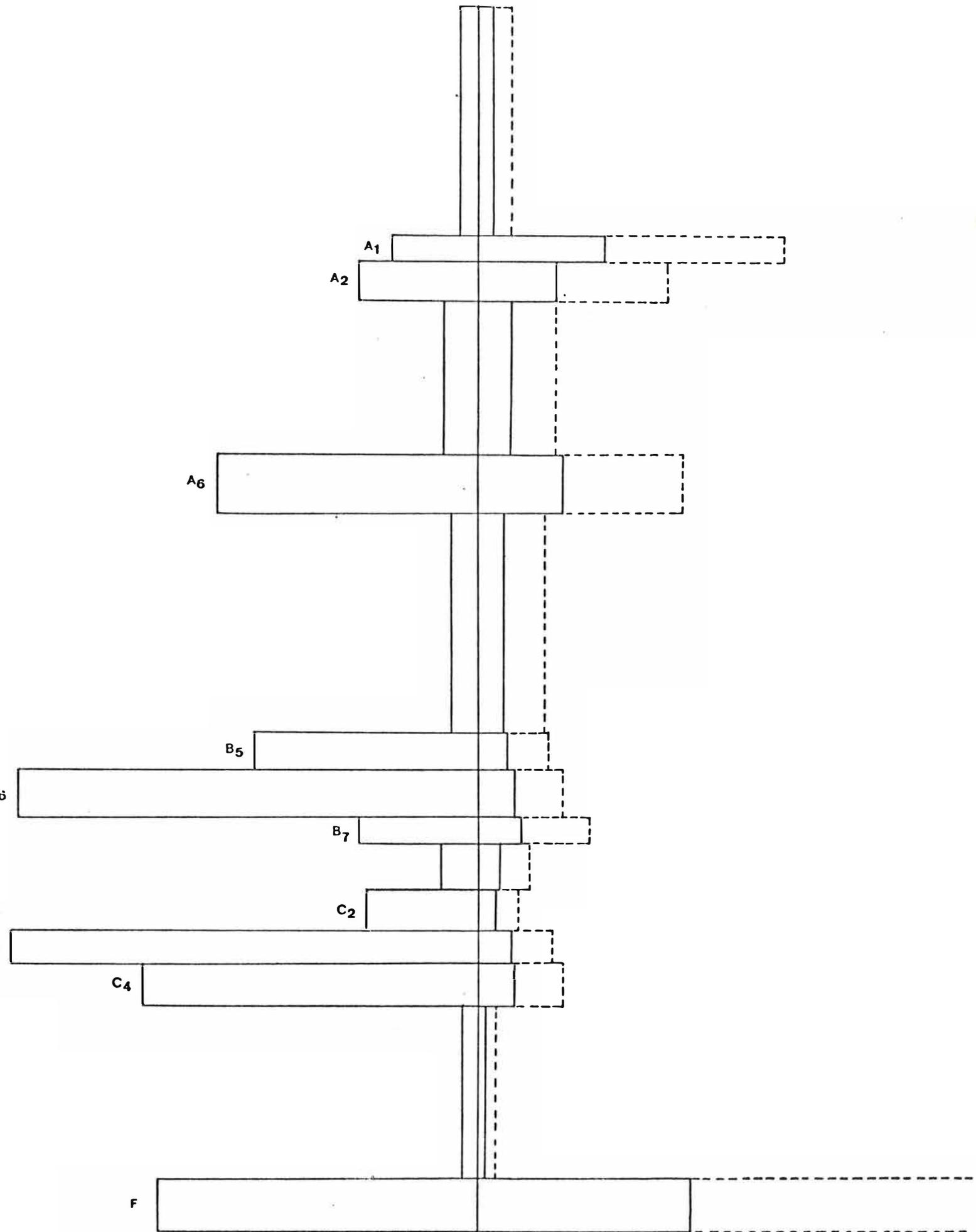
IMPY  
8733 CPM



AGUA  
9540 CPM

S1  
M7+16H

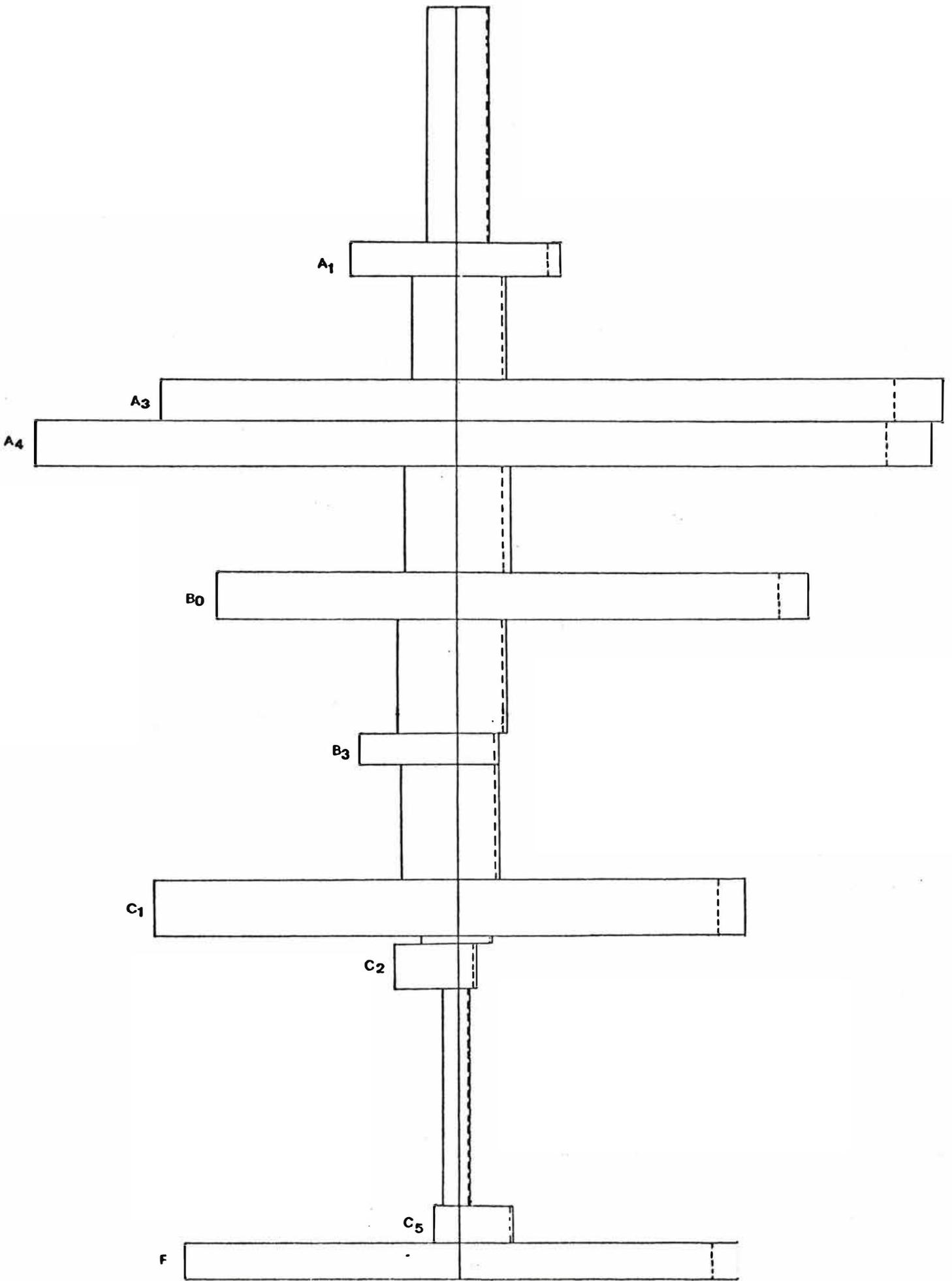
IMPY  
3952 CPM



AGUA  
6448 CPM

S3  
M7

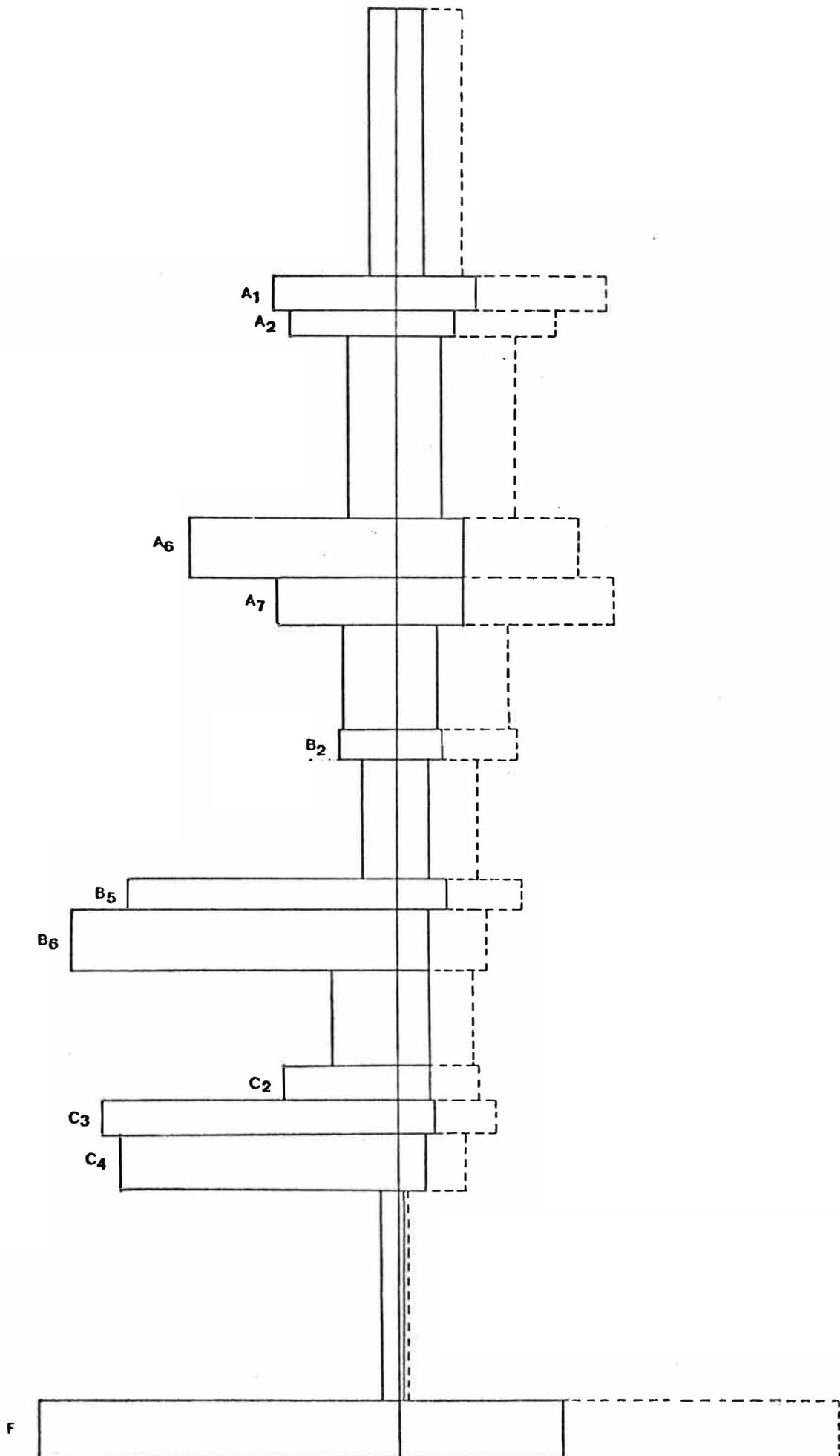
IMPY  
7113 CPM



AGUA  
6981 CPM

S3  
M7+16H

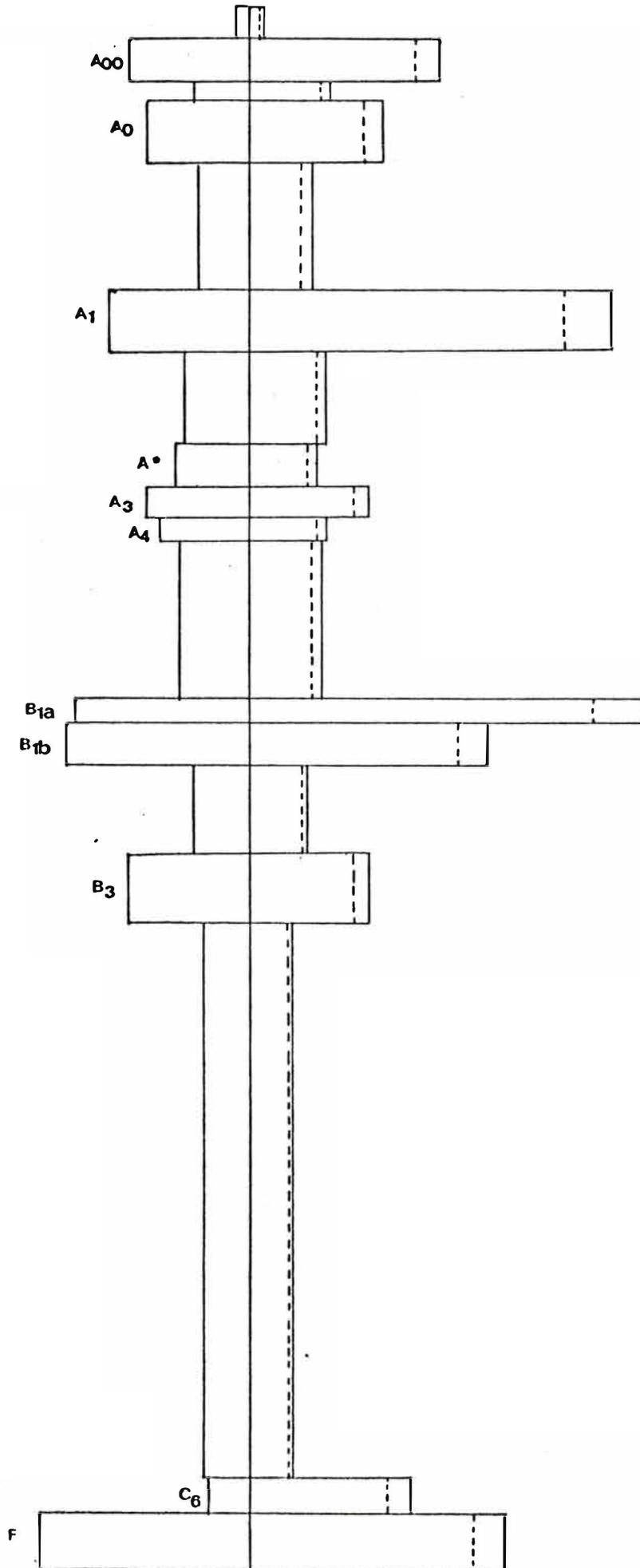
IMPY  
2603 CPM



AGUA  
6256 CPM

S2  
M7

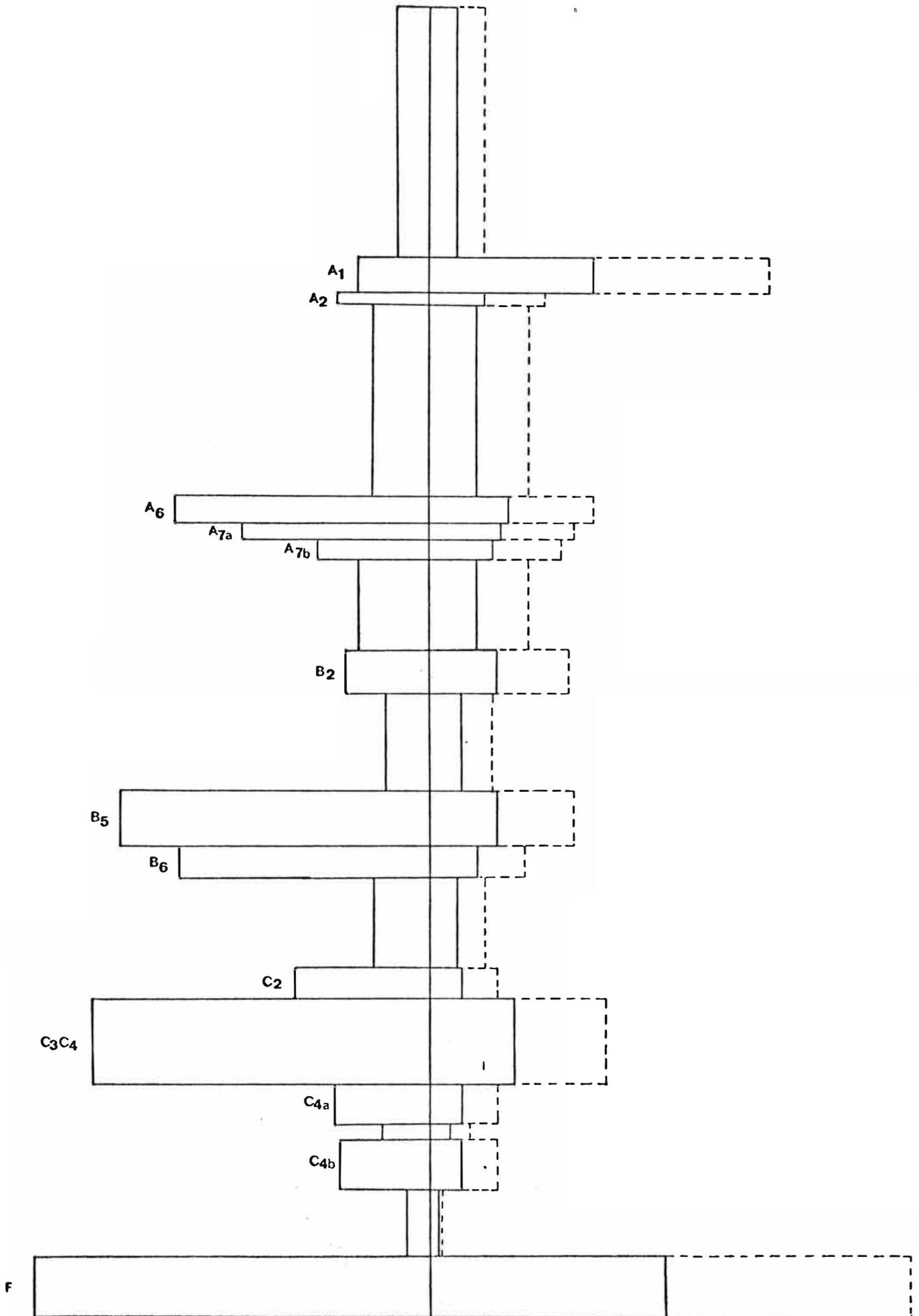
IMPY  
7171 CPM



AGUA  
10793 CPM

S2  
M7+16H

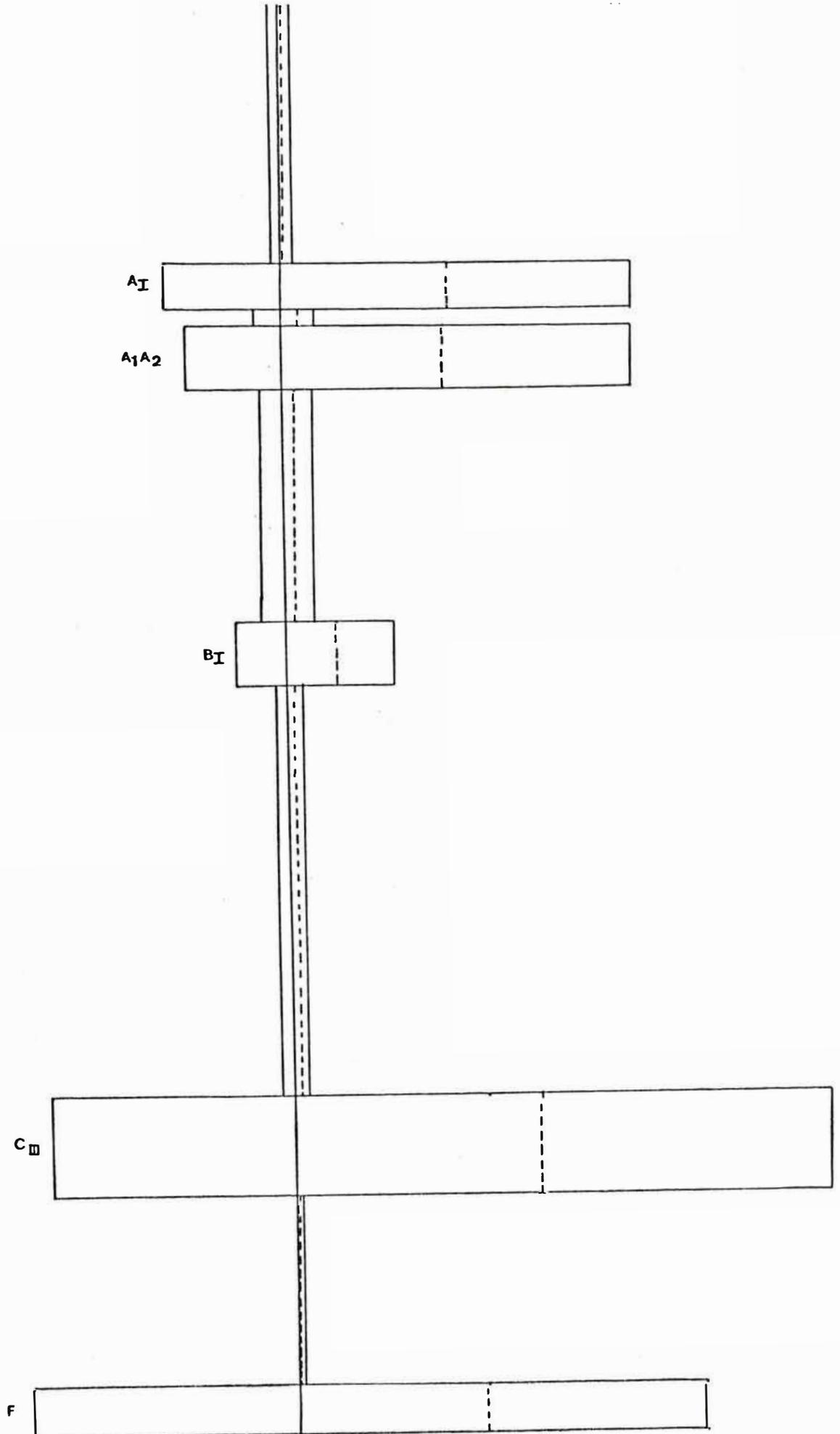
IMPY  
5252 CPM



AGUA  
7007 CPM

S1  
+20H

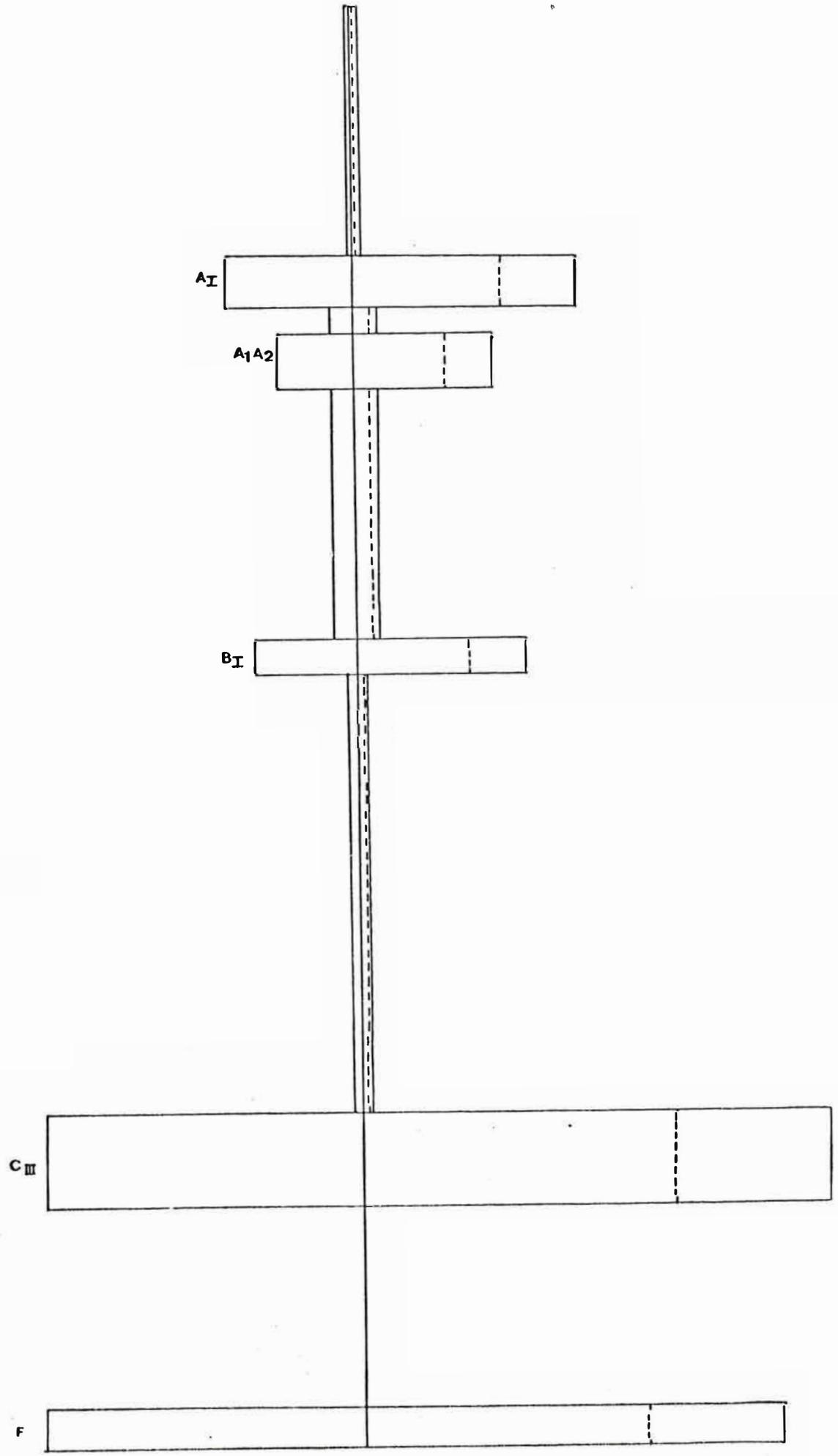
