

ANA LÚCIA PEREIRA MONTEIRO 764

CONCENTRAÇÃO CRÍTICA DE ELETRÓLITOS EM
CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DE *Trichosia*
pubescens (DIPTERA: SCIARIDAE)

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Biologia Celular.
Departamento de Biologia Celular, Ins-
tituto de Biologia, Universidade Es-
ta dual de Campinas - UNICAMP.

Orientadora: Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Campinas

-1993-

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
ANA LÚCIA PEREIRA
MONTEIRO
e aprovada pela Comissão Julgadora.

M764c

19788/BC

[Handwritten signature]

[Small rectangular stamp]

Ao meu pai (sempre presente), à minha mãe,
ao Eduardo e às minhas irmãs
que souberam compreender
a minha determinação.

AGRADECIMENTOS

No decorrer da elaboração deste trabalho pude contar com a contribuição de muitas pessoas. Assim, agradeço de forma muito carinhosa e especial à Prof^a Dra. Maria Luiza Silveira Mello pela sua orientação e pelo grande impulso dado na minha vida científica. Com muita estima e admiração ao Prof. Dr. José Mariano Amabis por ter cedido gentilmente o seu laboratório, oferecendo todas as condições necessárias para a execução deste trabalho, como o fornecimento das larvas de *Trichosia pubescens*, drogas e equipamentos. Com grande respeito e consideração ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal por suas valiosas idéias e sugestões. A contribuição dada pela Prof^a Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel com a leitura da tese e sugestões. A oportunidade oferecida pelo Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP para o desenvolvimento de minhas atividades didático-científicas, juntamente com os professores e funcionários. A eficiência e a dedicação do Prof. Hernandes F. de Carvalho na confecção das tabelas aqui apresentadas. O convívio diário e a amizade recebida pelos funcionários e alunos da pós-graduação do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP. O empenho e o interesse dispensado pelos companheiros Paulinho, Luís Paulo, Eduardo Gorab, Christiane, Silvana, Lourdes e Vanildo do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP durante a realização deste trabalho. A grande colaboração dada pela Carmen e pelo Prof. Dr. George John Shepherd do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP, os quais tornaram possível a impressão a laser deste trabalho. A amizade e o empenho recebidos da Prof^a Dra. Maria Tercília de V. Azeredo-Oliveira, Prof^a Dra. Rosilux Paques de Barros Pacheco e ao Prof. Dr. Samir Felício Barcha do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP. Pelo grande apoio e compreensão, principalmente nesses últimos tempos, da Patrícia, Silvy, Lino, Luís e Daniela, além da amizade compartilhada. À entidade financiadora CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado e ao CNPq pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

Introdução.....	01
- Cromossomos politênicos como modelo para estudos citoquímicos de complexos nucleoprotéicos "in situ".....	02
- Basofilia metacromática e concentração crítica de eletrólitos (CEC).....	06
- Breve descrição dos cromossomos politênicos de <i>Trichosia pubescens</i> (Diptera:Sciaridae).....	10
- Objetivos.....	13
 Material e Métodos.....	14
Material.....	15
Métodos.....	18
- Dissecção das larvas.....	18
- Preparações Citológicas.....	18
1- Fixação e Processamento.....	18
1.1. Fixação em etanol-ácido acético(3:1).....	18
1.2. Fixação em paraformaldeído.....	19
2- Citoquímica.....	20
- Fotomicrografias.....	21
 Resultados.....	22
- Material fixado em etanol-ácido acético.....	23
- Material fixado em paraformaldeído 1.75%.....	47
 Discussão.....	51
- CEC de bandas e interbandas de cromossomos politênicos de <i>Trichosia pubescens</i>	52

1- CEC em regiões de pufes de RNA e DNA.....	54
2- CEC de regiões heterocromáticas e/ou sub-replicadas.....	60
3- O papel do tratamento com RNase nos dados de CEC.....	62
4- CEC em preparados fixados em paraformaldeído a 1.75%	65
5- Dados de CEC após utilização de variante do método	66
- Grânulos metacromáticos.....	67

Conclusões.....	70
------------------------	-----------

Resumo.....	74
--------------------	-----------

Abstract.....	77
----------------------	-----------

Referências Bibliográficas.....	80
--	-----------

Anexos.....	99
--------------------	-----------

INTRODUÇÃO

Cromossomos Politênicos como modelo para estudos citoquímicos de complexos nucleoprotéicos "in situ".

Os cromossomos gigantes do tipo politênicos constituem um bom modelo para estudos das alterações na supra-organização e composição cromatínica associadas à expressão gênica, ao nível de microscopia de luz. Essas alterações ocorrem ao longo do desenvolvimento, com a diferenciação, em resposta a hormônios e a diversos agentes estressantes (ASHBURNER, 1978; revisão KORGE, 1987).

Estes cromossomos, inicialmente estudados nas glândulas salivares de *Chironomus* por BALBIANI, KORSCHOLT e CARNOY nos anos de 1880, e redescobertos por E. HEITZ e H. BAUER em 1933 (WHITE, 1977), ocorrem principalmente em glândulas salivares de larvas de dípteros, embora possam ser encontrados em outros tecidos somáticos destes insetos (RUDKIN, 1972), e em outros organismos, como ciliados (ALONSO & PEREZ-SILVA, 1965), colembolídeos (CASSAGNAU, 1968) e mesmo plantas (NAGL, 1969; CAVALHEIRA & GUERRA, 1991).

Os cromossomos politênicos resultam de sucessivas replicações sem separação das cromátides (RUDKIN, 1972), sendo constituídos por dezenas a centenas de filamentos distribuídos paralelamente entre si e ao longo dos quais existe uma variação na quantidade de DNA e de proteínas histônicas. As regiões de maior concentração de DNA e histonas são denominadas de cromômeros e as regiões de menor concentração, de intercromômeros. Os cromômeros, de cromossomos homólogos, geralmente pareiam entre si formando

bandas transversais contínuas, e à justaposição de intercromômeros correspondem às interbandas. O padrão de bandas e interbandas ao longo de um cromossomo politênico é uma característica específica de sua organização, permitindo que bandas individuais sejam reconhecidas (BEERMANN, 1972).

Algumas regiões dos cromossomos politênicos de dípteros se expandem no decorrer do desenvolvimento larval. Essas alterações morfológicas são geralmente reversíveis e denominadas de pufes. Os pufes são decorrentes da descondensação de bandas e/ou interbandas e envolvem intensa atividade de transcrição. A formação de pufes é a expressão morfológica detectável da ativação de genes presentes nessas bandas e/ou interbandas (BEERMANN, 1954; 1956; 1972). O padrão de pufação varia conforme o tecido e o órgão considerado, refletindo diferentes padrões de atividade gênica (BREUER & PAVAN, 1955; BEERMANN, 1956; AHSBURNER & BERENDES, 1978; revisão KORGE, 1987). Segundo BERENDES (1968), o fenômeno de pufação caracteriza-se por aumento localizado de proteínas não histônicas, desespiralização de DNA e síntese e estocagem de RNA recém-sintetizado antes de ser liberado do sítio cromossômico para o nucleoplasma.

