

WANDER CAIRO ALBERNAZ

ESTUDO ELETROFORÉTICO DOS POLIPÉPTIDES DA GLÂNDULA
SALIVAR DE *Bradysia hygida* NO DESENVOLVIMENTO

*Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP para obtenção do título de Mestre em Ciências.
(Bioquímica)*

Orientador: Dr. H. Sauaia

Ribeirão Preto

1976

Dedico este trabalho à:

Hírom e Yolanda, meus pais

Irlandes, companheira de todos os instantes

Lister e Miriam, meus filhos

Agradecimentos

Ao Prof.Dr.Heni Sauaia, pela orientação.

Ao Prof.Dr.José Salum, pelo apoio.

À Universidade Federal de Goiás e especialmente ao Departamento de Bioquímica e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas.

À CAPES pela bolsa de estudos.

A todos que de uma maneira ou de outra nos auxiliaram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

	página
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1. Material biológico.....	7
2.2. Métodos.....	9
2.2.1. Obtenção das glândulas e preparo das amostras.....	9
2.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida....	11
a. Equipamento.....	11
b. Confecção dos géis.....	13
c. Aplicação das amostras e eletroforese..	14
d. Fixação, coloração e remoção do excesso de corante.....	15
e. Secagem do gel.....	15
2.2.3. Administração de precursores radioativos.	16
2.2.4. Fluorografia.....	17
2.2.5. Densitometria.....	18
2.2.6. Soluções empregadas para utilizar o sistema de eletroforese descontínua de Laemmli (1970).....	18

	página
III. RESULTADOS.....	21
3.1. Géis coloridos.....	21
3.2. Perfil de síntese de proteínas.....	25
IV. DISCUSSÃO.....	32
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	36
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	37
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
Apêndice.....	49

ABREVIATÓES

BIS	-	N,N'-metileno-bis-acrilamida
DMSO	-	Sulfóxido de dimetila
DNA	-	Ácido desoxirribonuclêico
HCl	-	Ácido clorídrico
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. I N T R O D U Ç Ã O

A hipótese de que os pufes cromossômicos sejam manifestação de atividade gênica, proposta inicialmente com base em estudos sobre quironomídeos (BEERMANN, 1952) e sciarídeos (BREUER e PAVAN, 1952), tem recebido crescente número de verificações positivas, que se tornam progressivamente mais convincentes.

Um dos primeiros trabalhos a apoiar a hipótese é o de BEERMANN (1961). Na glândula salivar das larvas do gênero *Chironomus*, há um grupo de 4 células especiais, que em diversas espécies, como *C. pallidivittatus*, apresentam no cromossoma IV um anel de Balbiani adicional, ausente nas outras células da glândula. No citoplasma dessas células e no ducto da glândula, distinguem-se grânulos de secreção de tamanho considerável. Em *C. tentans*, as células especiais não produzem tais grânulos e são também desprovidas do anel de Balbiani adicional. Nos híbridos resultantes do cruzamento de *C. pallidivittatus* e *C. tentans*, as células especiais produzem quantidade intermediária de grânulos de secreção e apresentam no cromossoma IV, no sítio correspondente ao anel de Balbiani adicional, um anel de Balbiani heterozigoto, isto é, presente apenas em um dos cromossomas IV.

Essa linha de trabalho teve continuação nos estudos de GROSSBACH (1969, 1973), que procurou estudar através de eletrofo-

rese em gel de poliacrilamida, a composição da saliva dos quiromídeos e relacioná-la com dados citogenéticos resultantes também de cruzamento entre espécies diferentes. Com base nesse tipo de informação, GROSSBACH relaciona três pufes com três polipeptídeos diferentes.

Em *Acricotopus lucidus*, PANITZ (1967) e BAUDISH e PANITZ (1968) induziram a regressão de um dos anéis de Balbiani por administração de giberelina A_3 . A incorporação de uridina naquele sítio cromossômico foi então fortemente diminuída. Além disso, houve evidências de que naquelas condições deixava de ser sintetizada uma proteína que contém hidroxiprolina.

Os trabalhos do grupo de Estocolmo (EDSTRÖM, 1974; HOSICK e DANEHOLT, 1974; EDSTRÖM e LAMBERT, 1975) demonstraram em *C. tentans* frações de RNA citoplasmático dotado de poli-A hibridizam-se "in situ" com os anéis de Balbiani 1 e 2. Além disso, mostraram que na fração polissômica, ocorre RNA de peso molecular semelhante ao do RNA extraído de anéis de Balbiani isolados por microdissecção.

As ricas possibilidades de análise genética e citogenética em *Drosophila* foram elegantemente exploradas por KÖRGE (1975) para relacionar, de modo fortemente sugestivo, dois pufes cromossômicos com duas frações eletroforéticas da secreção salivar. Um dos pufes correspondente às bandas $3C_{11}$ e $3C_{12}$ do cromossoma X e o outro está compreendido na seção que vai de

66D₂ a 72E₅ do cromossoma III. Além de demonstrar tal relação por meio de procedimentos clássicos de cruzamento e de recombinação, KÖRGE adiciona ainda a evidência de que a fração eletroforética correspondente ao pufe do cromossoma X guarda clara relação quantitativa com as variações de dose da secção 3C de vidas a deficiências e a duplicações.

Ainda em *Drosophila*, três trabalhos recentes trouxeram apoio importante à idéia de que a indução de pufes cromossômicos corresponde a ativação de genes particulares. Já era conhecido que a sujeição de larvas de *Drosophila* a uma elevação de temperatura (a 37°C, por exemplo) induz nos cromossomas politénicos da glândula salivar a expansão de pufes que normalmente não ocorrem (RITÓSSA, 1962). Os mesmos pufes são indutíveis por anoxia (RITÓSSA, 1964; BREUGEL, 1966). A administração de ecdisona às larvas ou a incubação das glândulas salivares em meio que contenha o hormônio também induzem a expansão de pufes (CLEVER e KARLSON, 1960; CLEVER, 1961; BERENDES, 1967; CROUSE, 1968; ASHBURNER, 1970, 1972). TISSIÈRES, MITCHELL e TRACY (1974) estudaram em *Drosophila* o perfil de síntese de proteínas da glândula salivar e de outros tecidos larvais durante o período pré-pupal. Verificaram que o perfil de síntese de proteínas da glândula salivar varia consideravelmente no desenvolvimento, como seria de esperar das numerosas modificações no padrão de pufes próprias dessa fase do desenvolvimento. Verificaram tam

bem considerável modificação, ainda que menor, no perfil de síntese de proteínas nos túbulos de Malpighi, e variações muito mais modestas no tecido cerebral. Nas glândulas salivares sujeitas a choque térmico, detectaram a aparecimento de 7 ou 8 frações protéicas novas, número que concorda de perto com o de novos pufes então induzidos. A síntese de frações protéicas de mesma mobilidade é também induzida em tecidos desprovidos de cromossomas politênicos, tais como, discos imaginais, cérebro de larvas e cérebro de adultos. Embora, como soi acontecer com trabalhos dessa natureza, a correlação entre pufes induzidos e a síntese de novas frações protéicas tenha caráter circunstancial, o conjunto das observações é fortemente sugestivo. LEWIS, HELMSING e ASHBURNER (1975) confirmaram esses resultados e mostraram ainda que o grau de indução da síntese de novas proteínas, assim como o tamanho dos pufes induzidos, está correlacionado com a intensidade do choque térmico.

Dois estudos subseqüentes ao de TISSIÈRES, MITCHELL e TRACY (1974) demonstraram que o RNA mensageiro extraído de células diplóides em cultura tratadas com choque térmico marcam seletivamente, em condições de hibridização molecular "*in situ*", quase todos os pufes induzidos pelo mesmo tratamento nos cromossomas da glândula salivar (SPRADLING, PENMAN e PARDUE, 1975) ou pelo menos os mais proeminentes (McKENZIE, HENIKOFF e MEELSON, 1975).

Nos sciarídeos, os cromossomas da glândula salivar desenvolvem, ao fim do quarto estágio larval, além de pufes comuns, mais de uma dezena de pufes especiais, chamados de pufes DNA. Estes se caracterizam pelo fato de serem acompanhados e, frequentemente precedidos, de síntese desproporcionada de DNA no sítio cromossômico implicado em sua formação (BREUER e PAVAN, 1955; FICQ e PAVAN, 1957; RUDKIN e CORLETTE, 1957; GABRU SEWYCS-GARCIA, 1964, 1971; CROUSE e KEYL, 1968; PERONDINI e DESSEN, 1969; PAVAN e DA CUNHA, 1969 a,b) e pelo fato de seu desenvolvimento depender de que haja síntese de DNA (SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971). Esses pufes são específicos de glândula salivar; em certas espécies, como *Bradysia hygida*, o padrão de pufes de DNA chega a ser específico de região glandular. Duram relativamente pouco tempo e ocorrem em seqüência altamente reprodutível.

Em *Rhynchosciara*, os estudos bioquímicos até agora realizados (BONALDO, FLOETER, TOLEDO e LARA, 1976) indicam que o RNA extraído de pufes B₂, isolados por microdissecção, consiste principalmente de uma fração 16S e que o aparecimento no citoplasma de um RNA 16S, dotado de poli-A, está estreitamente relacionada com a abertura daquele pufe. Além disso, das frações de RNA marcado extraído de núcleos isolados por microdissecção somente a de 16S marca, em condições de hibridização molecular "*in situ*", o pufe B₂. Esses dados constituem importante evidên

cia de que, dentre os pufes de DNA, pelo menos o pufe B₂ este já implicado na produção de um RNA mensageiro.

A finalidade do presente trabalho é verificar se, durante a fase de desenvolvimento em que ocorrem os pufes de DNA no sciarídeo *Bradysia hygida*, há variações do perfil eletroforético de extratos da glândula salivar ou no perfil de síntese de proteínas desse tecido.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

O ciclo de *Bradysia hygida* (SAUAIA e ALVES, 1968) dura cerca de 36 dias à temperatura de 20°C, em condições de cultura semelhantes às padronizadas por LARA, TAMAKI e PAVAN para *Rhynchosciara americana* (LARA, TAMAKI e PAVAN, 1965). Da eclosão à muda pré-pupal, as larvas passam por quatro estádios. O último inicia-se no 12º dia e nele as larvas atingem tamanho máximo, que nas fêmeas é de 10 a 12 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro. Estas foram as utilizadas nos experimentos.

No sexto dia do quarto estágio nota-se no dorso das larvas, logo atrás da cápsula da cabeça, a formação de pequenas manchas que se modificam em tamanho e forma durante o desenvolvimento o que, por isso, se prestam para a avaliação da idade larval (GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964). A figura 1-A mostra padrões de manchas oculares característicos de diferentes idades de *B. hygida* (SAUAIA, 1971).

A larva possui um par de glândulas salivares aproximadamente tão longas quanto o próprio corpo. Nas glândulas é possível distinguir seis partes, mas é conveniente considerar ao todo três regiões (fig.1B): anterior (S_1), granulosa (S_2) e pos

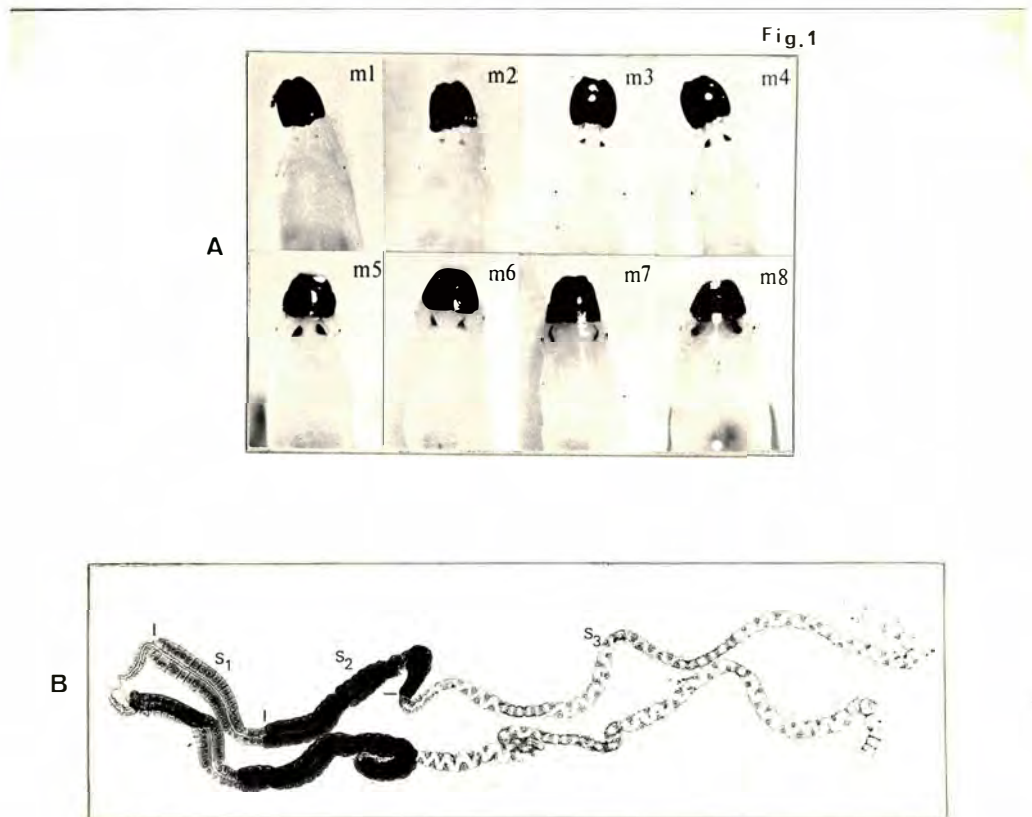


Fig. 1-A - Diferentes padrões de manchas oculares ao longo da segunda metade do quarto estágio larval em *Brasysia hügida*. 13X. Original de H. Sauaia.

B - Par de glandulas salivares, de larva fêmea, na idade correspondente ao padrão m3 de manchas oculares. S₁ - região anterior; S₂ - região granulosa; S₃ - região posterior (mucosa). 15X. Original de M.A.R. Alves.

terior ou mucosa (S_3).