IMPY  
15186 CPM



AGUA  
7207 CPM

S1  
+26H

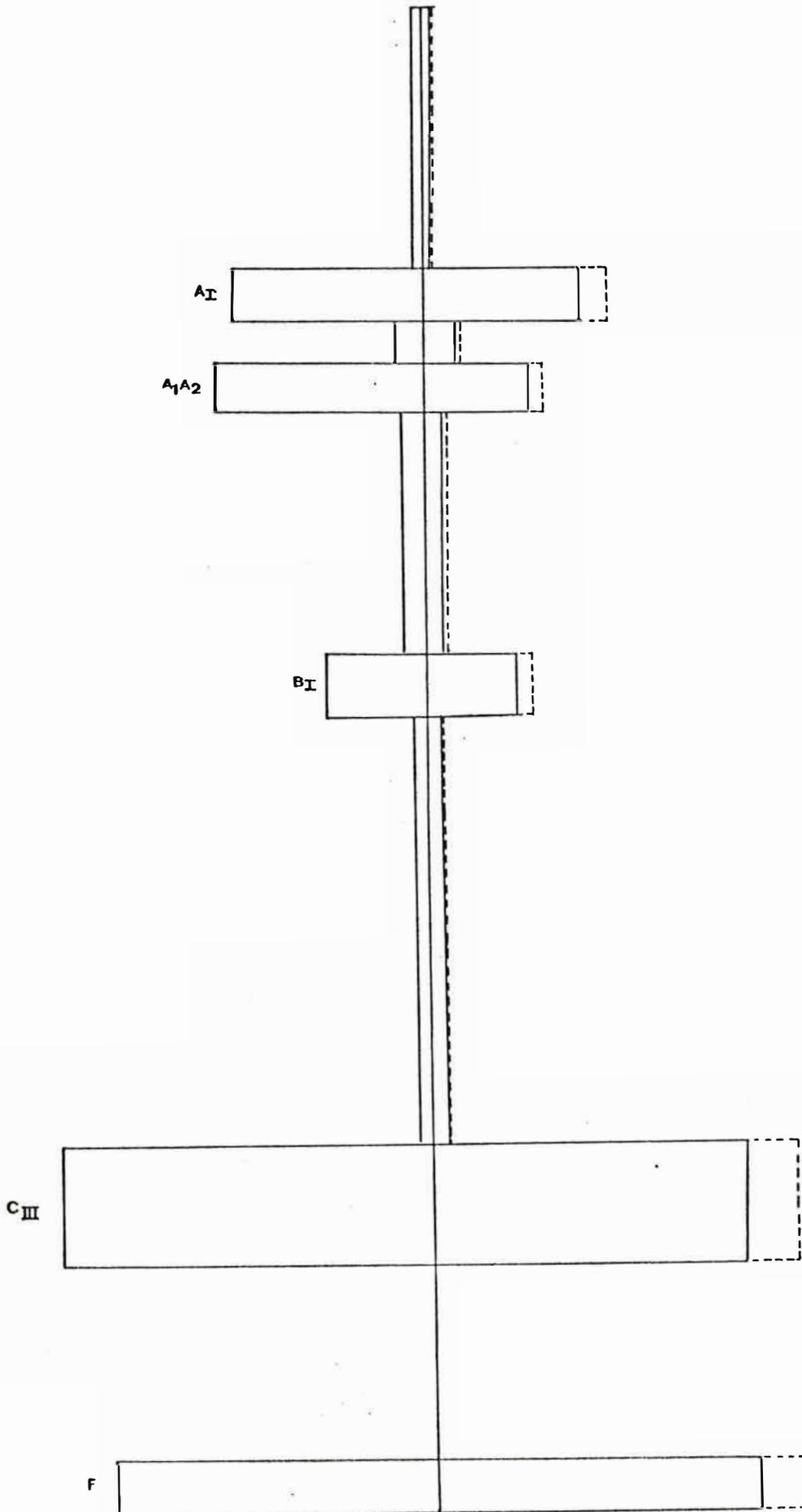
IMPY  
10800 CPM



AGUA  
9347 CPM

S1  
+40H

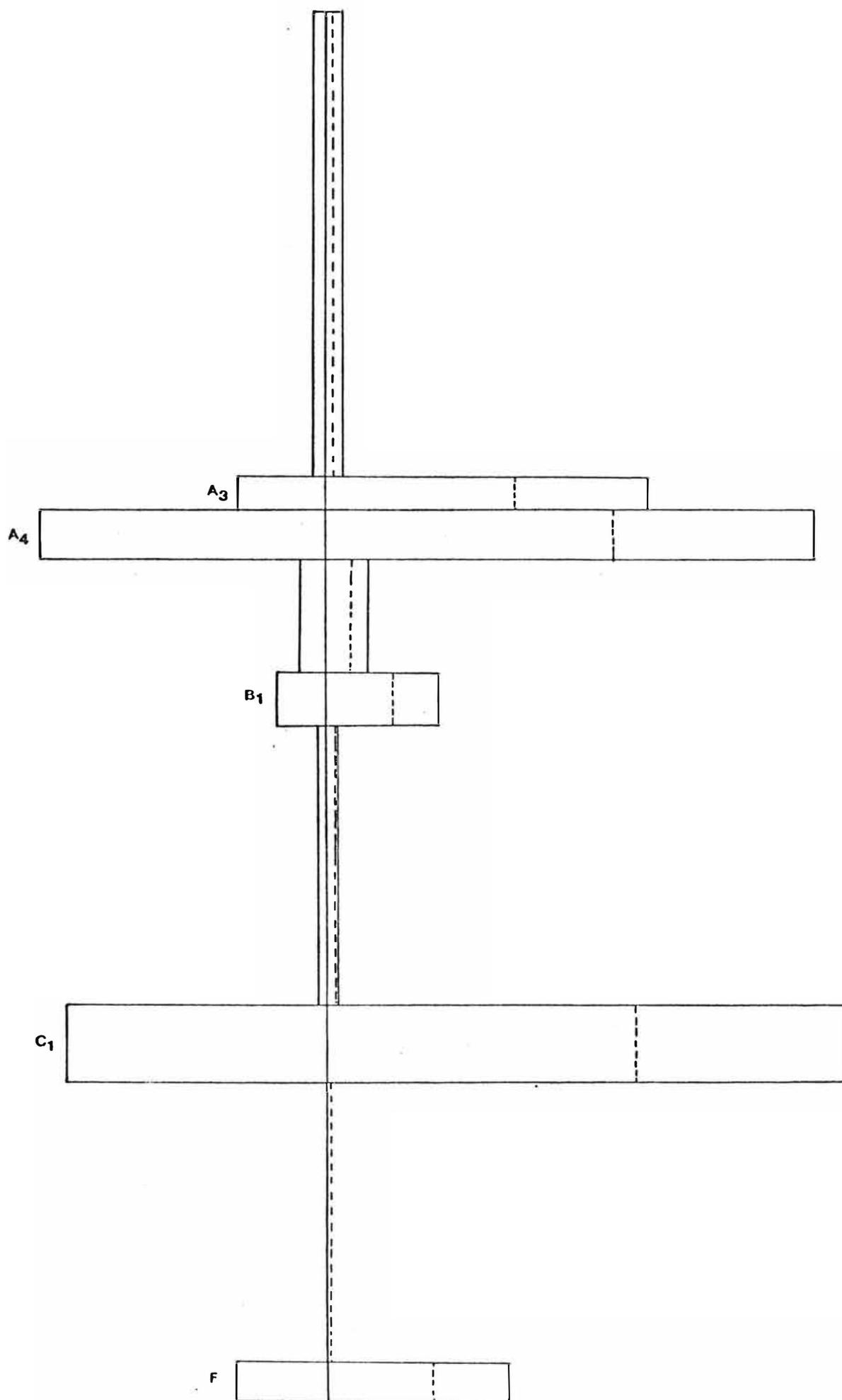
IMPY  
• 8093 CPM



AGUA  
4994 CPM

S3  
+20H

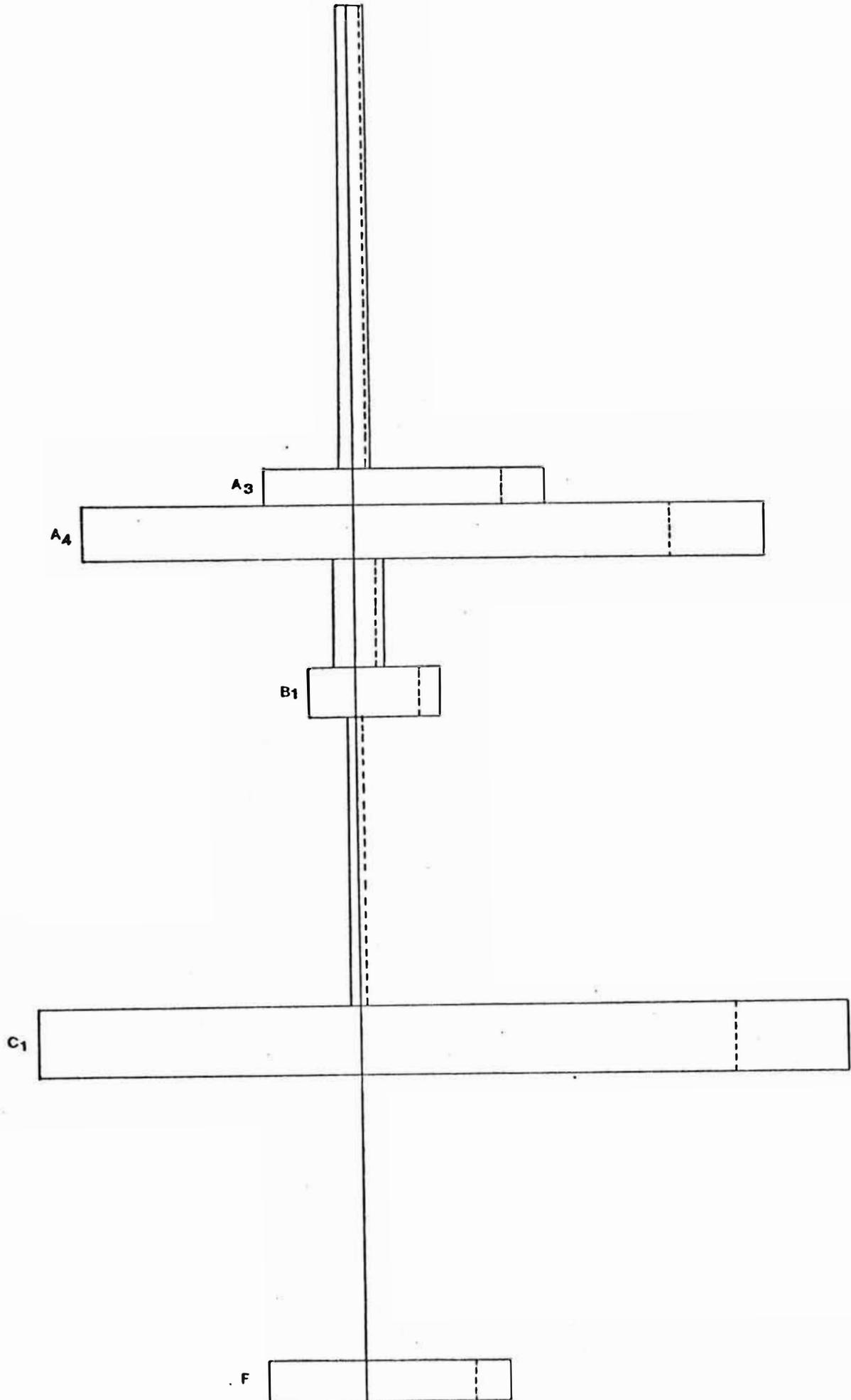
IMPY  
8560 CPM



AGUA  
4901 CPM

S3  
+26H

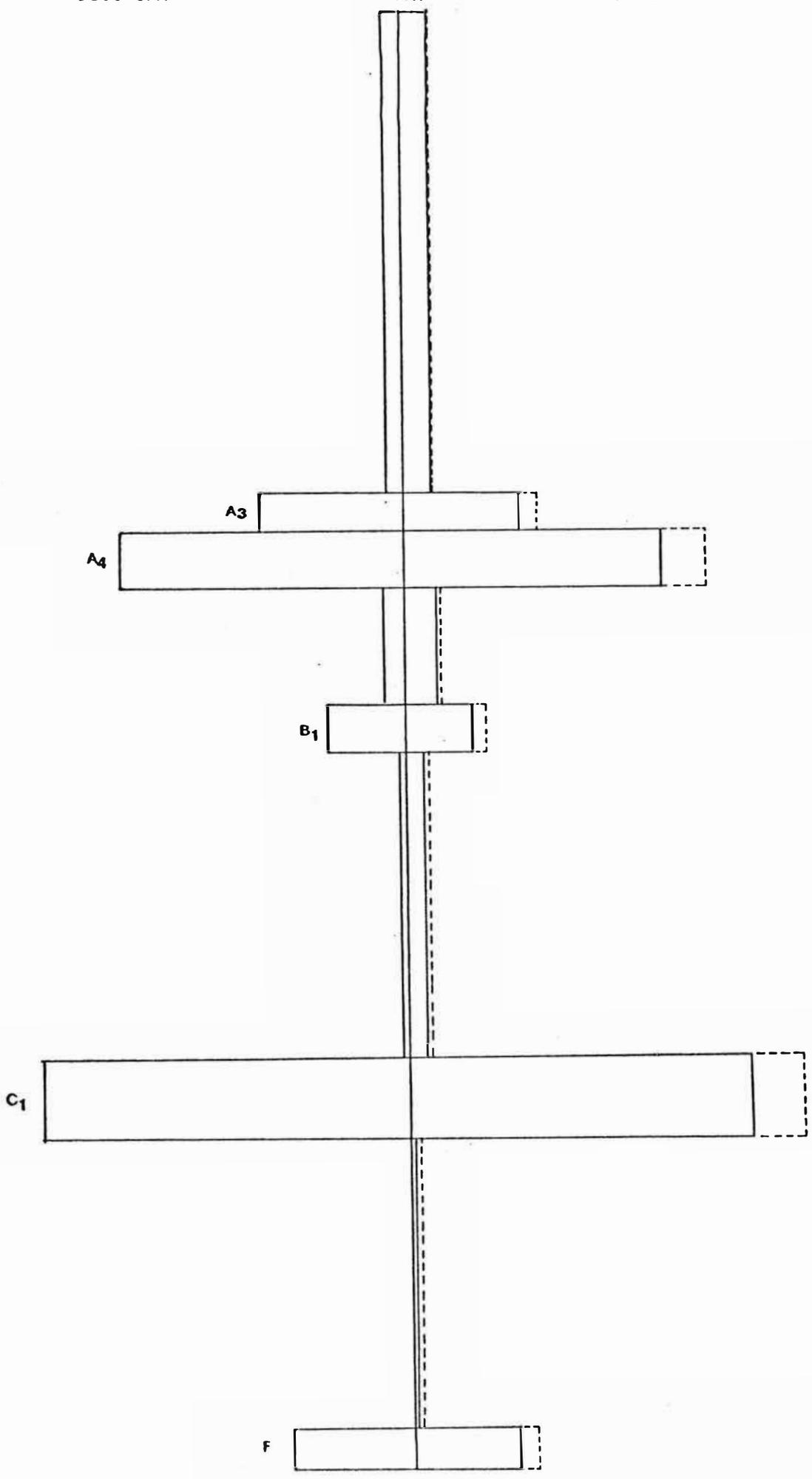
IMPY  
6419 CPM



AGUA  
5906 CPM

S3  
+40H

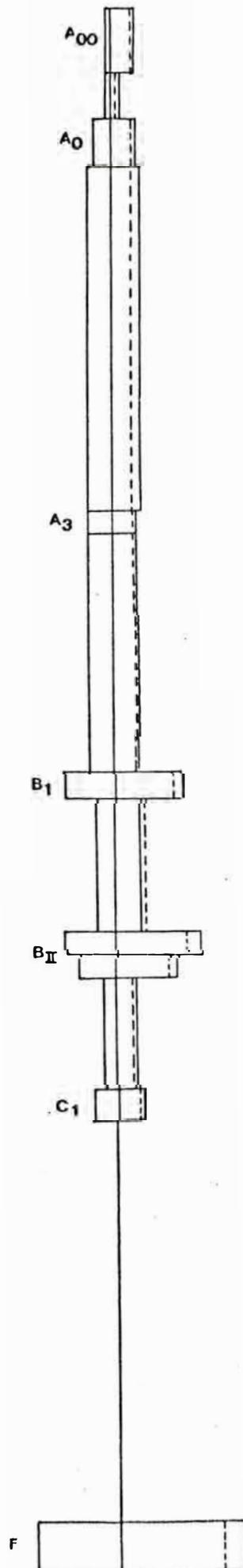
IMPY  
5061 CPM



AGUA  
2867 CPM

S2  
+20H

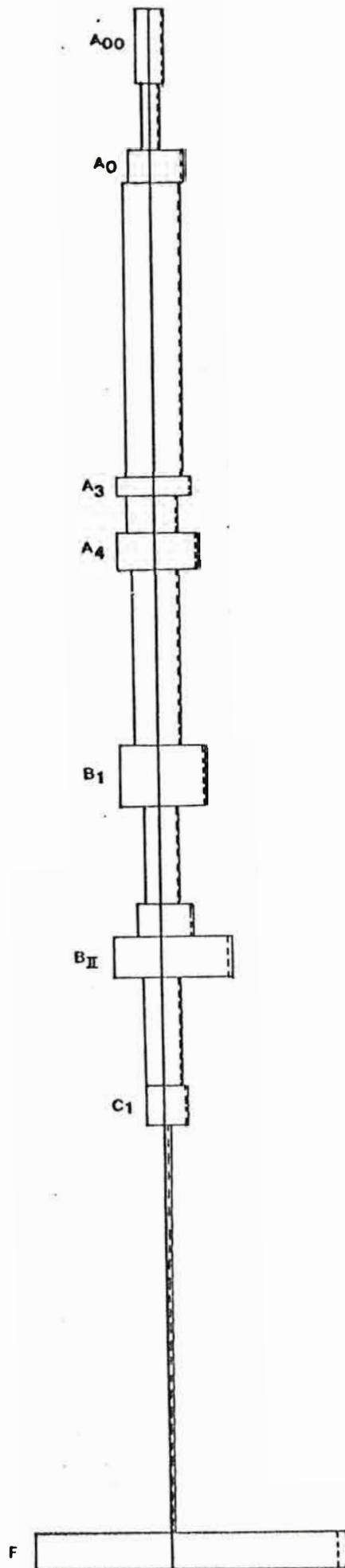
IMPY  
3402 CPM



AGUA  