Além dos pufes envolvidos em síntese localizada de RNA, um outro tipo de pufe vem sendo descrito exclusivamente para cromossomos politênicos de dípteros da família Sciaridae (BREUER & PAVAN, 1955; GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964; SIMÕES, 1970; SAUAIA, 1971; AMABIS, 1974). Neste tipo de pufe, descrito pela primeira vez em cromossomos de *Rhynchosciara americana* (BREUER & PAVAN, 1955; PAVAN

& BREUER, 1955), denominado de pufe de DNA, ocorre uma replicação extra e localizada de DNA, também denominada amplificação gênica. O DNA extra permanece após a regressão do pufe (PAVAN, 1965). Segundo pesquisas em diferentes sciarídeos, este DNA amplificado codificaria a transcrição de mRNA responsável pela síntese de algumas proteínas especiais, como as da secreção salivar do inseto em época específica de seu desenvolvimento larval (WINTER *et alii*, 1977a, b; De TOLEDO & LARA, 1978; WINTER *et alii*, 1980; GLOVER *et alii*, 1982; LAICINE *et alii*, 1984; ZAHA *et alii*, 1984; MILLAR *et alii*, 1985; LARA *et alii*, 1991).

As variações em composição química ao longo dos cromossomos politênicos, em diferentes espécies, tecidos e sob diferentes situações fisiológicas, têm sido demonstradas através de várias metodologias, entre as quais se incluem métodos citoquímicos. Estes métodos, que evidenciam DNA, RNA e proteínas, têm possibilitado apontar regiões cromossômicas apresentando tipos especiais de DNA, de proteínas não histônicas e de complexos DNA-proteína, bem como níveis de transcrição e amplificação gênica, tais como os achados de FICQ & PAVAN, 1957; VIDAL, 1975; 1977; MELLO & VIDAL, 1979; 1980a; BUSEN *et alii*, 1982; ELGIN *et alii*, 1988; AMABIS *et alii*, 1990; GORAB *et alii*, 1991; CUNHA & AMABIS, 1991; ANDRIOLI & AMABIS, 1991.

Muitas observações já foram realizadas em cromossomos politênicos, fazendo-se uso de métodos de basofilia relativamente simples, como em trabalhos clássicos de BEERMANN & BAHR (1954) e de PELLING (1966). Mais recentemente, novos métodos de basofilia

desenvolvidos por VIDAL e colaboradores quando aplicados a cromossomos politênicos, evidenciaram exclusivamente áreas de síntese localizada e/ou acúmulo de RNA (VIDAL, 1979) e algumas diferenças em composição nucleoprotéica ao longo dos cromossomos (VIDAL, 1975).

Dentre os novos métodos de basofilia desenvolvidos, aquele que possibilita a determinação da concentração crítica de eletrólitos em cromatina (VIDAL & MELLO, 1989; MELLO & VIDAL, 1989) não foi ainda utilizado em estudos de cromossomos politênicos. A aplicação deste método, em células epiteliais de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* e hepatócitos de ratos permitiu a distinção entre complexos nucleoprotéicos de áreas heterocromáticas e eucromáticas, avaliação da participação de RNA nas características espectrais da basofilia de áreas eucromáticas e suas alterações em função de diferentes estados funcionais do organismo (MELLO & VIDAL, 1989; AMARAL & MELLO, 1989).

Tal metodologia, se aplicada a estudo de cromossomos politênicos, talvez pudesse discriminar regiões contendo diferentes complexos DNA-proteína, localizar sítios envolvidos em intensa síntese de RNA e informar modificações nos complexos nucleoprotéicos seguindo-se a formação de pufes específicos. Além disso, se fossem considerados cromossomos de sciarídeos, pufes de DNA poderiam ser também analisados.

Basofilia Metacromática e Concentração

Crítica de Eletrólitos (CEC)

A basofilia resulta de interações eletrostáticas entre moléculas de um corante catiônico com grupos aniônicos de um substrato. Dentre os corantes mais utilizados em estudos de basofilia nuclear destaca-se o azul de toluidina. Este corante tiazínico, em baixas concentrações (ex.: 0.025%), pH entre 3.4 e 4.0 e temperatura ambiente, se liga eletrostaticamente a grupos fosfatos livres dos ácidos nucleicos (revisões em LISON, 1960; MELLO, 1976; VIDAL, 1987).

Diz-se que substratos corados com azul de toluidina exibem basofilia metacromática quando o pico principal de sua curva espectral de absorção aparece deslocado para comprimentos de onda mais curtos, de 580 a 546nm (hipsocromismo). Ao mesmo tempo os valores de absorbância na região de $\lambda = 625\text{nm}$ (região de pico originalmente para soluções de corante a 10^{-7}M) se encontram sensivelmente diminuídos (hipocromismo) (revisões em LISON, 1960; MELLO, 1976; VIDAL, 1987).

O fenômeno da basofilia metacromática depende diretamente do número e do grau de empilhamento das moléculas do azul de toluidina ligadas ao substrato. Quanto mais próximas estiverem as moléculas entre si, formando dímeros, trímeros, polímeros, maior será a interação de seus elétrons e mais acentuado será o hipsocromismo e o hipocromismo em $\lambda = 625\text{nm}$. Desta forma, curvas de absorção espectral com picos máximos localizados em torno de

550-570nm indicam maior proximidade dos sítios de ligações no substrato, disponíveis para se ligarem às moléculas do corante (revisão em MELLO, 1976; VIDAL, 1987)

Com base em estudos de basofilia metacromática, e utilizando-se os seus princípios, pôde ser sugerida a riqueza em lisina na proteína básica complexada ao DNA em espermatozóides de *Apis mellifera* (MELLO & VIDAL, 1973), acompanhada a substituição de proteínas histônicas somáticas por proteínas semelhantes à protamina nos espermatozóides do gafanhoto *Staurorhectus longicornis* (MELLO & VIDAL, 1977), determinadas diferenças estruturais em cromossomos politênicos de *Rhynchosciara americana* (VIDAL, 1975; MELLO & VIDAL, 1979) e de *Drosophila nebulosa* (RECCO-PIMENTEL, 1982, RECCO-PIMENTEL & MELLO, 1986) e detectadas anomalias químicas em complexos DNA-proteína de espermatozóide de touro (MELLO, 1982; BRITTO & MELLO, 1988; BELETTI & MELLO, 1991). Pôde também ser determinado o mecanismo de interação do DNA com algumas drogas, como a hancantona (MELLO et alii, 1978; SIMONI & MELLO, 1986), bem como sugerida a ativação gênica em cromocentros de *Triatoma infestans* após choque de temperatura (DANTAS, 1990).

A aplicação dos princípios da basofilia ganhou um novo dimensionamento para estudos de mudanças em composição e/ou estrutura de complexos nucleoprotéicos com os estudos sobre competição entre cátions inorgânicos e moléculas de azul de toluidina por sítios disponíveis no substrato. Isto consistiu nos princípios do método de concentração crítica de eletrólitos (CEC) para complexos nucleoprotéicos, proposto em 1989 por VIDAL & MELLO.

O método de CEC havia sido originalmente descrito por SCOTT (1960; 1970; 1973) no estudo da localização e identificação de diferentes compostos aniônicos da matriz extracelular (glicosaminoglicanos ácidos), usando como corante o azul de alcian. SCOTT (1960) considerou o valor de CEC como sendo a concentração de cátions inorgânicos, expressa em molaridade, na qual a coloração deixava de ser verificada. Isto ocorria devido a competição entre as moléculas do corante catiônico e os cátions inorgânicos pelos sítios disponíveis dos componentes aniônicos do substrato. De acordo com o tipo e as forças das cargas dos cátions inorgânicos adicionados e das afinidades dos componentes aniônicos, a coloração do substrato aparecia completamente abolida em uma certa concentração dos cátions inorgânicos (SCOTT, 1960; 1970; 1973; SCOTT & DORLING, 1965; SCOTT & STOCKWELL, 1967).