Em *B. hygida* os primórdios dos pufes de DNA começam a formar-se na idade correspondente ao padrão m3 de manchas oculares (Fig.1-A). Vinte horas depois, na idade m7, abrem-se os primeiros pufes de DNA nas regiões S_1 e S_3 . A região S_2 praticamente não forma pufes de DNA (ALVES e SAUAIA, 1975; ALVES, 1975). Oito a dez horas depois de m7, ocorre a expansão de um segundo grupo de pufes de DNA, quando os do primeiro grupo já estão regredidos. Em pupa jovem, virtualmente todos os pufes de DNA se apresentam regredidos ao exame citológico. Ao mesmo tempo em que se expandem e regridem os pufes de DNA, ocorrem também numerosos pufes de RNA em cada cromossoma (SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971).

2.2. Métodos

2.2.1. Obtenção das glândulas e preparo das amostras

As larvas foram dissecadas em salina de BENDER (KRIE DER e PLAUT, 1972) gelada sobre lâmina de vidro ao estereomicroscópio. Para isso, utilizam-se duas pinças, uma de ponta fina, aplicada logo atrás da cápsula da cabeça, e outra, de ponta romba, aplicada à extremidade posterior do animal. Ligeira tração rompe o corpo da larva à altura da primeira pinça; presos a cabeça, saem o par de glândulas salivares e parte do trato digestivo, juntamente com tecido gorduroso. Imediatamente, o conjunto.

era agitado por alguns instantes em TCA a 10%. As glândulas, limpas eram transferidas para outro vidro de relógio embriológico contendo também TCA a 10%. Os vidros de relógio eram mantidos em banho gelado.

As regiões glandulares, S_1 , S_2 e S_3 , eram separadas com estilete e transferidas para tubos de ensaio com capacidade para 1 ml, cheios de TCA a 10%, gelado. Colhidas todas as regiões glandulares dos vidros de relógio, a solução de TCA era removida dos tubos e substituída por solução. A (página 18) também gelada, para neutralizar o resíduo de TCA (LAICINE, comunicação pessoal). Agitava-se por rotação até que os fragmentos de tecido adquirissem cor ligeiramente azulada. O tampão era vertido e cada tubo recebia 50 μ l de solução de amostra (página 19). Os tubos eram cobertos com plástico fino (Zapp) e permaneciam assim até o dia seguinte. Com estilete, perfurava-se então o plástico e aqueciam-se os tubos em água fervendo durante 90 segundos.

O número de regiões glandulares utilizadas em cada amostra está indicado no quadro abaixo.

	S_1	S_2	S_3
<i>Idade</i>			
m3	20	7	7
m7	20	10	10
m7+8 h	21	12	12
Pupa	21	12	12

Desse modo, a quantidade total de proteínas por amostra foi sempre de aproximadamente 80 microgramas, conforme as determinações de LAICINE (comunicação pessoal) feitas em amostras equivalentes a estas, pelo método LOWRY, ROSEBROUGH, FARR e RANDALL (1951).

2.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

a) Equipamento

Foi utilizado o dispositivo de SAUAIA e LAICINE. A célula de eletroforese, construída em plástico, consiste de duas partes que, apostas uma à outra, delimitam o espaço a ser ocupado pelo gel. A unidade assim formada, aberta nas duas extremidades e capaz de repousar sobre sua própria base, termina superiormente por uma plataforma mais espessa e mais larga, que se adapta aos bordos do reservatório inferior como se fosse uma tampa. O reservatório superior é sobreposto à essa plataforma; uma janela retangular em seu fundo circunda a abertura da célula (Fig.2).

Uma das hemi-células recebe nos bordos um filete de graxa (Lubriseal) produzido por seringa hipodérmica cuja ponta é passada ao longo de uma régua. As partes da célula são postas de cabeça para baixo sobre placa de vidro e deslidas uma contra a outra. Aplicam-se grampos de plástico nas bordas da unida

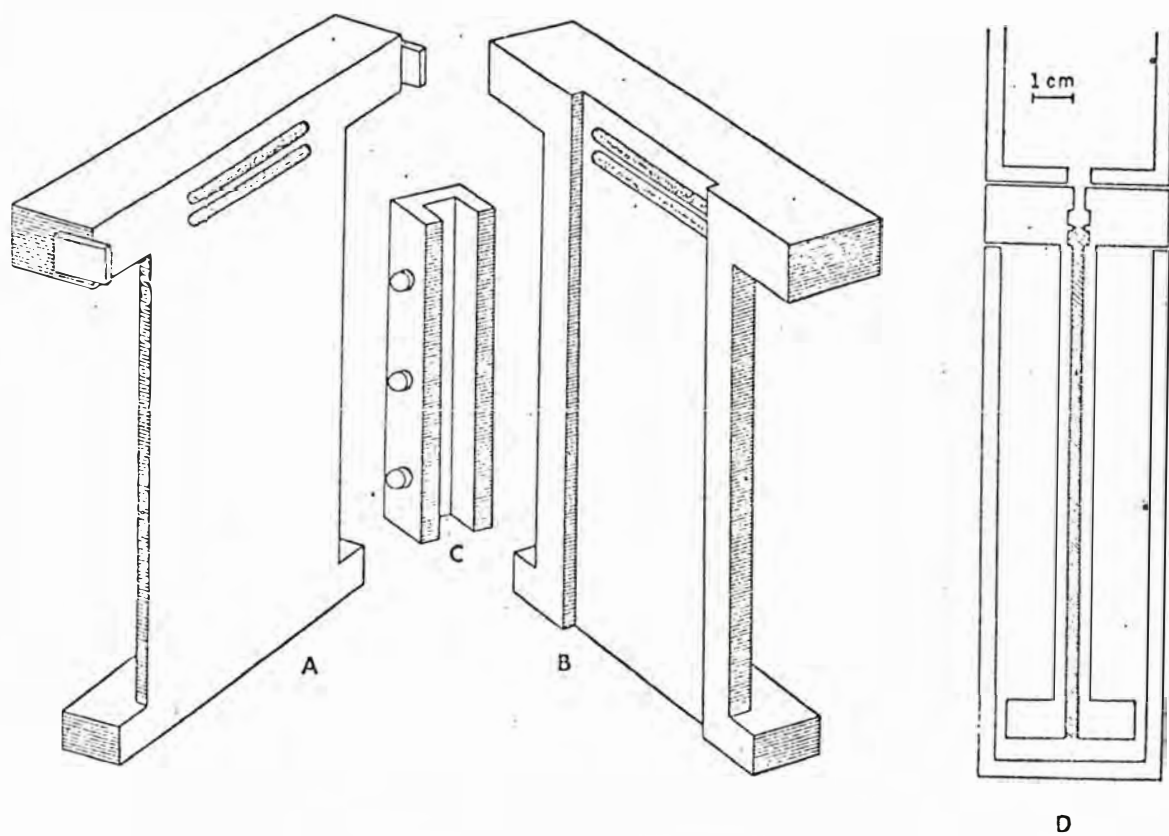


Fig.2 - A e B placas componentes da célula de eletroforese. C um dos grampos. D sistema de eletroforese, montado, em corte sagital.

de. A base da célula recebe também um filete de graxa, e é montada sobre uma peça de acrílico munida de saliências que limitam o deslizamento. A célula fica assim pronta para receber a solução desejada.

A fonte de alimentação utilizada, construída no Laboratório de Eletrônica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, é de tensão variável e corrente constante.

b. Confeecção dos géis

A solução C (pág.19) é introduzida na célula através de uma seringa (prolongada por tubo de polietileno para alcançar o fundo) até a altura de 105 mm. Para a obtenção de uma superfície plana do gel, emprega-se uma peça de Plexiglas (STUDIER, 1973) um pouco mais estreita do que o leito da célula. Nos espaços laterais, o capeamento é feito com solução de SDS a 0,1%. Após a polimerização, que ocorre em aproximadamente 20 a 25 minutos, a peça sólida é retirada e a superfície do gel é lavada várias vezes com a mesma solução de SDS.

Insere-se, então, um pente formador de poços, construído também em Plexiglas. Essa peça possui guias externos que cavalam a plataforma da célula e assegura posição precisa dos moldes das bolsas de amostra a meio caminho entre as paredes da

unidade. Uma vez instalado, o pente deixa nos cantos da célula espaço suficiente para a introdução ou a remoção de líquido por meio de uma pipeta de Pasteur. A solução D, (pág. 19) para gel de empilhamento, é assim introduzida até uma altura de 25 mm e capeada com solução de SDS. Depois de 15 minutos, com o pente em posição, verte-se a solução de capeamento e introduz-se tampão de eletrodo (solução E) (pág. 20). O pente é retirado e o tampão é renovado duas vezes.

c. Aplicação das amostras e eletroforese

Cada amostra, mais densa que o tampão que preenche os poços, é introduzida por meio de pipeta capilar ligada por tubo de polietileno a uma seringa de tuberculina. O êmbolo da seringa é empurrado por um parafuso, contra a tensão de duas molas. O sistema permite controle preciso do volume de amostras e da velocidade com que a mesma é introduzida no poço.

Imediatamente após a aplicação da última amostra, a célula é introduzida no reservatório inferior, já com tampão de eletrodo, evitando-se a formação de bolhas sob a base da célula. O reservatório superior; com vaselina na base, é assentado sobre a plataforma superior da célula e cheio com o mesmo tampão.

As eletroforeses foram feitas com corrente constante.

de 20mA e tensão variável; esta, que no início do experimento era de 60 V atingia 160-170 V ao fim da corrida, que se considera terminada quando a faixa azul (devida ao azul de bromofenol) chegava a 1cm da base inferior da célula. A duração da eletroforese variou de 3 horas e 15 minutos a 3 horas e 25 minutos.

d. Fixação, coloração e remoção do excesso de corante

O gel era retirado da placa e imerso em TCA a 50% (LAEMMLI, 1970), onde permanecia, sob agitação suave, até o dia seguinte. Era então tingido em solução F recém-preparada (página 20) a 37°C, com agitação periódica, por 2 horas. Seguiam-se banhos repetidos em ácido acético a 7%, até que se obtivesse contraste satisfatório entre as bandas e o fundo.

e. Secagem do gel

O dispositivo usado para secar o gel é uma placa de vidro poroso presa em uma armação metálica dotada de uma saída lateral (SAUATA, não publicado). O gel de empilhamento é removido e o de separação é posto sobre um retângulo de papel Whatmann 3 MM colocado sobre a placa porosa. A superfície do gel é aplicada uma película de Zapp e todo o sistema é introduzido em um saco plástico Reynolds Brown-in-Bag (LAEMMLI e FAVRE, 1973) O conjunto é colocado em estufa a 90°C e ligado a uma bomba de vá

cuo.

Os gêis secos foram armazenados entre lâminas de vidro presas uma à outra com fita adesiva.

2.2.3. Administração de precursores radioativos

Foi utilizada uma solução contendo 14 amino-ácidos marcados ^{14}C (Amersham-Searle, CFB.104). A atividade específica da solução era de 54 mCi/mÁtomo e sua concentração 50 $\mu\text{Ci/ml}$.

A mistura foi injetada nas larvas segundo uma modificação do procedimento de SAUAIA, LAICINE e ALVES (1971). O sistema de injeção consiste de uma agulha de vidro, de diâmetro aproximadamente igual a 30 micrômetros na ponta, conectada a um tubo de polietileno (PE-60) que contém a solução a ser administrada; este tubo se liga, por um capilar de vidro, a outro tubo de polietileno, ligado por sua vez a uma microseringa de 100 microlitros (Hamilton 710) por intermédio de uma agulha hipodêrmica (20/8). A partir do capilar do vidro, todo o sistema é cheio com óleo mineral (SAUAIA e ALMEIDA, não publicado). A seringa está montada em um suporte, juntamente com um micrômetro de precisão, que empurra o êmbolo. A cada volta do tambor do micrômetro ocorre a ejeção de 1 μl . Os volumes injetados foram: 2 μl nas idades m3, m7 e m7+8h, e 1 μl por pupa.

A larva era colocada ao estereomicroscópio, sobre papel úmido e a agulha era nela introduzida entre dois segmentos

medianos. Girava-se o tambor do micrômetro esperava-se um minuto. A agulha era retirada lentamente para evitar vazamento e a larva era depositada em recipiente de plástico (formas de fazer gelo) com terra úmida e comida.

2.2.4. Fluorografia

Foi empregado o procedimento de BÖNNER e LASKEY (1974); com modificações apropriadas para gel de 3 mm de espessura. Removido o excesso de corante, o gel passa pelo seguinte tratamento: imersão, por 1 hora, em volume de DMSO aproximadamente igual a 20 vezes o do gel, seguida de outro banho de idênticas condições. O gel é, então, imerso em solução de PPO (22,2%) em DMSO; nesta etapa, o volume da solução é aproximadamente 4 vezes o do gel. Decorridas 6 horas verte-se a solução de PPO e o gel é imerso em água (20 vezes o volume do gel). Depois de uma hora, a água é renovada e o gel aí permanece até o dia seguinte, quando se troca a água para uma permanência de uma hora ou mais. Segue-se a secagem do gel.

Em câmara escura, o gel seco é apostado a uma chapa radiográfica X-OMAT RP/S 54, Kodak, (RANDERATH, 1970) e as duas películas são colocadas entre duas lâminas de vidro presas uma à outra com fita adesiva. O conjunto, protegido da luz, é deixado em um congelador a -80°C . (O congelador foi gentilmente ce-

dido pelo Dr. José Alberto Mello Oliveira, do Departamento de Pa tologia desta Faculdade). Decorridas 100 horas, a montagem é transferida para um recipiente de Isopor e, cerca de 2 horas de pois, é daí retirada para atingir mais rapidamente a temperatu ra da câmara escura, 20°C. O filme radiográfico é mergulhado no revelador para películas de raio-X (KODAK) por 5 minutos, lava do em ácido acético a 2% e imerso em fixador para películas de raios-X, (Kodak), também por 5 minutos. Durante todo o proces samento, a agitação é contínua. O filme é lavado em á gua corren te, em água destilada e posto a secar.

2.2.5. *Densitometria*

A densitometria dos fluorogramas foi feita em um espec trofotofluorômetro Aminco-Bowman (como acessório UNISCAN) ligado a registrador Shimadzu (R-101). Utilizou-se luz de 544 nm e fen da de 0,1 mm.