3061 CPM

S2  
+26H

IMPY  
3061 CPM



AGUA  
4217 CPM

S2  
+40H

IMPY  
3/162 CPM

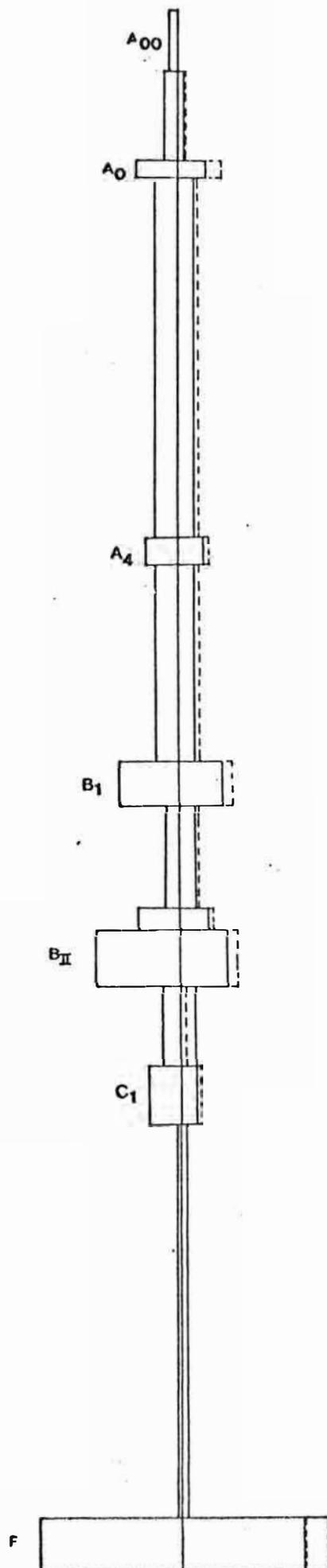


TABELA I

Efeito do IMPY sobre a intensidade de marcação de frações protéicas na glândula salivar de Bradysia hygida. Cada número expressa a razão (multiplicada por 100 e por um fator de normalização) entre a densidade de uma fração em material tratado com IMPY e a fração correspondente em material controle. O fator de normalização é a razão entre o valor da radioatividade total aplicada à raia de material controle e o valor da