O princípio de CEC foi sugerido por VIDAL & MELLO (1989) para estudos de mudanças em composição e/ou organização dos complexos nucleoprotéicos, empregando-se o azul de toluidina, como corante catiônico, em virtude de suas bem conhecidas propriedades físico-químicas e de estereo-arranjamento (VIDAL, 1987) e Mg^{2+} como cátion inorgânico. As moléculas do azul de toluidina competem com os íons Mg^{2+} pelas ligações com grupos fosfatos disponíveis no DNA e RNA. Neste caso, a CEC é considerada como o valor da concentração de Mg^{2+} , em molaridade, no qual a metacromasia dos complexos nucleoprotéicos é completamente abolida (VIDAL & MELLO, 1989; MELLO & VIDAL, 1989; AMARAL & MELLO, 1989).

VIDAL & MELLO (1989) demonstraram, "in vitro", que a CEC

do complexo DNA/H1 era mais baixa do que a CEC do DNA puro, porém mais alta do que a do complexo DNA/protamina. Por outro lado, MELLO & VIDAL (1989) constataram que diferenças na disponibilidade de grupos fosfatos do DNA e no estado de condensação do complexo DNA/proteínas da eucromatina e heterocromatina em células de *Triatoma infestans*, "in situ", estavam associadas a diferentes valores de CEC. Além do mais, estes valores apareciam alterados em condições de "stress" como no jejum prolongado (AMARAL & MELLO, 1989).

Por ser a CEC uma metodologia sensível para detecções de diferenças ao nível de complexo DNA/proteínas (AMARAL & MELLO, 1989; MELLO & VIDAL, 1989 e VIDAL & MELLO, 1989) é de se esperar, portanto, que sua utilização para o estudo de cromossomos politênicos possa se revelar de utilidade para demonstrar diferenças em composições e/ou organização nos mesmos cromossomos durante o desenvolvimento larval.

Breve descrição dos cromossomos politênicos de
***Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae)**

A espécie *Trichosia pubescens* apresenta cromossomos politênicos de fácil identificação e com ocorrência de pufes de DNA e RNA. Além disso, os mesmos possuem características morfológicas e fisiológicas que diferem conforme as fases do desenvolvimento larval.

Os cromossomos politênicos das glândulas salivares de *Trichosia pubescens* foram denominados de A, B, C e X por AMABIS (1974), com base em estudos realizados por METZ (1935) em algumas espécies da família Sciaridae. No mapa citológico proposto por AMABIS (1974; 1983a), cada cromossomo está dividido em secções numeradas e cada secção subdividida em subsecções identificadas por letras maiúsculas (**ANEXOS 1-4**). No processo de esmagamento notam-se pontos específicos de quebra em cada cromossomo, que são interpretados como regiões sub-replicadas (AMABIS, 1974; 1983b).

AMABIS (1974) verificou em seus estudos que o cromossomo A é o mais longo, apresentando 472 faixas em 28 secções. Seu ponto específico de quebra mais frequente está entre as regiões A17C (a primeira letra indica o cromossomo, o número a secção e a letra subsequente, a subsecção) e A18A. Da região 1 até a 17 denomina-se de cromossomo A longo (Al) e da secção 18 a 28, de A curto (As) (s= short, termo em inglês). Existem ainda, nesse cromossomo, dois pontos de quebra menos frequentes: A19A/A19B e A16D/A17A (**ANEXO 1**).

O cromossomo B apresenta 417 faixas em 25 secções. As regiões B5F/B8A e B9C/B10A correspondem aos pontos específicos de quebra mais frequente. As secções B6, B7, B8 e B9 consistem em bandas espessas com diâmetro menor em relação ao das demais secções do cromossomo. Da secção 1 a 5 denomina-se o cromossomo de B curto (Bs) e da secção 6 a 25 de cromossomo B longo (Bl) (AMABIS, 1974; 1983a) (**ANEXO 2**).

O cromossomo C tem cerca de 350 faixas, subdivididas em 23 secções, sendo o menor dos autossômicos. Seu ponto específico de quebra está entre as secções C12F/C13A, embora ocorra numa frequência menor que os demais cromossomos. O segmento denominado de C longo (Cl) corresponde às secções de 1 a 12 e o C curto (Cs) às secções de 13 a 23 (AMABIS, 1974 e 1983a) (**ANEXO 3**).

O cromossomo X apresenta 463 faixas em 23 secções. O segmento do cromossomo denominado de X curto (Xs) corresponde às secções de 1 a 9 e de X longo (Xl) às secções de 10 a 23. De acordo com AMABIS (1974), a região organizadora nucleolar (NOR) está localizada na secção X10 (mais especificamente X10A, X10B e X10C). Entre as secções X8A/X10B situam-se os pontos específicos de quebra mais frequente (**ANEXO 4**).

A fase larval de *Trichosia pubescens* consiste de 4 estádios (MORGANTE, 1969). O 4º estádio, que precede a pupação, caracteriza-se por apresentar modificações significativas no desenvolvimento e foi dividido arbitrariamente por AMABIS (1974) em fases: L₁ a L₇ e P₁ a P₄, com base nas características externas da larva e pelo seu comportamento quanto à alimentação e locomoção.

Sabe-se que durante o ciclo de vida larval dos dípteros têm-se mudanças nos padrões de pufes dos cromossomos politênicos, principalmente nos estádios de pré-pupa e pupa que antecedem a histólise das glândulas salivares. Em *Trichosia pubescens*, nas primeiras fases (L_1 a L_4) não ocorrem grandes alterações. Entretanto, de L_5 até a pupação ocorrem modificações significativas nos padrões de pufes e síntese de proteínas. Neste período podem ser encontrados cerca de 25 pufes de DNA e mais de 300 pufes de RNA (AMABIS, 1974; 1983a).

Além disso, os padrões de pufes variam de acordo com a região considerada da glândula salivar. Estas variações são bem mais acentuadas entre as regiões anterior e posterior da glândula em larvas jovens do que após a fase L_2 do desenvolvimento (AMABIS, 1974).

OBJETIVOS

O presente trabalho visa determinar a CEC em cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens*, nas diferentes fases do 4º estágio larval, após a ação de dois diferentes fixadores. É de se esperar que os valores de CEC variem nas diferentes regiões cromossômicas (bandas e interbandas), em decorrência das alterações morfológicas e fisiológicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento. Considerando-se que os valores de CEC venham a variar entre as regiões cromossômicas pretende-se:

a)- determinar a CEC em regiões envolvidas em intensa síntese de RNA;

b)- detectar modificações em CEC que espelhem alterações nos complexos DNA/proteínas no decorrer do processo de pufação, especialmente em regiões que originam os pufes de DNA, tentando relacionar os achados com outros dados conhecidos de composição, estrutura e atividade gênica;

c)- investigar possíveis diferenças em CEC associadas a diferentes complexos DNA/proteínas, supostamente ocorrendo em regiões heterocromáticas e/ou sub-replicadas;

d)- determinar a resposta das diferentes regiões cromossômicas à uma variante do método de CEC que evidencia complexos ribonucleoprotéicos (MELLO *et alii*, 1993).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

As larvas de *Trichosia pubescens* (Diptera, Sciaridae) foram obtidas do Laboratório de Sciarídeos do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP) e originalmente procedentes da cidade de Mogi das Cruzes, São Paulo.

No laboratório as larvas foram mantidas a 18°C, em caixas de plástico cobertas com placas de vidro e contendo no fundo uma camada de terra esterilizada, umidecida com água destilada. Sua alimentação consistia de uma mistura de "rama" de batata-doce ou alfafa moída fermentada, ração para suínos e fubá, umidecida por uma solução aquosa de mel e fermento "Fleischmann".