2.2.6. *Soluções empregadas para utilizar o sistema de ele troforese descontínua de LAEMMLI (1970)*

A. *Tampão de Neutralização*

Tris-HCl 0,5M pH 6,8.....	0,5 ml
Azul de Bromofenol 0,01%.....	1,0 ml
Água q.s.p.	10,0 ml

B. Amostra

Tris-HCl 0,25M pH 6,8.....	125 μ l
Glicerina.....	50 μ l
2-Mercaptoetanol.....	25 μ l
SDS a 4%.....	250 μ l
Azul de Bromofenol 0,01%.....	50 μ l

C. Gel de separação

Tris-HCl 2,25M pH 8,8.....	4,0 ml
Sol.de acrilamida (30%) e bis(0,8%)	6,0 ml
SDS a 4%.....	600 μ l
Temed.....	10 μ l
Persulfato de amônio a 10%.....	100 μ l
Água q.s.p.	24 ml

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

D. Gel de empilhamento

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.....	1,0 ml
Sol.de acrilamida (30%) e bis(0,8%)	650 μ l

SDS a 4%.....	100 µl
Temed.....	4 µl
Persulfato de amônio a 10%.....	20 µl
Água q.s.p.	4,0 ml
Essa solução corresponde a um gel com T = 5% e C = 2,6%	

E. Tampão de eletrodo, pH 8,3

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

F. Corante

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

III. RESULTADOS

3.1. Géis coloridos

Estudamos inicialmente os padrões eletroforéticos das três regiões glandulares nas idades m3, m7, oito horas depois de m7 (m7+8 h) e pupa jovem. Em cada experimento, foram comparados os padrões eletroforéticos das três regiões glandulares de idade m7 com o padrão eletroforético correspondente a uma das três outras idades.

Os padrões eletroforéticos foram estudados em fotografias dos géis. Foram estabelecidas arbitrariamente seis zonas ao longo dos padrões (Fig.3,4 e 5). Em cada zona, as bandas foram numeradas e examinadas meticulosamente nas diferentes raias do gel. O número total de bandas variou, segundo o experimento e a região glandular, de 38 a 56. Mas, os padrões eletroforéticos da mesma região glandular em idades diferentes, quando comparados no mesmo gel, foram praticamente os mesmos; excetua-se as pequenas diferenças assinaladas nas figuras 3, 4 e 5, assim como diferenças de intensidade em algumas poucas bandas fracas. Por outro lado, quando se comparam os padrões eletroforéticos de regiões diferentes, na mesma idade, verificam-se diferenças muito claras.

Verificamos assim que o perfil de polipéptides presen-

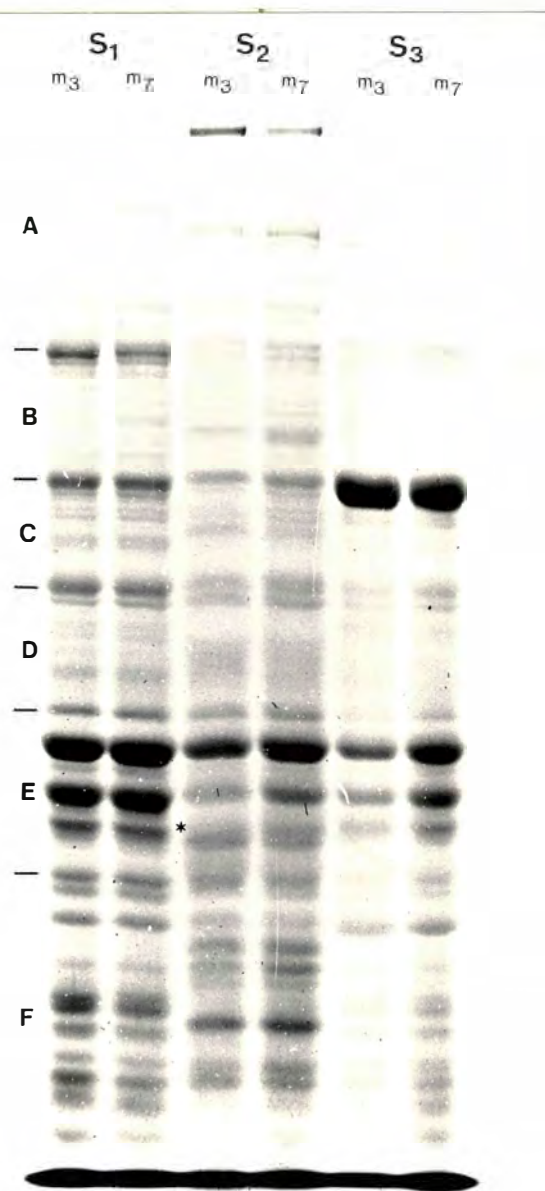


Fig.3 - Padrão eletroforético das regiões glandulares S₁, S₂ e S₃; nas idades m₃ e m₇. Coloração por Coomassie Blue². A, B, C, D, E, e F indicam as seis zonas nas quais foram subdivididas as fotografias para fins de estudo. 1,5 X

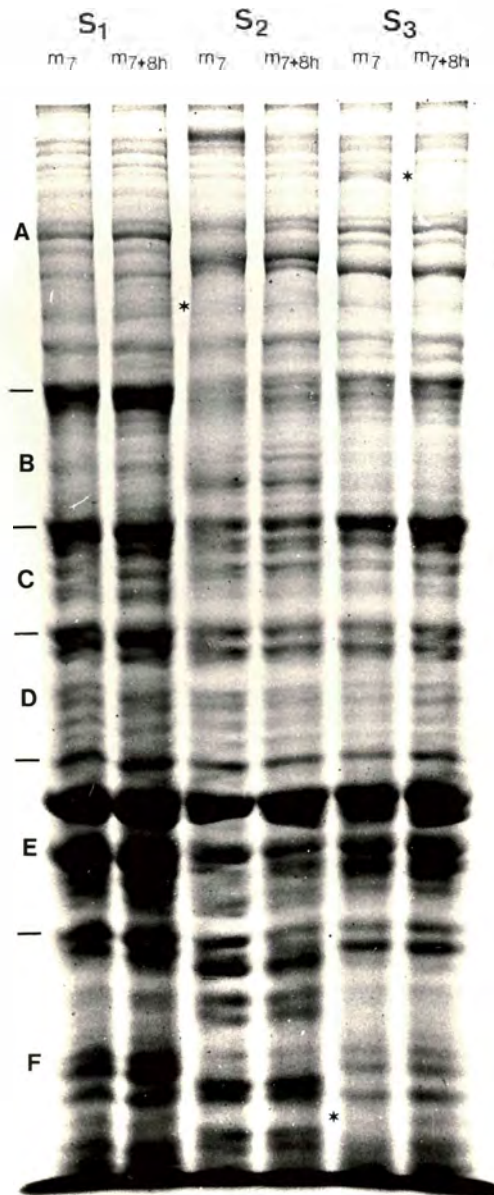


Fig.4 - Padrão eletroforético das regiões glandulares S₁, S₂ e S₃; nas idades m₇ e m₇+8 horas. Coloração por Coomassie Blue. A, B, C, D, E e F indicam as seis zonas nas quais foram subdivididas as fotografias para fins de estudo. 1,5 X

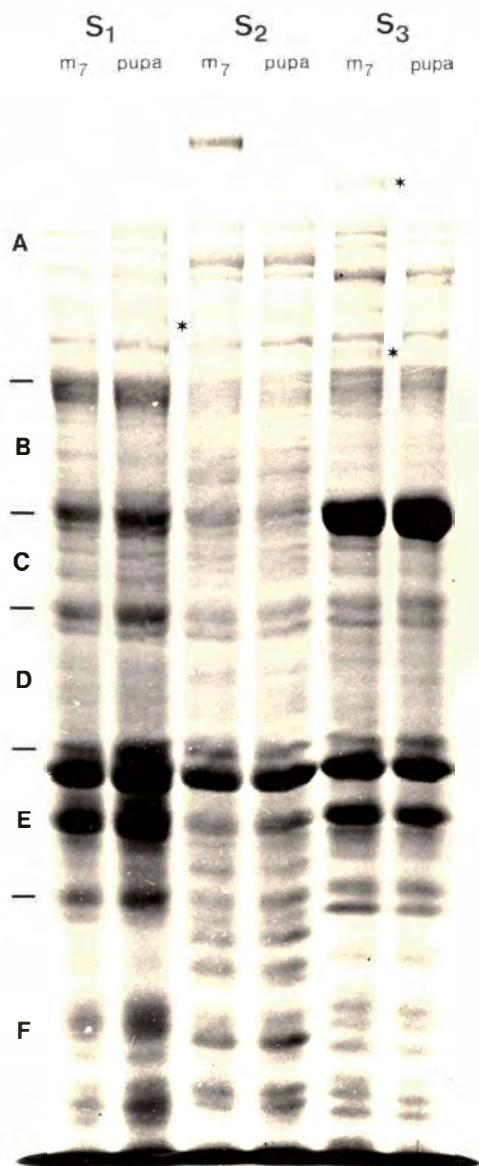


Fig.5 - Padrão eletroforético das regiões glandulares S₁, S₂ e S₃; nas idades m₇ e pupa. Coloração por Coomassie Blue. A,B,C,D,E e F indicam as seis zonas nas quais foram subdivididas as fotografias para fins de estudo.1,5 X.

tes em cada uma das três regiões glandulares quase não varia de m3 a pupa jovem de modo detectável pelo método utilizado.

3.2. Perfil de síntese de proteínas

O perfil de síntese de proteínas foi analisado nas mesmas idades anteriormente examinadas. As larvas de idade m3 foram escolhidas segundo o tamanho das manchas oculares (Fig.1-A). As de m7 foram separadas em m6 (cerca de 1 hora antes de m7) e colocadas em placa de Petri, com terra úmida; ao atingirem m7, receberam a injeção de aminoácidos radioativos. Para a idade m7+8 horas, o tempo foi contado após as larvas terem atingido m7. As pupas eram jovens, isto é, receberam a injeção ainda quando sua cutícula não se tinha amarelado. O volume injetado foi de 1 μ l para as pupas e de 2 μ l para as larvas. O tempo de incorporação foi sempre de 1 hora.

As amostras foram analisadas pelo mesmo sistema de eletroforese. Os géis foram processados para fluorografia e os fluorogramas foram densitometrados e fotografados. Foram obtidos para cada idade pelo menos dois perfis fluorográficos independentes. Para a idade m7, que era representada em todos os experimentos, obtivemos pelo menos seis fluorogramas independentes.

O método de detecção utilizado não produz resposta linear na película radiográfica (LASKEY e MILLS, 1975), o aparelho usado na varredura dos fluorogramas produz perfis de trans

missão e não de densidade óptica. Além disso as bandas fluorográficas não têm largura uniforme, estas três condições excluem a possibilidade de tratamento quantitativo adequado. Para obter, todavia, uma descrição geral das principais variações no perfil de síntese de proteínas segundo as idades larvais estudadas (esquema da fig.9) foi feita uma classificação das bandas fluorográficas com base no exame visual metuculoso dos fluorogramas, de suas fotografias (fig.6,7 e 8) e dos perfis de transmissão registrados (ver apêndice pag.49). Foram incluídas no esquema somente as bandas distinguíveis visualmente e que apresentassem clara e reproduzível variação de intensidade de uma idade larval para outra. As bandas que se adequassem a esses dois requisitos foram classificadas em três categorias. A categoria I (bandas fortes) são aquelas cujo mínimo de transmissão atingisse, em pelo menos um dos experimentos independentes realizados para cada idade larval, valor inferior a 15%; a categoria II (bandas médias) incluiu, das bandas restantes, aquelas que atingissem, em um dos experimentos, valores de transmissão inferiores a 50%. As demais foram incluídas na categoria III (fracas). Desse modo, deixaram de ser incluídas no esquema da fig. 9 bandas que, embora intensas, não satisfizeram plenamente os critérios explicados acima. Nas fotografias dos fluorogramas (Fig. 6,7 e 8) assinalam-se os níveis nos quais se distinguem frações incluídas no esquema da fig.9.

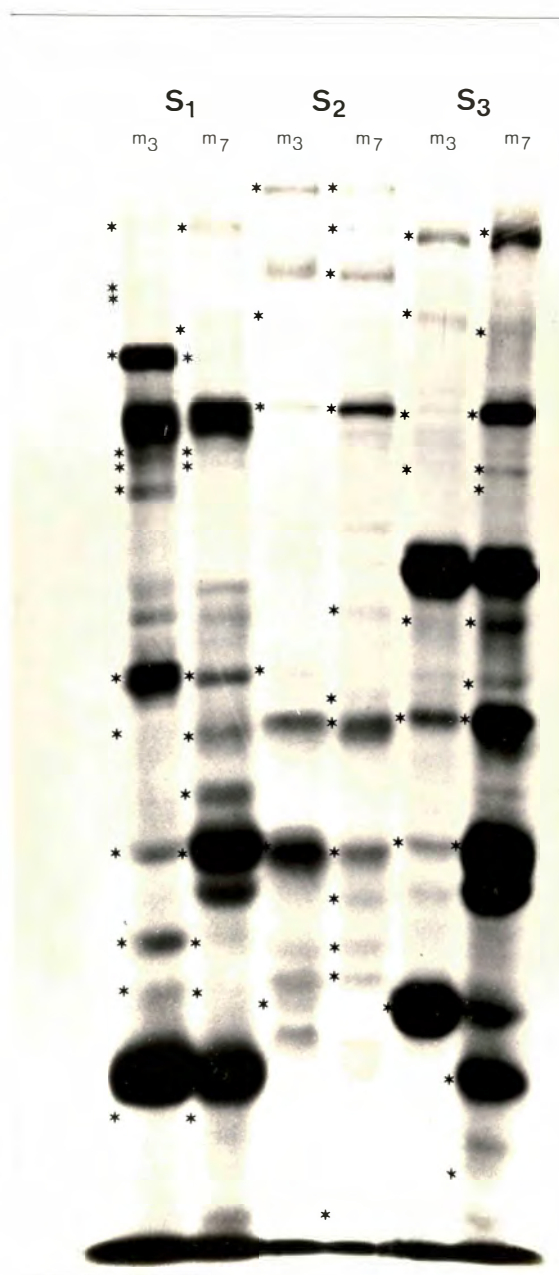


Fig.6 - Fluorografia de gel de eletroforese em que se comparam os perfis de S₁, S₂ e S₃ nas idades m₃ e m₇. Tempo de exposição 100 horas. 1,5 X.