radioatividade total aplicada à raia correspondente de material tratado com IMPY. S1, região anterior; S3, região posterior; S2, região granulosa. A segunda linha da tabela dá as idades larvais para as quais foram obtidos os fluorogramas; a terceira numera experimentos independentes. As colunas encabeçadas por m7 correspondem às raias assim nomeadas na figura 4. As encabeçadas por m7+6h, 3º experimento, correspondem às raias nomeadas m7+6h na figura 3.

F R A C Ç Ã O	S1			S3			S2		
	m7	m7+6h		m7	m7+6h		m7	m7+6h	
		1º	2º		3º	1º		2º	3º
A00	-	-	-	-	-	-	133	-	-
A0	-	-	-	-	-	-	108	-	-
A1	105	233	142	92	187	170	219	293	261
A2	56	127	73	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	147	413	246	102	94	120
A4	-	-	-	101	111	116	73	-	-
A5	84	88	64	-	81	83	-	-	-
B0	-	-	-	134	429	252	-	-	-
B1	-	-	34	-	-	-	-	238	130
B1a	-	-	-	-	-	-	197	-	-
B1b	-	-	-	-	-	-	114	-	-
B2	89	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	8	58	43	73	70	63	87	-	-
B4	35	62	44	42	80	75	-	-	-
C1	-	-	-	85	62	170	-	-	-
C2	-	-	-	29	-	-	-	-	-
C3	74	59	34	-	31	66	-	-	24
C4	-	53	-	-	-	-	-	-	52
F	85	104	109	92	169	136	104	91	132

TABELA II