Os cromossomos politênicos utilizados para o estudo de CEC foram preparados a partir de glândulas salivares. Em *Trichosia pubescens*, as glândulas salivares são estruturas pares, tubulares, longas e finas (**Figura 1**) localizadas na região dorsal da larva e percorrendo a maior parte do seu corpo. As glândulas são formadas de células politênicas cujos tamanhos variam em diferentes secções do órgão denominadas de S_1 , S_{2a} , S_{2b} e S_3 (AMABIS, 1983b). A região escolhida foi a S_1 , por apresentar cromossomos politênicos maiores em relação aos das outras regiões da glândula (**Figura 2**).

O valor de CEC nos cromossomos foi determinado nas fases L_5 , L_7 e P_1 do 4º estágio larval.

Figura 1 - Glândula salivar de *T. pubescens*, no 4º estágio larval, fixada em glutaraldeído a 2% mostrando as diferentes secções do órgão (S_1 , P, S_{2a} , S_{2b} e S_{3b}). Microscopia de contraste de fase. **Cortesia do Prof. Dr. José Mariano Amabis.**

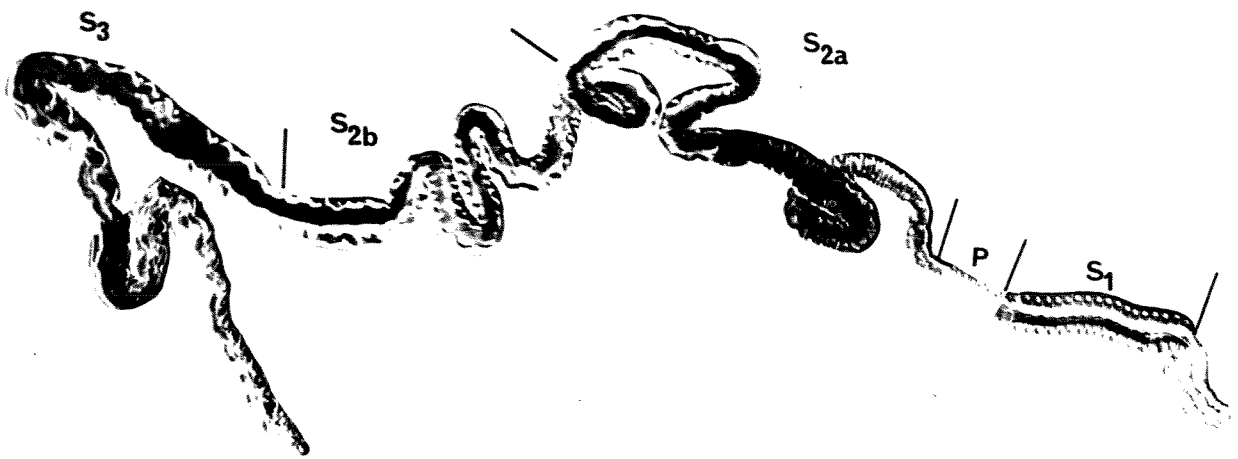
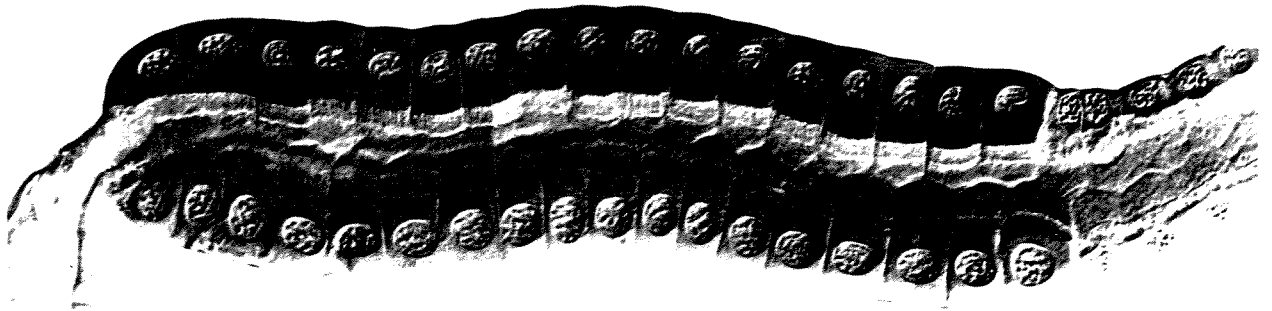


Figura 2 - Detalhe em microscopia de contraste de fase da região proximal (S_1) da glândula salivar de *T. pubescens*, no 4º estágio larval. Cortesia do Prof. Dr. José Mariano Amabis.



MÉTODOS

- Dissecção das Larvas

As glândulas salivares, de larvas anestesiadas em gelo, foram dissecadas na própria hemolinfa do inseto usando estilete e pinça de ponta fina sob microscópio estereoscópico.

- Preparações Citológicas

1- Fixação e Processamento

1.1. Fixação em etanol-ácido acético (3:1)

A região glandular S_1 , separada das demais regiões e do corpo gorduroso, foi passada para uma mistura de etanol-ácido acético (3:1) por 2 minutos. Em seguida, cada porção S_1 da glândula foi colocada sobre uma gota de ácido acético a 50% na lamínula por 1 minuto. As lamínulas foram então "pescadas" com as lâminas e procedeu-se ao esmagamento. As lâminas foram colocadas em etanol 70% por 5 minutos, após a retirada das lamínulas em nitrogênio líquido. As lâminas foram secadas ao ar e guardadas a seco à temperatura ambiente.

1.2. Fixação em paraformaldeído

As glândulas salivares após terem sido retiradas do corpo gorduroso foram fixadas numa solução salina (tampão fosfato, NaCl, NP40) contendo paraformaldeído na concentração de 1.75% (em JAMIRICH, M. et alii, 1977, modificado na concentração de paraformaldeído para *Trichosia pubescens* por AMABIS, comunicação pessoal). Após 1 minuto, as glândulas foram colocadas sobre a lamínula numa gota de solução de ácido acético a 50% e paraformaldeído a 1.75% (1:1) por 3 minutos. Decorrido esse tempo, fez-se o esmagamento com o mesmo procedimento descrito como na fixação em etanol-ácido acético (3:1). As glândulas salivares fixadas em paraformaldeído foram utilizadas somente para se determinar a CEC dos cromossomos no geral.

2- Citoquímica

Os cromossomos, tanto fixados em etanol-ácido acético (3:1) como em paraformaldeído a 1,75%, foram tratados pela solução de azul de toluidina (Merck) a 0,025% em tampão McIlvaine pH 4.0 por 15 minutos à temperatura ambiente (controle), segundo método de VIDAL (MELLO & VIDAL, 1980b).

Outros preparados cromossômicos foram também tratados com azul de toluidina, porém a esta solução corante foram adicionadas concentrações crescentes de $MgCl_2$ (Merck): 0.05M, 0.08M, 0.10M, 0.12M, 0.15M, 0.18M, 0.20M, 0.30M e 0.50M (material fixado em etanol-ácido acético); 0.10M, 0.15M, 0.18M e 0.20M (material fixado em paraformaldeído) (VIDAL & MELLO, 1989; MELLO & VIDAL, 1989). Tal procedimento visou a determinação dos valores de CEC dos cromossomos no geral.

Além disso, em outra parte desses preparados cromossômicos fixados em etanol-ácido acético, procedeu-se a um tratamento com RNase III em solução aquosa a 0,1% (Sigma) a 37°C por 1 hora antes de se proceder à coloração com azul de toluidina 0.025% pH 4.0. Foram utilizadas soluções corante sem adição de $MgCl_2$ (controle) e com adição de $MgCl_2$ nas concentrações de 0.08M; 0.10M; 0.12M, 0.15M e 0.20M.