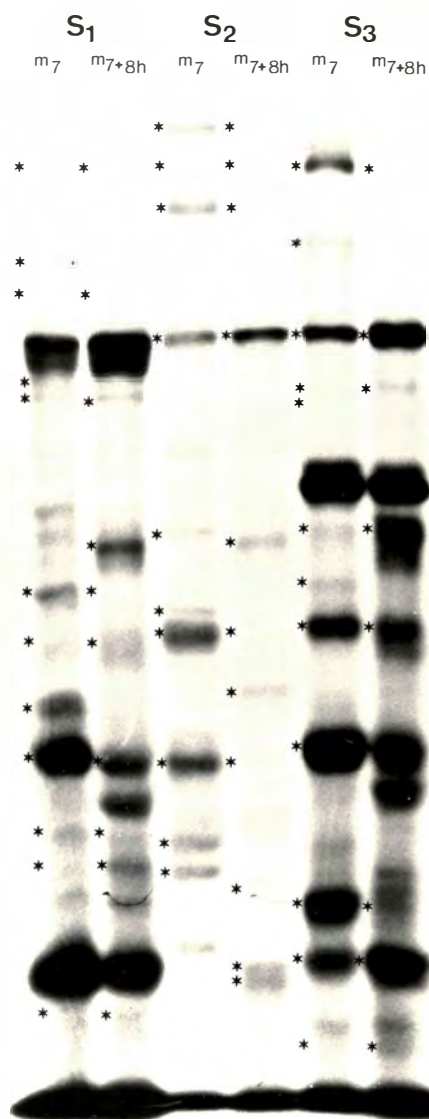


Fig.7 - Fluorografia de gel de eletroforese em que se comparam os perfis de S₁, S₂ e S₃ nas idades m₇ e m₇₊₈ horas. Tempo de exposição 100 horas. 1,5 X.

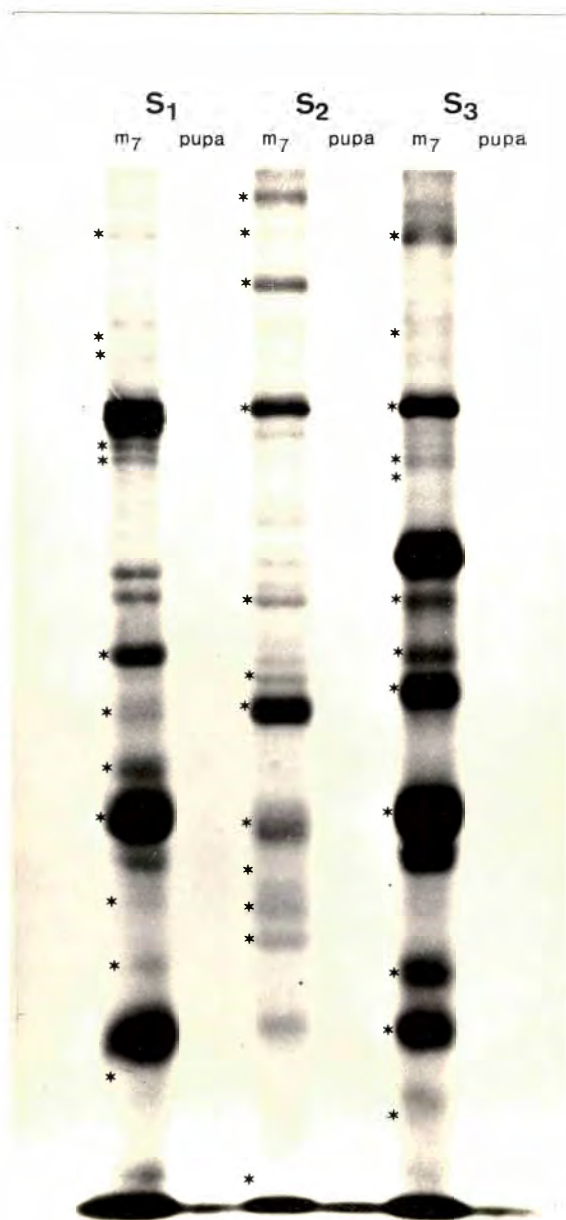


Fig.8 - Fluorografia de gel de eletroforese em que se comparam os perfis de S₁, S₂ e S₃ nas idades m₇ e pupa. Tempo de exposição 100 horas. 1,5 X.

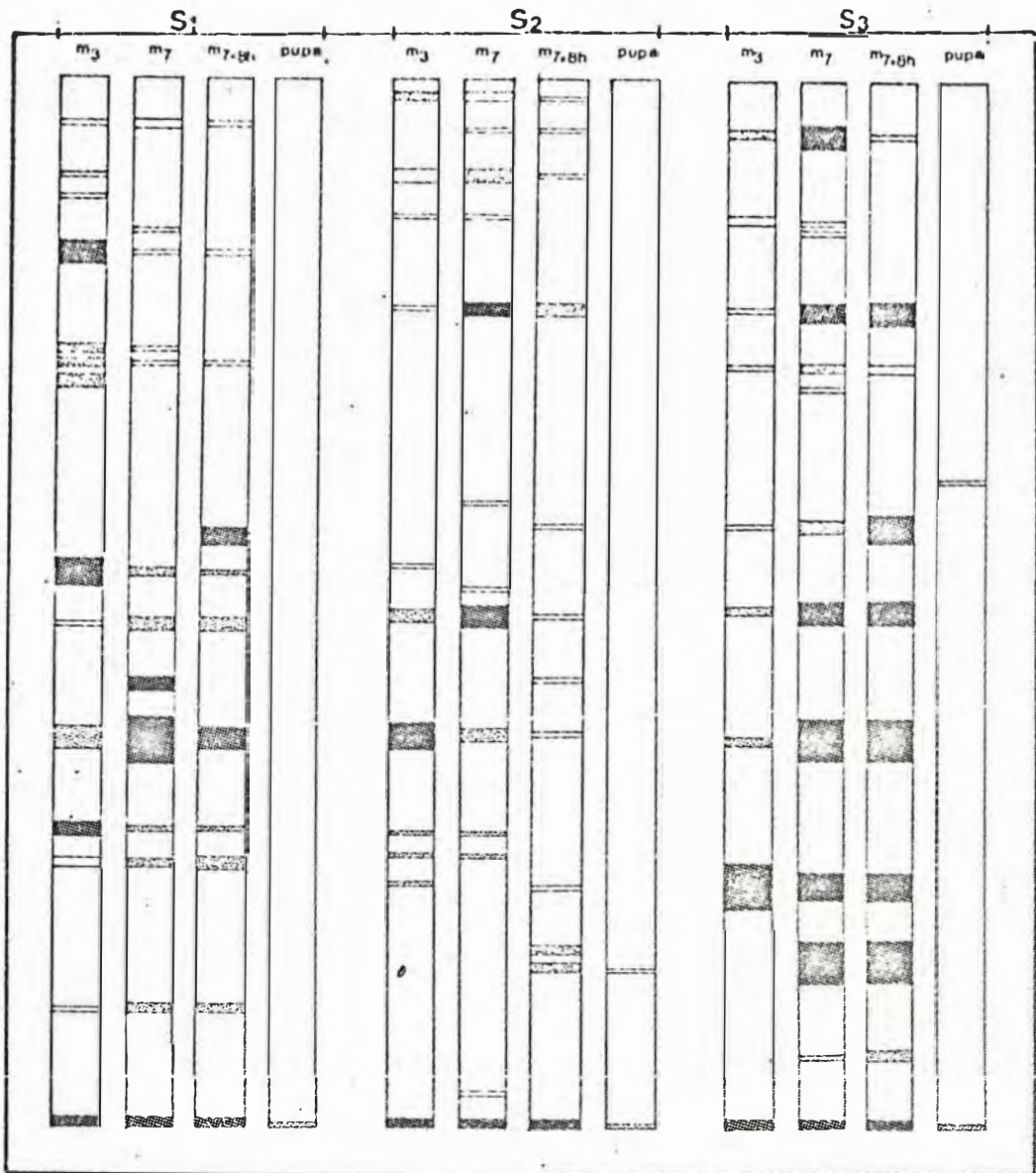


Fig.9 - Diagrama demonstrativo das frações eletroforéticas, detectadas por fluorografia, que variaram de modo evidente e reprodutível segundo as diferentes idades larvais. Está também representado o fluorograma correspondente a idade de pupa, para mostrar que quase todas as frações eletroforéticas deixam de ser detectadas por sua radioatividade.

- - bandas fortes (I)
- ▨ - bandas médias (II)
- - bandas fracas (III)

Foram registradas 16 variações em S_1 , 19 em S_2 e 12 em S_3 . Mesmo sem recurso a métodos eletroforéticos de maior resolução, é provável que se demonstre maior número de variações do que este se for evitada a sobrecarga, perceptível nas fotografias das raias correspondentes as regiões glandulares S_1 e S_3 .

IV. D I S C U S S Ã O

Os padrões eletroforéticos coloridos, obtidos em gel homogêneo, em uma só dimensão, quase não variam quando se analisa a mesma região glandular nas diferentes idades estudadas (BEEN e RASCH, 1972; LAICINE, 1972; TOLEDO FILHO, YANG e PAVAN, 1972). Há diferenças claras entre regiões glandulares diferentes na mesma idade, mas, para a mesma região, o padrão eletroforético é bastante uniforme ao longo do desenvolvimento. Embora seja alta a sensibilidade da coloração com Coomassie Blue, a capacidade de discriminação do sistema é evidentemente baixa, se se leva em conta a complexidade do material estudado. As bandas evidenciadas nos géis devem, seguramente, corresponder a misturas de polipéptides de mobilidade semelhantes, de modo que variações qualitativas consideráveis podem passar despercebidas. Além disso, para cada uma das regiões glandulares, o sistema utilizado não distingue proteínas formadas em uma certa idade de outras provindas de idades anteriores, ou mesmo, de outras regiões da glândula. Também não distinguiria frações que possam ser tomadas da hemolinfa.

Por outro lado, o perfil de radioatividade devida à incorporação de aminoácidos marcados apresenta variações nítidas segundo a idade na mesma região glandular. Os resultados aqui apresentados para *Bradysia hygida* são semelhantes aos obtidos

por TISSIÈRES, MITCHELL e TRACY (1974) no tocante ao período pré-pupal em *Drosophila*. Também em *Rhynchosciara* estão sendo demonstradas variações no perfil de síntese de proteínas durante o período pré-pupal. WINTER, BIANCHI, TERRA e LARA (1976) relatam que ao atingir o pufe B₂B máxima expansão na região anterior da glândula salivar de *R.americana*, ocorre a síntese de dois novos polipeptídeos, cuja radioatividade ainda aumenta com o tempo, para declinar mais tarde e ser sucedida pela de uma terceira fração nova. Experimentos aqui não relatados mostram que ao suprimir-se o desenvolvimento dos pufes de DNA em *Bradyzia hygida*, pela administração de hidroxiurêia em idade apropriada, obtêm-se modificações consideráveis e reprodutíveis no perfil de síntese de proteínas da glândula salivar.

O conjunto de tais resultados indica claramente que o tipo de abordagem que procuramos estudar no presente trabalho é promissor no tocante à investigação do papel dos pufes cromossômicos no desenvolvimento da glândula salivar, embora se encontre ainda em fase incipiente. As informações existentes não permitem distinguir em que medida as modificações do perfil de síntese de proteínas da glândula salivar durante o período pré-pupal se devem à utilização de mensageiros pré-existentes aos pufes cujo aparecimento com elas coincide, e em que medida resultam de modificações no perfil de transcrição. Diversos trabalhos em quironomídeos (DOYLE e LAUFER, 1969; CLEVER, STORBECK

e ROMBALL, 1969; CLEVER, 1969; CLEVER, 1972) mostraram que a incorporação global de aminoácidos pela glândula salivar não é sensível à actinomicina D se esta for administrada depois de breve período inicial do último estadio larval. Esses trabalhos indicam que RNAs mensageiros nesse material podem, de fato, ter longevidade considerável, mas não excluem que tenham ocorrido, sob a ação do antibiótico utilizado, variações qualitativas cuja somatória global simule inalteração na síntese de proteínas. O estudo do efeito de inibidores da síntese de RNA sobre o perfil de síntese de proteínas em glândulas salivares de dípteros restringe-se, por enquanto, às modificações induzidas por choque térmico (LEWIS, HEMLSING e ASHBURNER, 1975) e ainda não foram extendidas às que ocorrem ao longo do desenvolvimento normal.

A mera coincidência no tempo entre aparecimento de pufes cromossômicos e modificações no perfil de síntese de proteínas não constitui mais do que evidência circunstancial para uma relação causal entre os dois tipos de eventos. Por outro lado, é possível inibir seletivamente e com variada intensidade uma classe de pufes cromossômicos - os pufes de DNA - em sciarídeos (SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971) e essa inibição pode ser conseguida por vários agentes (RIBEIRO e SAUAIA, 1975; ALMEIDA e SAUAIA, 1975). Além disso, os pufes de DNA de *Bradysia hygida* obedecem a certo grau de especificidade segundo o tipo celular.

(ALVES e SAUAIÁ, 1975) e é possível modificar diferentemente o comportamento de diferentes pufes de DNA (da COSTA e SAUAIÁ, não publicado). Assim, se é improvável que se consigam mais que evidências circunstanciais através de sistemas que estudem pufes cromossômicos e proteínas específicas, também é verdadeiro que tais evidências poderão ser refinadas a ponto de adquirirem em seu conjunto peso considerável.

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram comparados qualitativamente os perfis eletroforéticos de extratos totais das três regiões da glândula salivar de *Bradysia hygida* (Diptera Sciaridae) em três idades diferentes do período pré-pupal e empupa jovem. A eletroforese foi feita em gel homogêneo de poliacrilamida em uma só dimensão segundo o método de LAEMMLI (1970). Foram também estudados, nas mesmas condições, por fluorografia, os perfis de síntese de proteína depois de administração, por injeção, de mistura de aminoácidos ^{14}C .