Efeito do IMPY sobre a intensidade de marcação de frações protéicas na glândula salivar de Bradysia hygida, expresso como se explica no "caput" da tabela I. As colunas encabeçadas por \* correspondem às raias m7+16h da figura 4. As encabeçadas por \*\* correspondem às raias m7+20h da figura 3.

F R A C Ç Ã O	S1				S3				S2			
	*		**		*		**		*		**	
	m7 + 16h		m7 + 20h		m7 + 16h		m7 + 20h		m7 + 16h		m7 + 20h	
0	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
A1	355	346	1103	242	76	168	123	188	1653	484	-	287
A2	159	123	209	126	74	151	127	124	98	130	132	117
A5	-	-	-	-	-	-	-	92	-	-	-	94
A6	79	72	64	66	42	87	70	66	53	63	99	63
B2	-	-	-	-	143	212	118	153	126	164	127	183
B5	32	73	58	44	48	47	47	73	65	46	33	77
B6	19	50	35	21	38	22	58	30	67	39	155	54
C2	35	86	71	33	-	71	84	71	-	50	64	75
C3	17	63	47	24	49	34	55	35	78	51	87	70
C4	26	67	56	26	41	25	92	34	-	-	199	82
C4a	-	-	-	-	-	-	-	-	129	72	200	128
C4b	-	-	-	-	-	-	-	-	107	74	66	81
F	160	128	203	136	110	121	153	108	101	121	133	105

TABELA III

Efeito do IMPY sobre a intensidade de marcação de frações protéicas na glândula salivar de larvas jovens de Bradysia hygida, expresso como se explica no "caput" da tabela I. O fluorograma correspondente a esta tabela é o da figura 5.

Fração	S1			S3			S2		
	20h	26h	40h	20h	26h	40h	20h	26h	40h
Aoo	-	-	-	-	-	-	303	103	0
Ao	-	-	-	-	-	-	99	128	95
AI	139	117	95	-	-	-	-	-	-
A1-A2	168	124	57	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	219	163	92	93	96	95
A4	-	-	-	101	115	105	-	-	-
BI	107	112	101	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	-	136	142	96	115	107	82
B II	-	-	-	-	-	-	139	140	73
C1	-	-	-	118	113	107	77	135	62
C III	102	98	96	-	-	-	-	-	-
F	72	86	111	114	115	101	124	122	105