Em algumas preparações a coloração foi seguida por tratamento com soluções aquosas de $MgCl_2$ em diferentes concentrações (0.05M sem tratamento enzimático e 0.05M e 0.08M tratadas com RNase), um procedimento proposto para evidenciação de nucléolos e

de outras regiões e/ou estruturas celulares ricas em RNA (MELLO *et alii*, 1993). Todos os preparados, após coloração, foram lavados em água corrente, secados ao ar, diafanizados com xilol por 10 minutos e montados em eukitte (MELLO & VIDAL, 1980b).

- Fotomicrografias

As micrografias foram obtidas em fotomicroscópio Zeiss Universal, utilizando-se filmes Gold 100 - Kodak. As revelações e ampliações foram feitas em laboratório fotográfico profissional.

RESULTADOS

Material fixado em etanol-ácido acético

Nas Pranchas **I** e **II** são observadas as imagens dos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* corados com azul de toluidina em situação controle. Na Prancha **I**, observa-se também a basofilia metacromática do citoplasma, a qual aparece removida após tratamento com RNase (Prancha **II**) deixando de ser constatada.

Nas figuras da Prancha **I** são destacados os pontos específicos de quebra dos cromossomos **A**, **B**, **C** e **X**, embora pontos adicionais de quebra possam ocorrer durante as preparações por esmagamento. No ponto de quebra do cromossomo **X** tem-se a NOR destacada (**fig. I d**).

Os padrões de distribuição de bandas e interbandas desses cromossomos politênicos podem ser, inclusive, comparados aos descritos para preparados corados com orceína lacto-acética, obtidos com os mesmos métodos de dissecação, fixação e esmagamento (**ANEXOS 1 a 4**, AMABIS, 1983a).

Nos cromossomos corados com azul de toluidina (**Prancha I**), nota-se que algumas regiões, de maneira geral, apresentam-se mais fortemente coradas, como por exemplo, as regiões dos cromossomos: **A** (A1/A2); **B** (B25); **C** (C1; C11 e C23) e **X** (X1; X2; X22 e X23), quando comparadas com os cromossomos corados com orceína lacto-acética (**ANEXOS 1 a 4**). Já no cromossomo **X**, as regiões X19E/X20B não aparecem tão distinguíveis quanto na coloração com orceína lacto-acética.

PRANCHA I

Cromossomos politênicos de *T. pubescens* do 4º estágio larval, região S₁ da glândula salivar, fixados em etanol-ácido acético (3:1), corados em solução de azul de toluidina 0.025% pH 4.0. (☆) metacromasia citoplasmática.

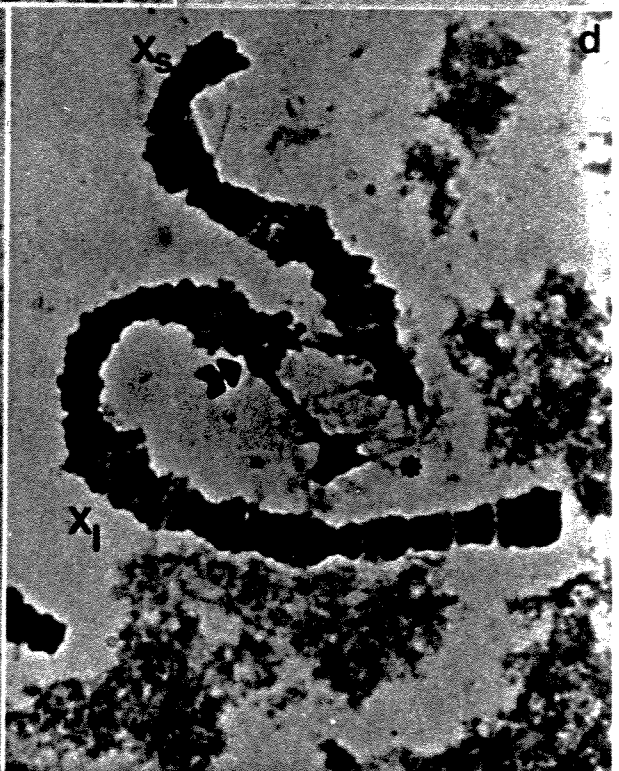
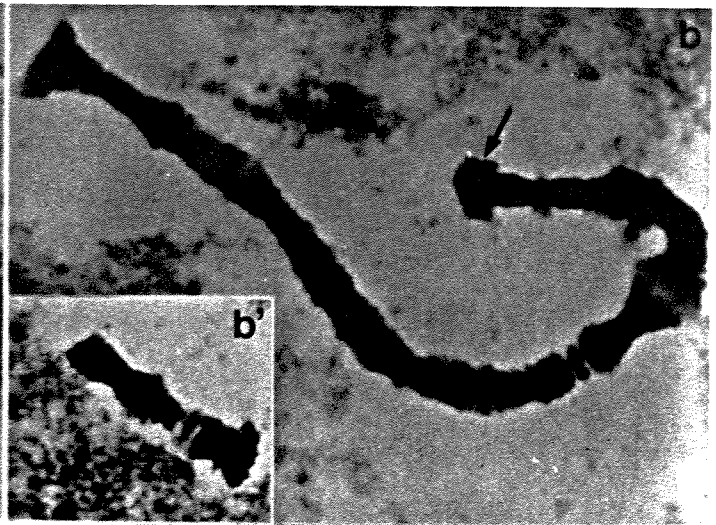
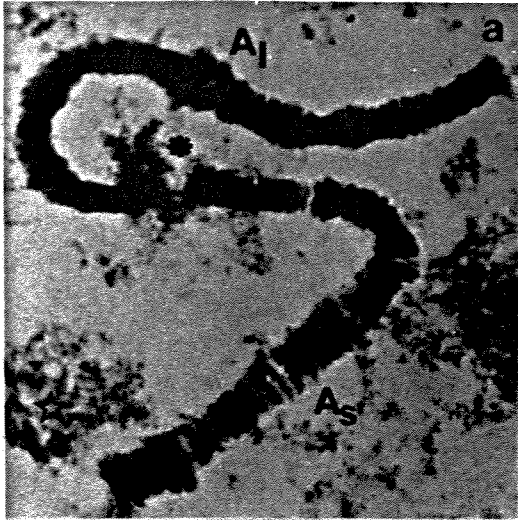
Figura a - Cromossomo A, fase L₅. Notar o ponto específico de quebra (*) resultando nos fragmentos A curto (A_s) e A longo (A_l). Aumento: 1.080X.

Figura b - Cromossomo B longo (B_l), fase P₁. A seta indica o ponto de quebra mais frequente. Aumento: 1.152X.

Figura b' - Cromossomo B curto (B_s), fase L₅. Aumento: 1.080X.

Figura c - Cromossomo C, fase L₅. (*) ponto específico de quebra. Aumento: 920X.

Figura d - Cromossomo X, fase P₁. Notar o ponto específico de quebra (*) e a região organizadora do nucléolo (NOR) (➡) Aumento: 920X.