Os padrões eletroforéticos coloridos, embora diferentes segundo a região glandular quase não variam nas diversas idades estudadas. Ao contrário, descobrem-se muitas variações reprodutíveis nos perfis fluorográficos.

Esses resultados mostram que ao longo do período pré-pupal em *B. hygida*, o perfil de síntese de proteínas apresenta claras modificações. Discutem-se as implicações desses resultados no tocante à investigação a respeito do papel dos pufes de DNA.

VI. SUMMARY AND
CONCLUSIONS

The electrophoretic patterns of total extracts from three regions of the salivary gland of *Bradysia hygida* (Diptera Sciaridae) were qualitatively compared at three ages during the pre-pupal stage and at the age of young pupa. The electrophoresis was carried out in homogeneous polyacrylamide gels, in one dimension, according to the method of LAEMMLI (1970). The patterns of protein synthesis were also studied (BONNER e LASKEY, 1974) under the same conditions, after the administration by injection of a mixture of ^{14}C -aminoacids.

The stained electrophoretic patterns, although different for different gland regions, show almost no variation at different ages. The fluorographic patterns, however, exhibit many reproducible changes according to age.

These results indicate that, throughout the pre-pupal period in *B. hygida*, the patterns of protein synthesis undergo definite modifications. The implications of this observation for the study of the role of the DNA puffs is discussed.

VII. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.C. de e SAUAIA, H. (1975).

Efeito da 5-bromodeoxiuridina sob o desenvolvimento dos pufes de DNA.

Ciência e Cultura, 27(7): 247.

ALVES, M.A.R. (1975).

Cromossomas politênicos de *Bradysia hygida*: Especificidade do padrão de pufes de DNA segundo o tipo celular.

Dissertação de Mestrado - Fac.Med.Rib.Prêto.

ALVES, M.A.R. e SAUAIA, H. (1975).

Especificidade dos padrões de formação dos pufes de DNA segundo o tipo celular.

Ciência e Cultura, 27(7): 245.

ASHBURNER, M. (1970).

Function and structure of polytene chromosomes during insect development.

Adv.Insect.Physiol., 7:2.

ASHBURNER, M. (1972).

Patterns of Puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*.

VI. Induction by ecdysone in salivary glands of *D. melano-*

gaster cultured in vitro.

Chromosoma, 38: 255.

BAUDISCH, W. und PANITZ, R. (1968).

Kontrolle eines biochemischen Merkmals in den Speicheldrüsen von *Acricotopus lucidus* durch einen Balbiani-Ring.

Exptl.Cell.Res. 49: 470.

BEEN, A.C. and RASCH, E.M. (1972).

Cellular and secretory proteins of the salivary glands of *Sciara coprophila* during the larval-pupal transformation.

J.Cell.Biol. 55: 420.

BEERMANN, W. (1952).

Chromomerenkonstanz und Spezifische Modifikation der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*.

Chromosoma, 5: 139.

BEERMANN, W. (1961).

Ein Balbiani-Ring als Locus einer Speicheldrüsen-mutation.

Chromosoma, 12: 1.

BERENDES, H.D. (1967).

The hormone ecdysone as effector of specific changes in the pattern of gene activities of *Drosophila hydei*.

Chromosoma, 22: 274.

BONALDO, M.F., FLOETER, M.L., TOLEDO, S.M. de and LARA, F.J.S. (1976).

Characterization of the RNA transcribed from a "DNA puff"
Ciência e Cultura, 28(7): 264.

BÖNNER, 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.

BREUER, M.E. e 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.

BREUGEL, F.M.A. van (1966).

Puff induction in larval salivary gland chromosomes of *Drosophila hydei* Sturtevant.
Genetica, 37: 17.

CLEVER, U. (1961).

Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von *Chironomus tentans* und ihre Beziehungen zur Entwicklung. I. Genak-

tivierungen durch Ecdyson.

Chromosoma, 12: 607.

CLEVER, U. (1969).

Chromosome activity and cell function in polytenic cells.
II. The formation of secretion in the salivary glands cells
of *Chironomus*.

Exptl.Cell.Res. 55: 317.

CLEVER, U. (1972).

Molecular genetic mechanisms in development and aging. Ed.
Rookstein and Baker III pāg. 33. Acad.Press.

CLEVER, U. und KARLSON, P. (1960).

Induktion von Puff-veränderungen in den Speicheldrüsenchro-
mosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson.

Exptl.Cell.Res. 20: 263!

CLEVER, U., STORBECK, I. and ROMBALL, C.G. (1969).

Chromosome activity and cell function in polytenic cells.
I. Protein synthesis at various stages of larval development.

Exptl.Cell.Res. 55: 306.

CROUSE, H.V. (1968).

The role ecdysone in DNA-puff formationa and DNA synthesis
in the polytene chromosomes of *Sciara coprophila*.

Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 61: 971.

CROUSE, H.V. and KEYL, H.G. (1968).

Extra replications in the "DNA-puffs" of *Sciara coprophila*.
Chromosoma, 25: 357.

DOYLE, D. and LAUFER, H. (1969).

Requirements of ribonucleic acid synthesis for the formation of salivary gland specific proteins in larval *Chironomus tentans*.

Exptl.Cell.Res. 57: 205.

EDSTRÖM, J.E. (1974).

Polytene chromosomes in studies of gene expression in: The Cell Nucleus. vol. II Ed. Busch. Acad. Press.

EDSTRÖM, J.E. and LAMBERT, B. (1975).

Gene and information diversity in eucaryotes.

Prog.Biophys.Molec.Biol., 30: 57.

FICQ. A. and PAVAN, C. (1957).

Autoradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of development.

Nature, 180: 893.

GABRUSEWYCS-GARCIA, N. (1964).

Cytological and autoradiographic studies in *Sciara coprophila* salivary chromosomes.

Chromosoma, 15: 312.

GABRUSEWYCS-GARCIA, N. (1971).

Studies in polytene chromosomes of sciarids.

Chromosoma, 33: 421.

GROSSBACH, U. (1969).

Chromosomen-Aktivität und Biochemische Zelldifferenzierung
in den Speicheldrüsen von *Camptochironomus*.

Chromosoma, 28: 136.

GROSSBACH, U. (1973).

Chromosome puffs and gene expression in polytene cells.

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 38: 619.

HOSICK, H. and DENEHOLT, B. (1974).

Isolation and characterization of polysomes from *Chironomus*
salivary glands.

Cell. Differentiation 3: 273.

KRIDER, H.M. and PLAUT, W. (1972).

Studies on nucleolar RNA synthesis in *Drosophila melanogaster*.

J. Cell. Sci. II, 675.

LAEMMLI, U.K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the
head of Bacteriophage T₄.

Nature, 227: 680.

LAEMMLI, U.K. and FAVRE, M. (1973).

Maturation of the head of Bacteriophage T₄.

J.Mol.Biol. 80: 575.

LAICINE, E.M. (1972).

Efeito da inibição da síntese de DNA sobre a glândula salivar de *Bradysia hygida*.

Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

LARA, F.J.S., TAMAKI, H. and PAVAN, C. (1965).

Laboratory culture of *Rhynchosciara angelae*.

Amer.Natur., 99: 189.

LASKEY, R.A. and MILLS, A.D. (1975).

Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrylamide gels by fluorography.

Eur.J.Biochem. 56: 335.

LEWIS, M., HELMSING, P.J. and ASHBURNER, M. (1975).

Parallel changes in puffing activity and patterns of proteins synthesis in salivary glands of *Drosophila*.

Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 72: 3604.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951).

Protein measurements with Folin phenol reagents.

J.Biol.Chem., 193: 265.

MAURER, H.R. (1971).

Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis.

Ed.Fischbeck - Pāg. 1 - Walter de Gruyter.

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.U.S.A., 70: 1117.

PANITZ, R. (1967).

Funktionelle Veränderungen an den Riesenchromosomen nach Behandlung mit Gibberellinen.

Biol.Zentralb. (Suppl.) 86: 147.

PAVAN, C. and Da CUNHA, A.B. (1969a).

Gene amplification in ontogeny and phylogeny of animals.

Proc.Symp.Nuclear Physiol and Differentiation.

Belo Horizonte. Genetics 61(1): 289.

PAVAN, C. and Da CUNHA, A.B. (1969b).

Chromosomal activities in *Rhynchosciara* and other sciaridae.

A.Rev.Genetics, 3: 425.

PERONDINI, A.L.P. and DESSEN, E.M. (1969).

Heterozygous puffs in *Sciara ocellaris*.

Proc.Symp.Nuclear.Physiol. and Differentiation.

Belo Horizonte. Genetics, 61(1): 251.

RANDERATH, R. (1970).

An evaluation of film detection methods for weak β -emitters, particularly tritium.

Anal.Biochem., 34: 188.

RIBEIRO, W.R. e SAUAIA, H. (1975).

Inibição do desenvolvimento dos pufes de DNA pelo 2,3-diidro-1H-imidazo (1,2-b) pirazol.

Ciência e Cultura, 27(7): 245.

RITOSSA, F.M. (1962).

A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*.

Experientia, 18: 571.

RITOSSA, F.M. (1964).

Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*

Exptl.Cell.Res. 35: 601.

RUDKIN, G.T. and CORLETTE, S.L. (1957).

Disproportionate synthesis of DNA in a polytene chromosome region.

Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 43: 964.

SAUAIA, H. (1971).

Cromossomas politênicos de *Bradysia hygida*. Inibição do desenvolvimento dos pufes de DNA pela hidroxaurêia.

Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

SAUAIÁ, H. and ALVES, M.A.R. (1968).

A description of a new species of *Bradysia* (Diptera, Sciasidae).

Pap. Avul. Zool., 22: 85.

SAUAIÁ, 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.

SPRADLING, A., PENMAN, 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.

STUDIER, F.M. (1973).

Analysis of Bacteriophage T₇ early RNAs and proteins on slab gels.

J. Mol. Biol., 79: 237.

TISSIÈRES, A., MITCHELL, H.R. and TRACY, U.M. (1974).

Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*.

gaster: Relation to chromosome puffs.

J.Mol.Biol. 84: 389.

TOLEDO FILHO, S.A., YANG, S.H, e PAVAN, C. (1972).

Proteínas durante o desenvolvimento de *Rhynchosciara*.

Ciência e Cultura, 24(6): 184.

WINTER, C.E., BIANCHI, A.G. de, TERRA, W.R. e LARA, F.J.S. (1976).

Padrão de síntese proteica em glândulas salivares de *Rhynchosciara* no fim da vida larval.

Ciência e Cultura, 28(7): 264.

WOBUS, U., SERFLING, E. and PANITZ, R. (1971).

Salivary gland proteins of a *Chironomus thummi* strains with a additional Balbiani ring.

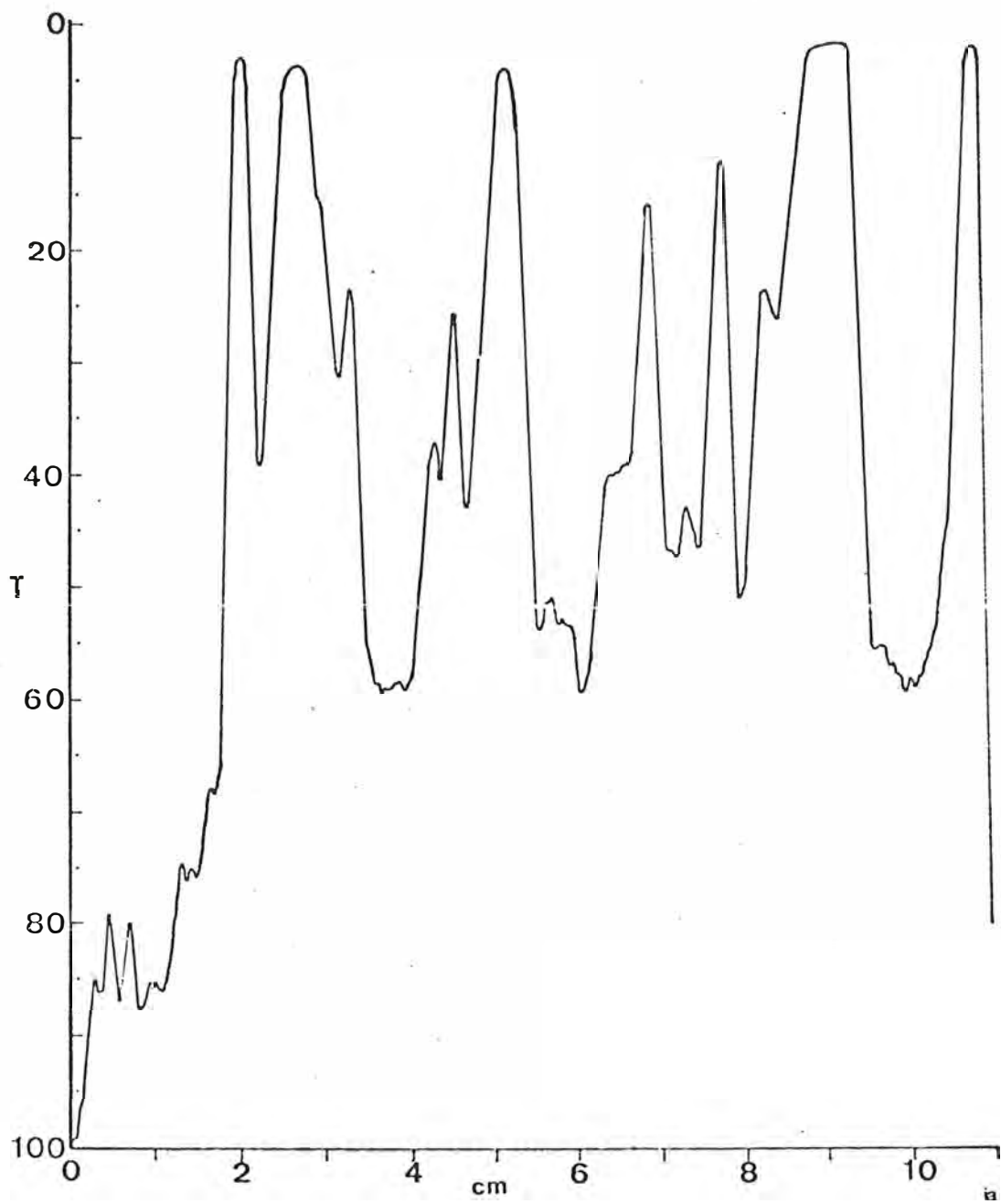
Exptl. Cell.Res., 65: 240.

Apêndice

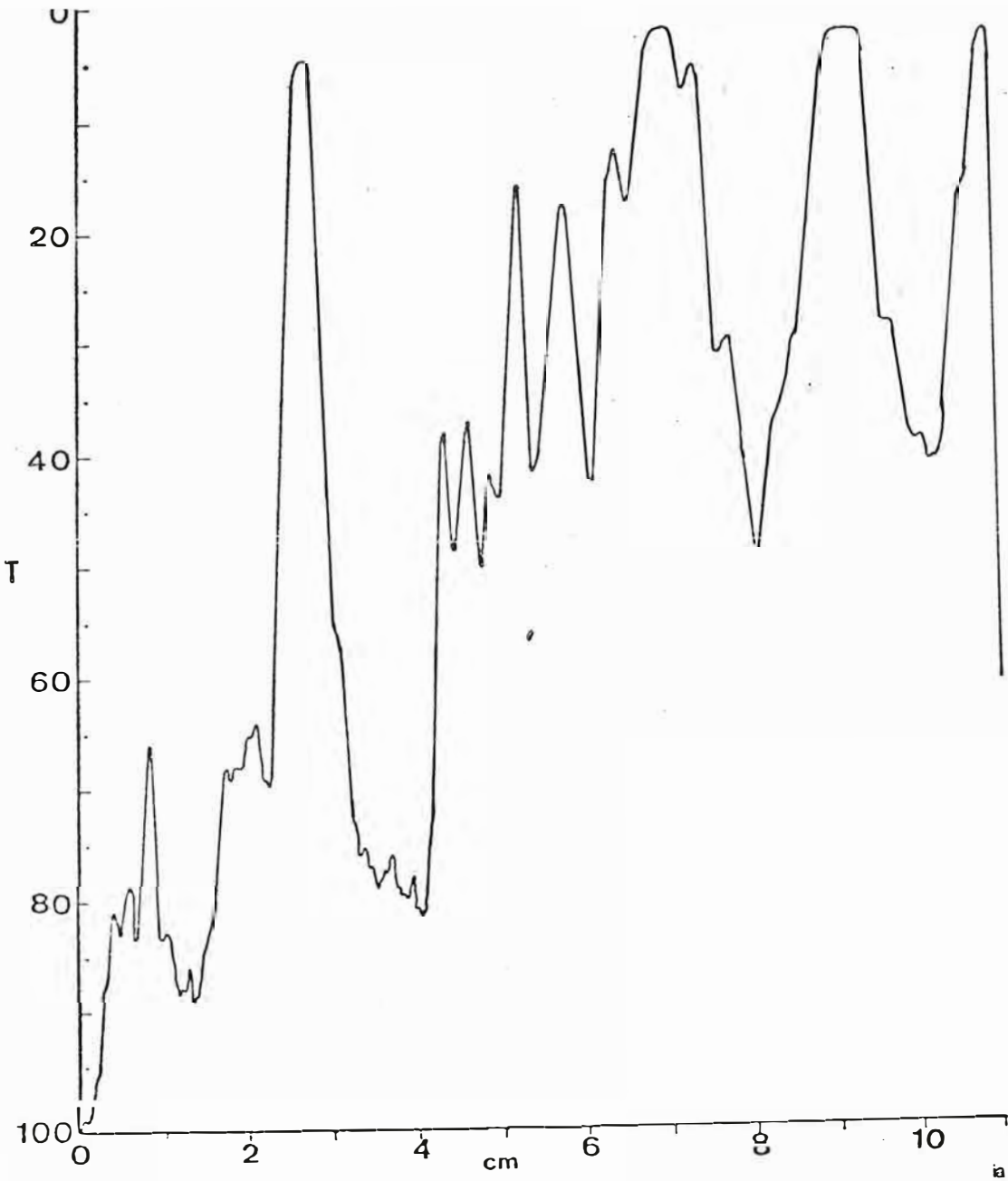
Traçados da transmissão dos fluorogramas