PRANCHA II

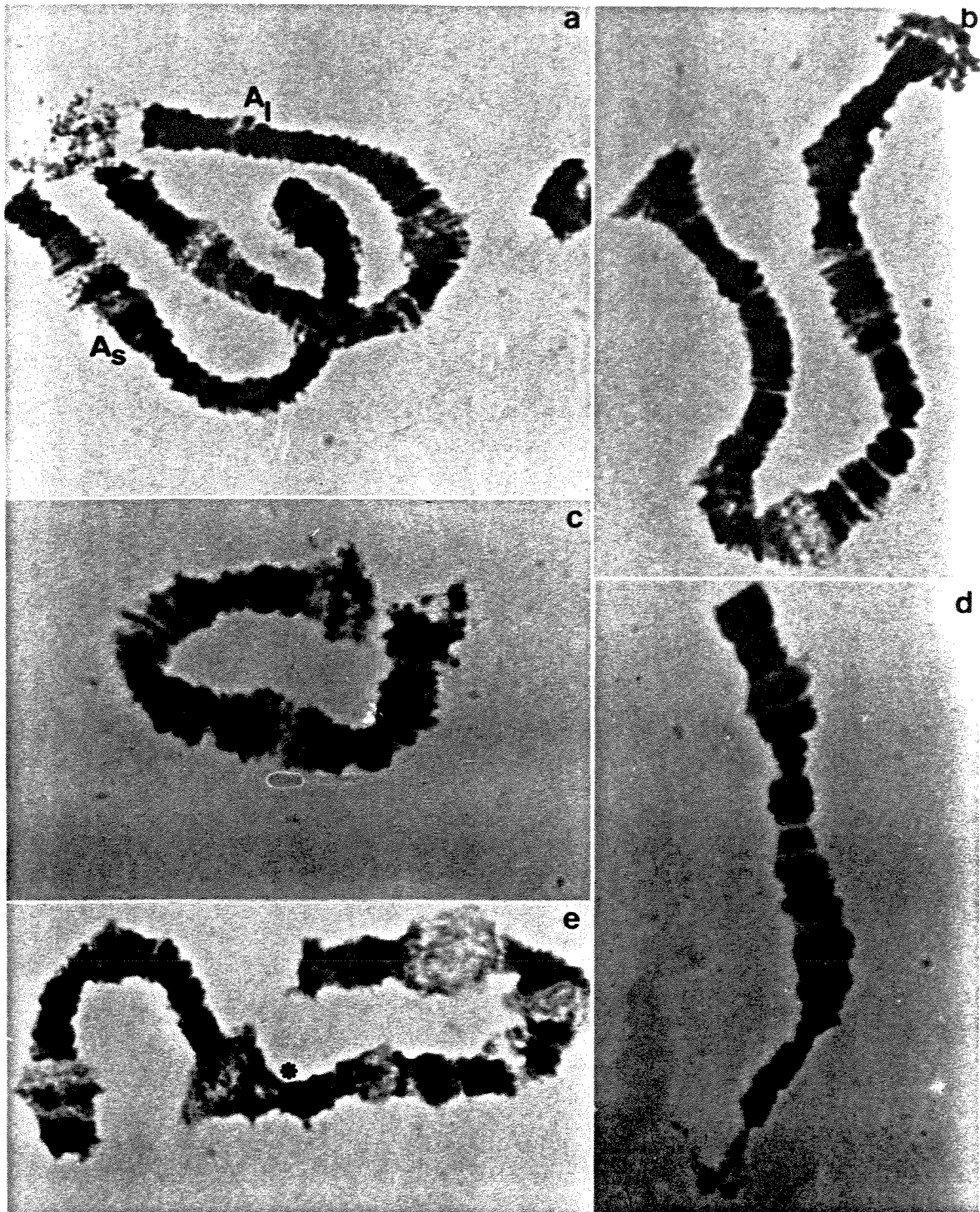
Cromossomos politênicos de *T. pubescens* do 4º estágio larval, região S₁ da glândula salivar, fixados em etanol-ácido acético (3:1), corados em solução de azul de toluidina 0.025% pH 4.0, tratados previamente com RNase 0.1%.

Figura a - Cromossomo A, fase L₇. A longo (A₁); A curto (A_s).
Aumento: 920X.

Figura b - Cromossomo B longo (B₁), fase L₅. Aumento: 1.152X.

Figura c e d - Cromossomos X longo (X₁) e X curto (X_s),
respectivamente, fase L₅. Aumento: 1.152X.

Figura e - Cromossomo C, fase L₇. (✱) ponto específico de
quebra. Aumento: 1.152X.



Por outro lado, nota-se que também as interbandas apresentam-se mais coradas do que em cromossomos corados com orceína lacto-acética, dificultando às vezes, a distinção entre bandas e interbandas. Quando a coloração com azul de toluidina é precedida por tratamento com RNase (**Prancha II**) há uma melhoria na produção da imagem de bandas, assemelhando-se mais com a situação em que os cromossomos foram corados com orceína lacto-acética (**ANEXOS 1 a 4**).

Esses cromossomos tratados com solução corante contendo $MgCl_2$ 0.05M exibem ainda, cor violeta. Quando tratados com solução corante contendo $MgCl_2$ 0.08M (**Prancha III**), a cor dos cromossomos no geral passa a azul-esverdeada, sendo que algumas regiões apresentam-se mais fortemente coradas e outras regiões permanecem violáceas. Após tratamento com soluções corante contendo $MgCl_2$ tanto na concentração 0.05M como na 0.08M, observa-se a metacromasia citoplasmática.

Além disso, grânulos violáceos aparecem destacados nos cromossomos corados com solução contendo $MgCl_2$, os quais são vistos dispersos ou distribuídos ao longo dos cromossomos e mesmo concentrados em regiões de quebra, como nas regiões 18 do cromossomo A curto (As); 13 do cromossomo C; e 10 do cromossomo X longo (Xl) (**Prancha III, figuras a e d**).

A cor em verde exibida pela maioria das regiões dos cromossomos foi vista na concentração de $MgCl_2$ 0.10M (**Prancha IV**) estabeleceu-se assim, para estas, o valor de CEC, muito embora algumas regiões cromossômicas nessa concentração se apresentassem

PRANCHA III

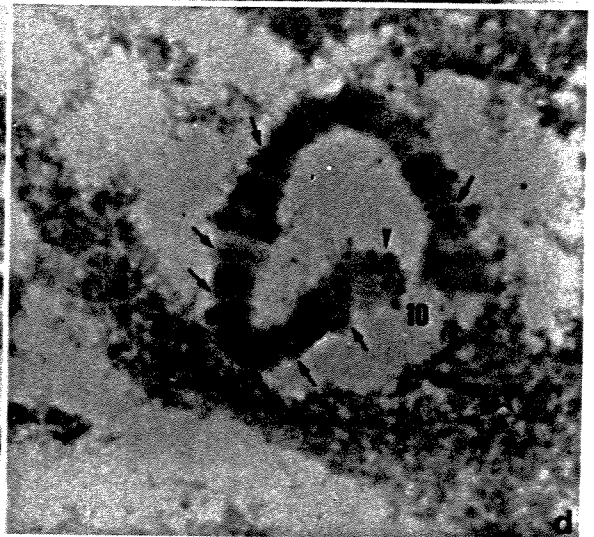
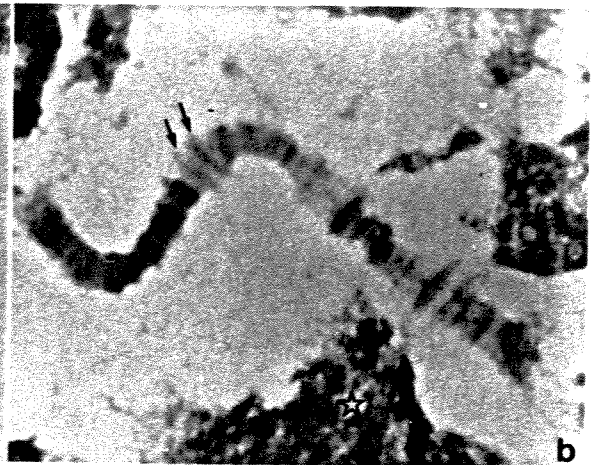
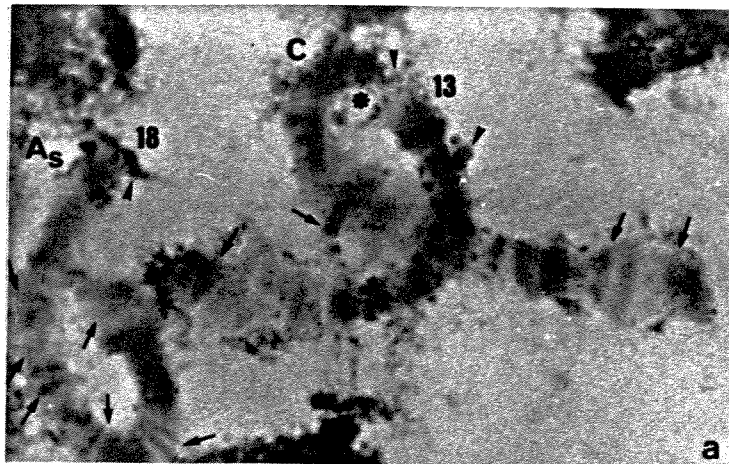
Cromossomos politênicos de *T. pubescens* do 4º estadio larval, região S₁ da glândula salivar, fixados em etanol-ácido acético (3:1), corados em solução de azul de toluidina acrescida de MgCl₂ 0.08M. (☆) metacromasia citoplasmática; (→) regiões violáceas; (►) grânulos violáceos.