Região S₁

m₃

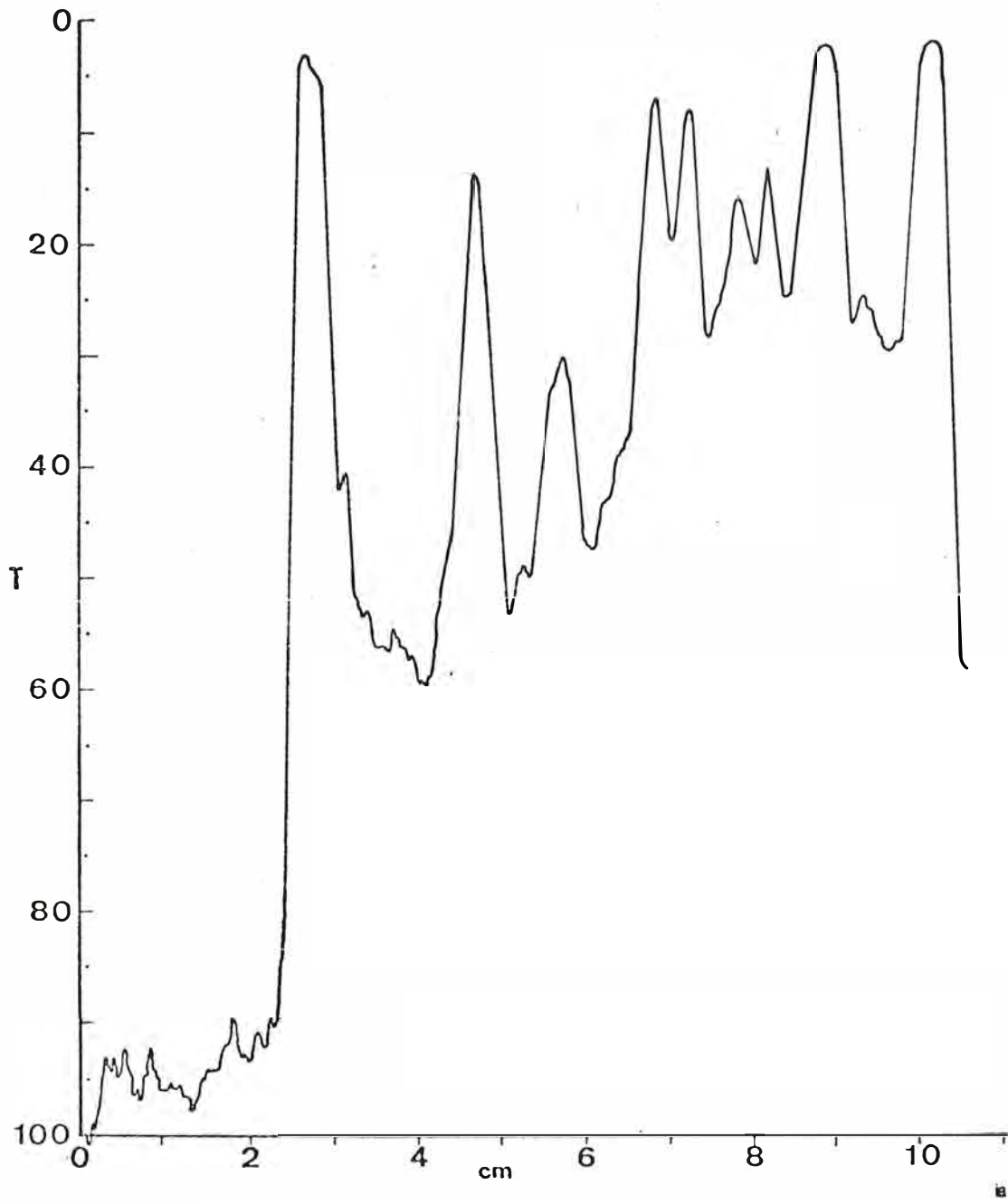


Região S₁
m₇

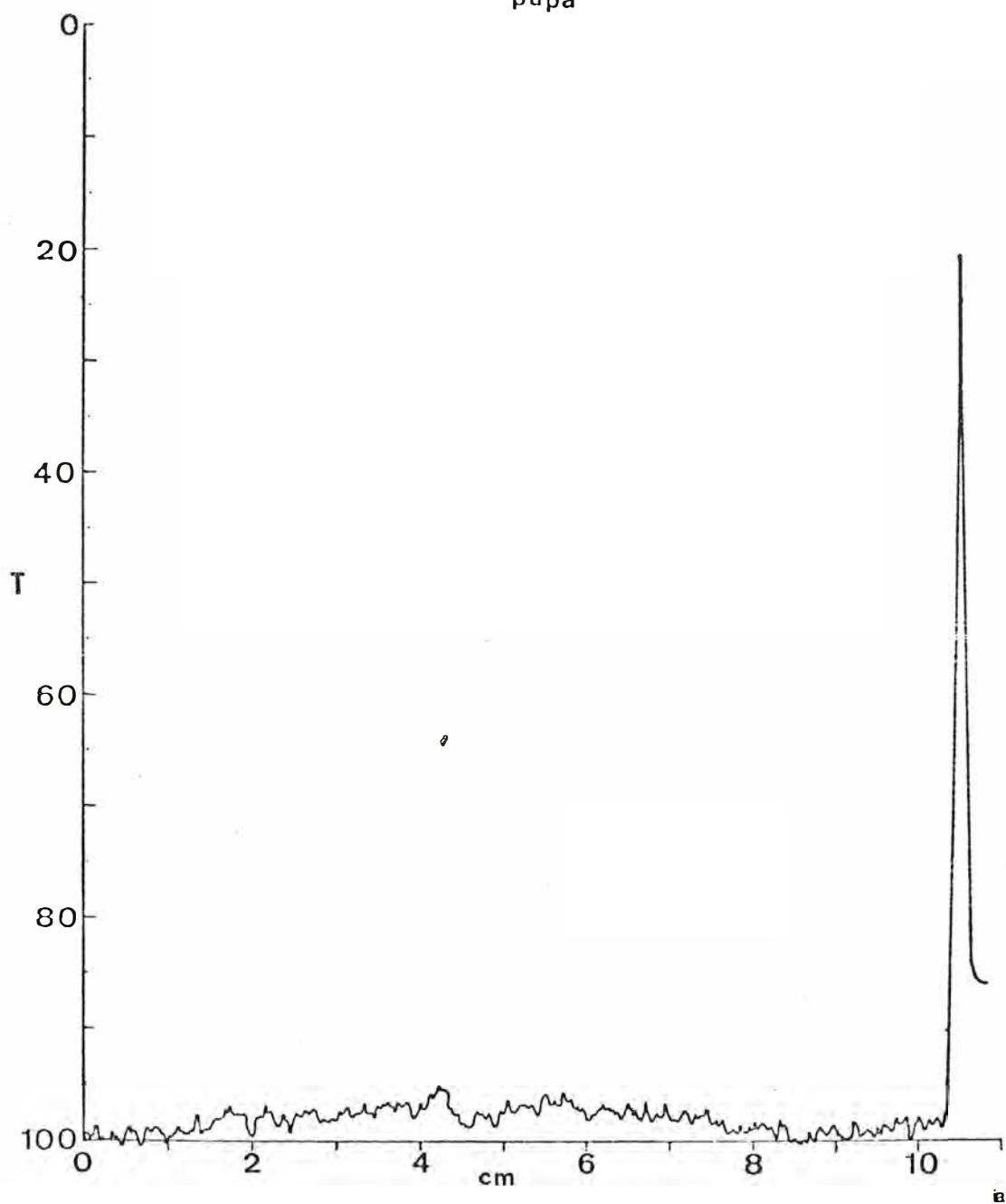


Região S1

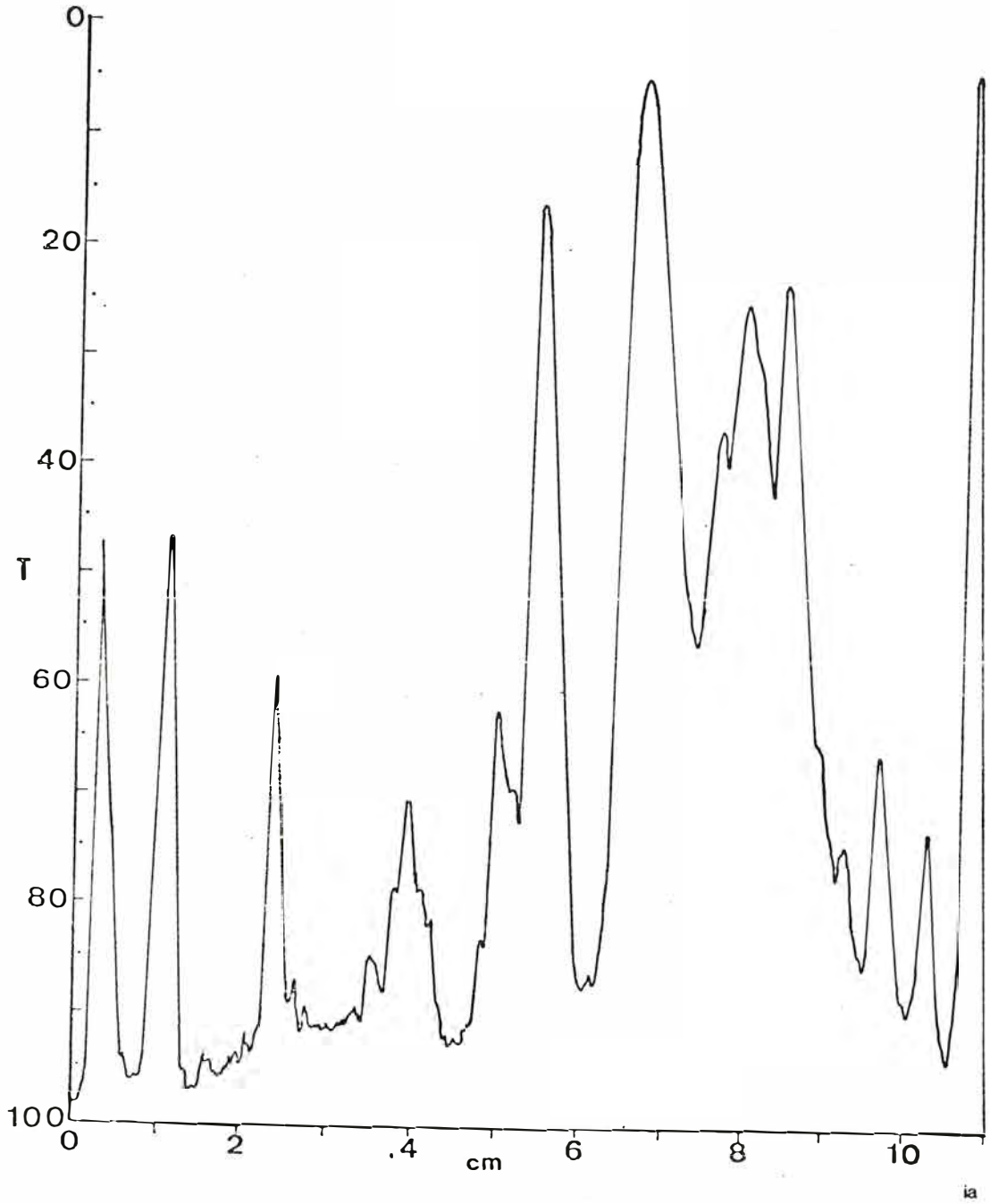
m_{7+8h}



Região S₁
pupa

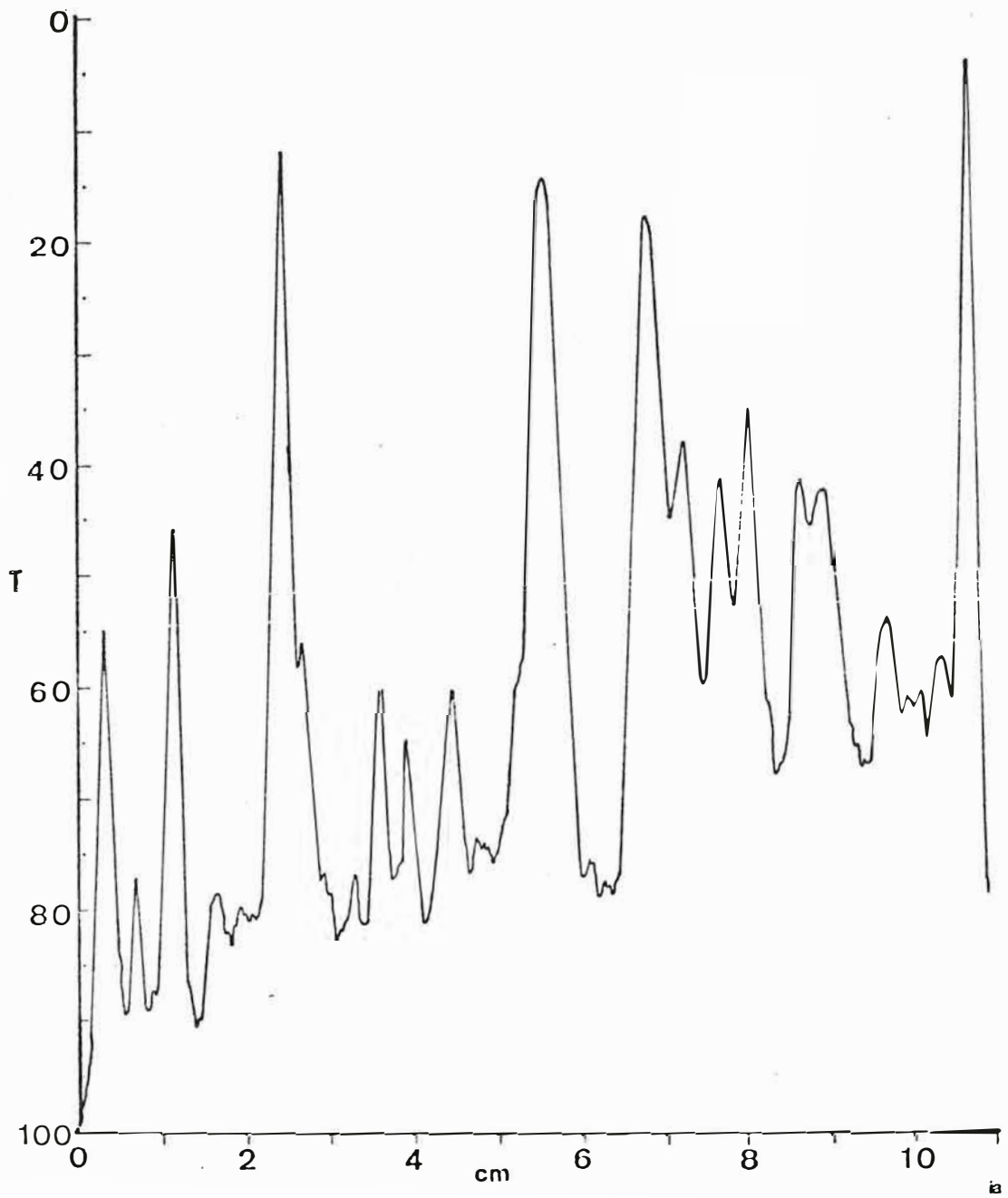


Região S₂
m₃



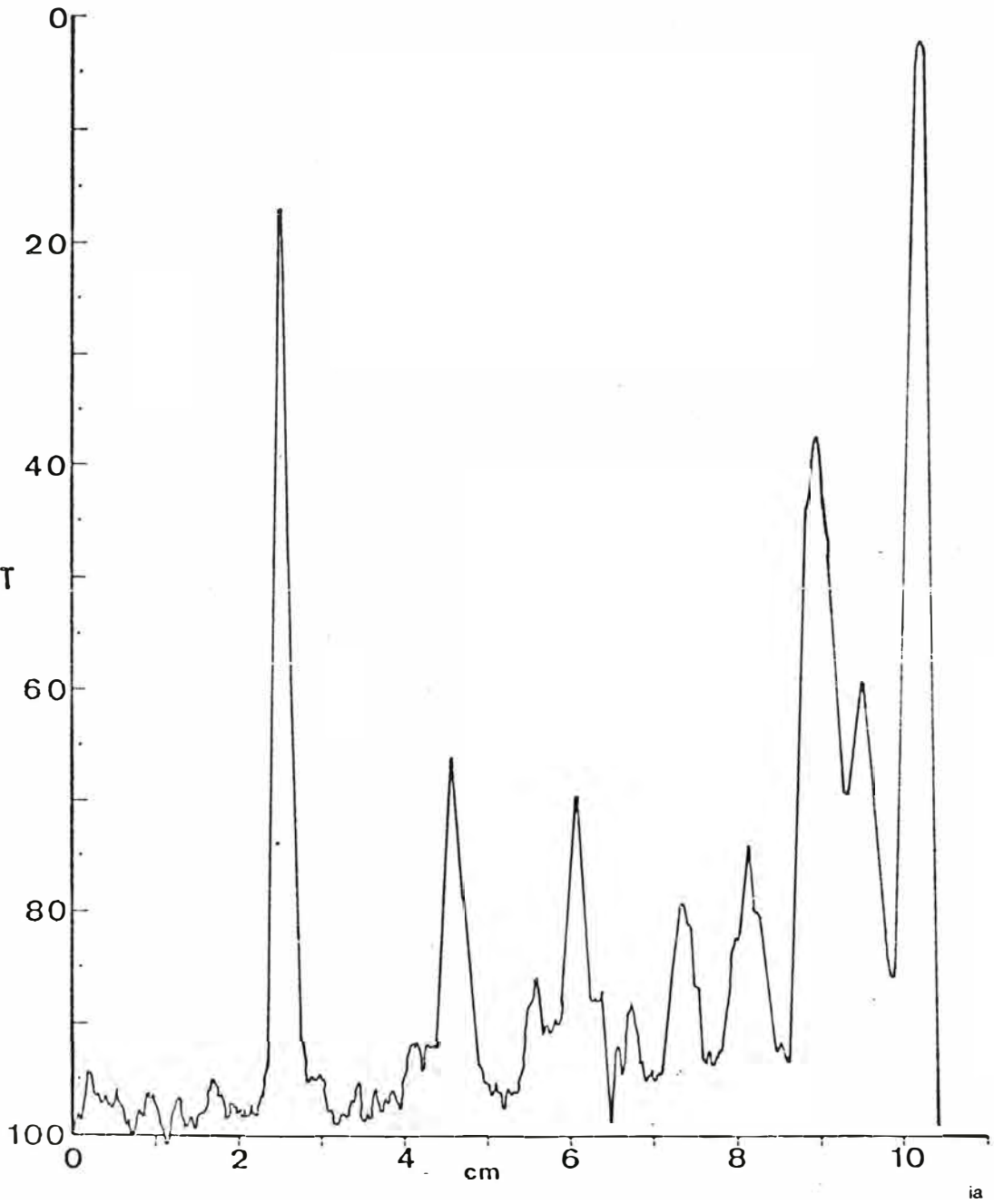
Região S₂

m₇

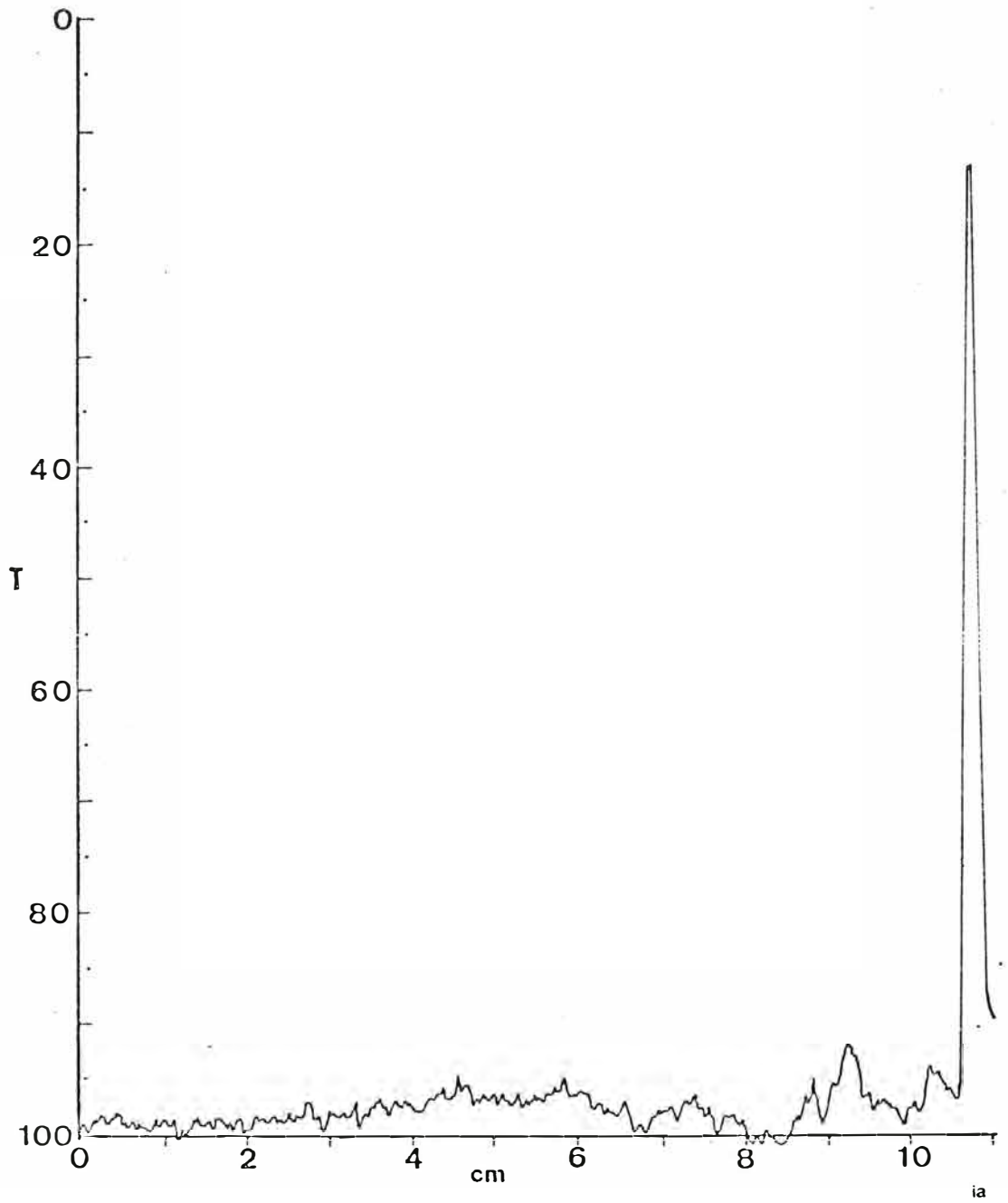


Região S₂

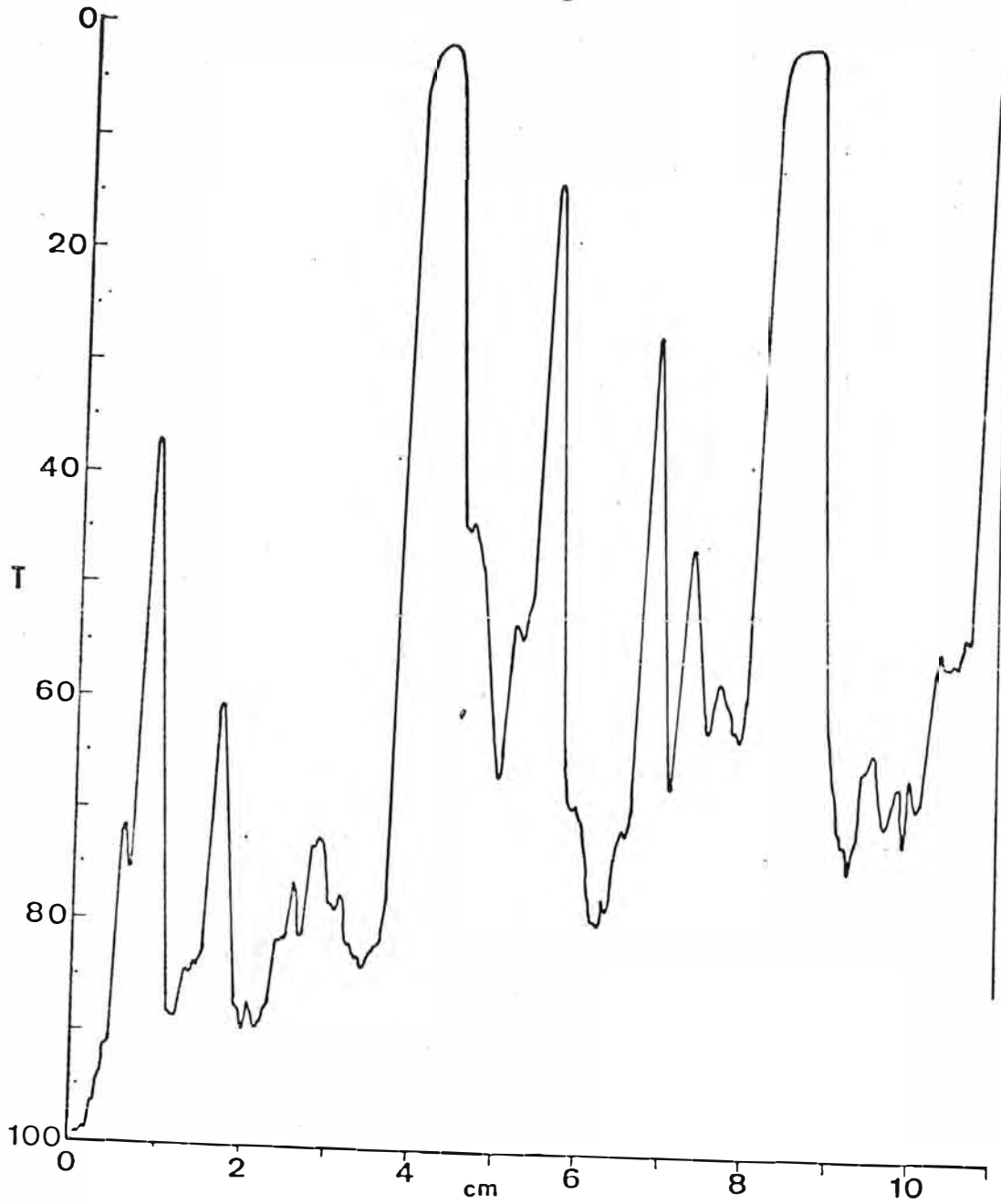
m_{7+8h}



Região S₂
pupa

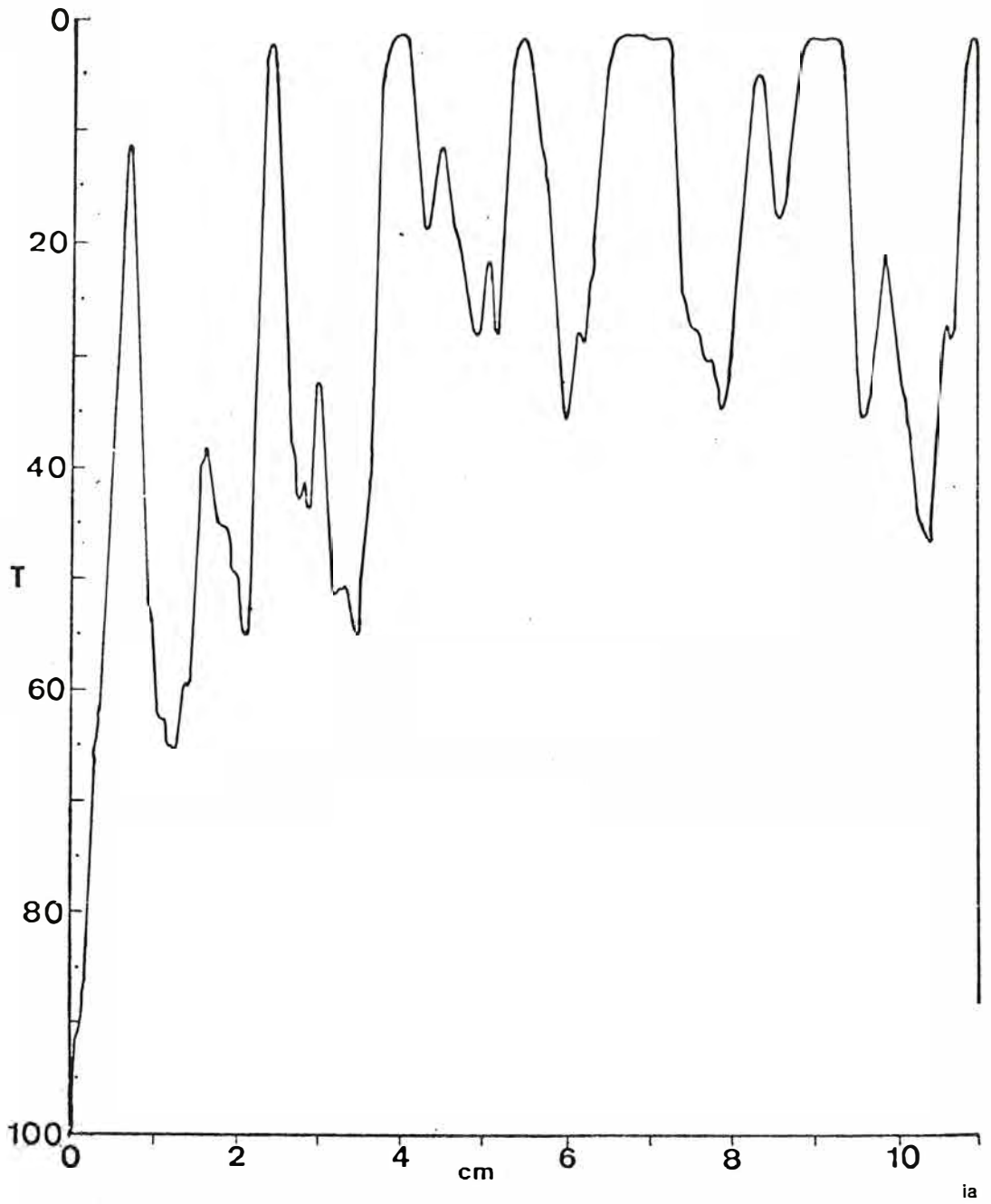


Região S₃
m₃



Região S₃

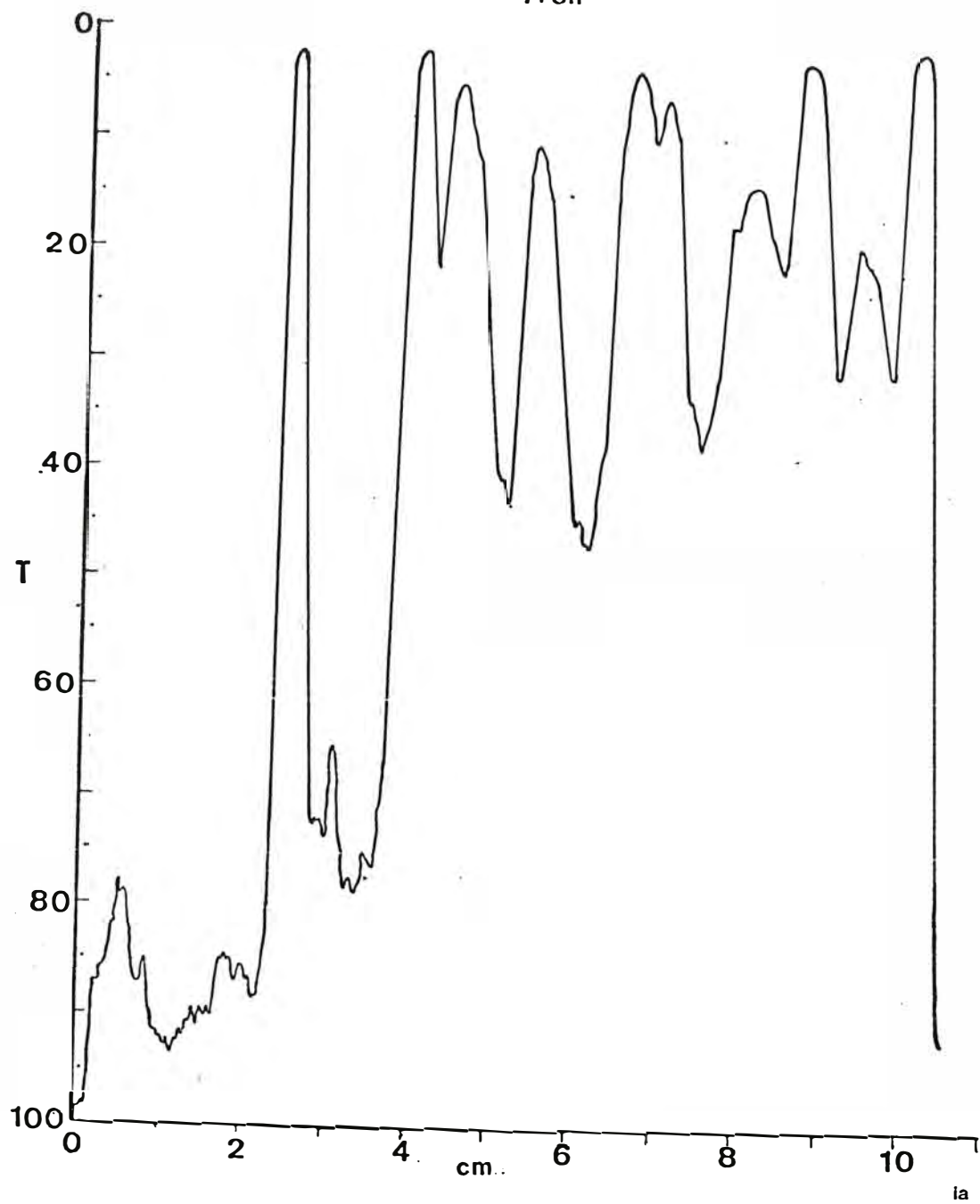
m₇



ia

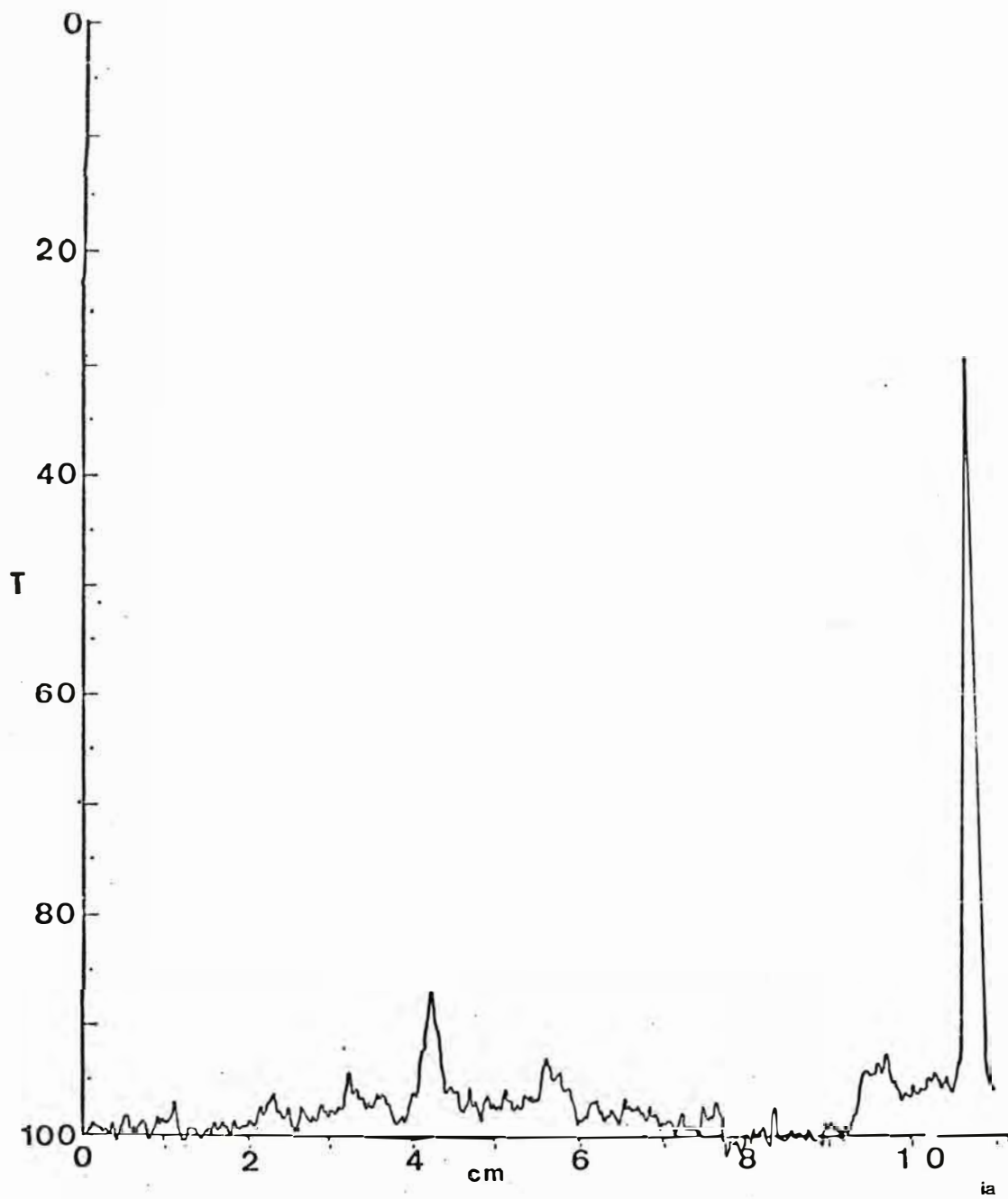
Região S₃

m_{7+8h}



Região S₃

pupa



Região S₃

pupa