Figura a - Cromossomo A curto (A_s) e C, fase P₁. Notar o ponto específico de quebra (✱). Aumento: 1.152X.

Figura b - Cromossomo A longo (A₁), fase P₁. Aumento: 1152X.

Figura c - Cromossomo B longo (B₁), fase L₇. Aumento: 920X.

Figura d - Cromossomo X longo (X₁), fase P₁. Aumento: 1.152X.



fortemente coradas, exibindo cor azul e outras ainda se apresentassem violáceas, destacadas com setas nas figuras. O valor de CEC para estas é, portanto, assumido como sendo superior a 0.10M (**Tabelas I a IV**). Nota-se também, nesta situação, os grânulos violáceos distribuídos ao longo dos cromossomos com predisposição nas regiões teloméricas e nos pontos de quebra e a basofilia metacromática do citoplasma.

Nos preparados submetidos à coloração com azul de toluidina contendo concentrações crescentes de $MgCl_2$ (0.12M; 0.15M; 0.18M; 0.20M; 0.30M e 0.50M) verificam-se ainda, regiões violáceas e os característicos grânulos. Além disso, nessas concentrações, a basofilia metacromática do citoplasma continuou a ser constatada.

Com base nos mapas citológicos proposto por AMABIS (1974; 1983a,b) foi feito o reconhecimento das regiões que se apresentaram violáceas, nas concentrações de $MgCl_2$ 0.10M, 0.30M e 0.50M. Essas regiões foram identificadas através de fotografias das preparações citológicas nas diferentes situações, considerando-se cada fase em estudo, e ainda através de uma análise direta dos cromossomos ao microscópio de luz. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de que alguma região não tenha sido identificada, e conseqüentemente não apresentada (**Tabelas I a IV**).

As regiões assim identificadas estão apresentadas nas tabelas de **I a IV** de acordo com os valores de CEC assumidos em intervalos de concentrações de $MgCl_2$, nas fases L_5 , L_7 e P_1 , considerando separadamente cada cromossomo.

PRANCHA IV

Cromossomos politênicos de *T. pubescens* do 4º estágio larval, região S₁ da glândula salivar, fixados em etanol-ácido acético (3:1), corados em solução de azul de toluidina acrescida de MgCl₂ 0.10M. (★) metacromasia citoplasmática; (→) regiões violáceas; (►) grânulos violáceos.

Figura a - Cromossomo A longo (A₁) e A curto (A_s), fase P₁.

Aumento: 920 X.

Figura b - Cromossomos X curto (X_s) e X longo (X₁), fase P₁.

Aumento: 1.152X.

Figura c - Cromossomo C, fase, L₇. Aumento: 1.152X.

Figura d - Cromossomo X longo (X₁) e A curto (A_s), fase P₁.

Aumento: 1.152X.

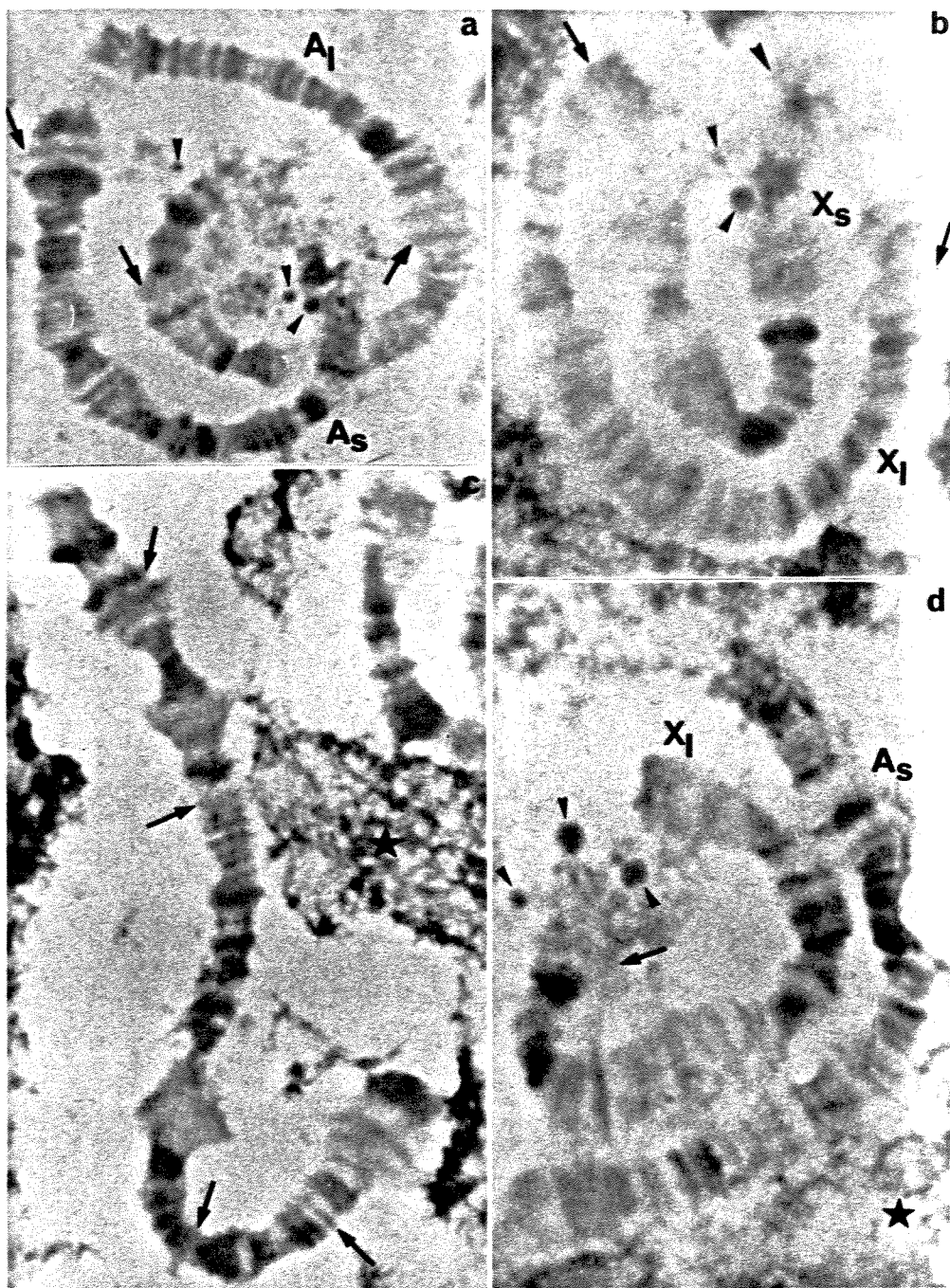


Tabela I - Valores de CEC, em intervalos de concentração de $MgCl_2$, em molaridade, de diferentes regiões do cromossomo A de *Trichosia pubescens*, que se apresentavam metacromáticas na concentração de $MgCl_2$ 0,1M, nas fases em estudo.

Região	0,1 ≤ 0,3	0,3 ≤ 0,5	>0,5	Região	0,1 ≤ 0,3	0,3 ≤ 0,5	>0,5
1E	■●▲			16E		●▲	■
1G	■●▲			17A		■●▲	
2A	■●		▲	17C	■●▲		
2E		■●	▲	17D		■●▲	
3A		■		18A		■●▲	
3D			■●▲	18D		■●▲	
3F	■	●▲		18E		■●▲	
4C	■●	▲		19A		■●▲	
5A		■		19B		■●▲	
5C			■●▲	19C	■	●▲	
6C		▲	■●	19D	■	●▲	
7A			■●▲	19E	■	●▲	
7D			■●▲	20A		■●▲	
8D			■●▲	20E			■●▲
8G		■	●▲	20F			■●▲
9C	●▲	■		21E			■●▲
9E	●▲	■		21F	■		●▲
10A		■		22B		■	●▲
10B		■		22E		■	●▲
10F		■	●▲	23A		■	●▲
10G		■	●▲	23B		■	●▲
11A		■●▲		23C		■	●▲
11H		■▲	●	23D			■●▲
12C	■			23F			■●▲
12F	■	●▲		24E		■▲	●
12H		■●▲		25F	●	▲	
13B	■●	▲		25G	●	▲	
14B		■	●▲	26B	●▲		
14C		■	●▲	26D		■●▲	
14E		■	●▲	27B		■●▲	
14F		■	●▲	27D			■●▲
15C		■●▲		28A		■	
15E	■●▲			28B		■	●▲
15F		■●▲		28C		■	●▲
16A		■●▲		28Cc		■	●▲

■ = fase L5
● = fase L7
▲ = fase P1

Tabela II - Valores de CEC, em intervalos de concentrações de $MgCl_2$, em molaridade, de diferentes regiões do cromossomo B de *Trichosia pubescens*, que se apresentavam metacromáticas na concentração de $MgCl_2$ 0,1M, nas fases em estudo.

Região	0,1≤0,3	0,3≤0,5	>0,5	Região	0,1≤0,3	0,3≤0,5	>0,5
1D			■●▲	13E	■		●▲
1E			■●▲	13F		■	
2B			■●▲	14B			■●▲
3B		■●		14E	■●▲		
3C		■●		15A	■●▲		
4C			■●▲	15B	■●▲		
5A	■●			15F	■●▲		
5B	■●			16B			■●▲
5C	■		●▲	17A		■●▲	
5E		■●▲		17B	■	●▲	
5F		■●▲		17C			■●▲
6A		■●▲		17D			■●▲
8A		■●▲		18C	■		●▲
8C		■●▲		18D			●▲
9A		■●▲		19A	■●▲		
9B		■●▲		19D			■●▲
10A		■●▲		20A		■●▲	
10C			■●▲	20B		■●▲	
10D			■●▲	20C		■	●▲
10H			■●▲	20D		■	●▲
11B			■●▲	21B		■	●▲
11C			■●▲	21C		■	●▲
11G		■●▲		22B			■●▲
12C		■●▲		23A	■●▲		
13A		■●▲		23B	■●▲		
13B	■		●▲	24E			■●▲
13C	■		●▲	25C			■●▲
13D	■		●▲	25D			■●▲

■ = fase L5

● = fase L7

▲ = fase P1

Tabela III - Valores de CEC, em intervalos de concentrações de $MgCl_2$, em molaridade, de diferentes regiões do cromossomo C de *Trichosia pubescens*, que se apresentavam metacromáticas na concentração de $MgCl_2$ 0,1M, nas fases em estudo.

Região	0,1≤0,3	0,3≤0,5	>0,5	Região	0,1≤0,3	0,3≤0,5	>0,5
1C		■●▲		12E		■	●▲
1G		■●▲		12F		■	●▲
2A	●▲	■		13A			■●▲
2B	●▲	■		13E	■		●▲
3B		■●		13F		■●	▲
3C		■●▲		14C	■●▲		
4B			■●▲	14D	■●▲		
5A	■			14E	■●▲		
5B	■●▲			15C		●▲	■
5C	■●▲			15D			■●▲
6B		■	●▲	16E	■●▲		
6C			■●▲	17A	■●▲		
6D			■●▲	17D	■●▲		
7B		■●▲		17E	■●▲		
8C			■●▲	18A		■●▲	
8D			■●▲	18D			■●▲
8F	■●▲			19A			■●▲
9D	■		●▲	20A			■●▲
9E	■		●▲	20B			■●▲
10B		■	●▲	21A	■●▲		
10D		■	●▲	21C		■●▲	
10F	■			21D		■●▲	
11C		■	●▲	22A			■●▲
12A	■●▲			22B			■●▲
12C		■	●▲	23A		■	●▲
12D		■	●▲	23D	●▲		

■ = fase L5
 ● = fase L7
 ▲ = fase P1

Tabela IV - Valores de CEC, em intervalos de concentrações de $MgCl_2$, em molaridade, de diferentes regiões do cromossomo X de *Trichosia pubescens*, que se apresentavam metacromáticas na concentração de $MgCl_2$ 0,1M, nas fases em estudo.

Região	0,1≤ 0,3	0,3≤0,5	>0,5	Região	0,1≤0,3	0,3≤0,5	>0,5
1D			■●▲	13B	▲	■●	
2D			■●▲	13C	▲		■●
3A		■		14B	▲	●	■
3B			■●▲	14C	▲	●	■
3C			■●▲	14F	■		●▲
4A		■●▲		15Aa	■		●▲
4E			■●▲	15A			■●▲
5D			■●▲	16A		●▲	■
6A			■●▲	16B			■
6B			●▲	16C			■●▲
7A			■●▲	16D			■●▲
7B			■●▲	16E			■●▲
7E			■●▲	17A			■●▲
8A			■●▲	17C	●▲		■
8B			■●▲	17D	●▲		■
9C	●▲	■		18A	●▲		■
9D	●▲	■		18D	●▲	■	
10A		■●▲		19A	▲	●	■
10B		■●▲		19B	▲	●	■
10C		■●▲		19E	■	●▲	
11A	■●▲			20A	▲	■	●
11B			■●▲	21C		■	●▲
11D			■●▲	22A			■●▲
11E		■●▲		22D			■●▲
12C			■●▲	23B	■●▲		
12G		■●▲		23C	■●▲		
13A		■●▲					

■ = fase L5
● = fase L7
▲ = fase P1

Cromossomos corados com azul de toluidina contendo MgCl_2 0.10M, previamente tratados com RNase (**Prancha V**), exibiram cor azul, apresentando ainda muitas regiões violáceas, tendo um comportamento diferente em relação aos cromossomos corados sem tratamento prévio por RNase.

Para a situação de coloração subsequente ao tratamento enzimático, o valor de CEC para a maioria das regiões cromossômicas foi estabelecido como sendo 0.20M (**Prancha VI**), muito embora sejam observadas algumas regiões violáceas. Estas regiões também foram identificadas, e estão apresentadas em separado nas Tabelas **V**, **VI**, **VII** e **VIII**).

Nos cromossomos submetidos a uma variante do método de CEC (MELLO *et alii*, 1993), para evidênciação de RNA especialmente ribossomal, ou seja, tratamento com MgCl_2 subsequente à etapa de coloração, a maioria das regiões dos cromossomos apresentaram-se coradas em verde na concentração de MgCl_2 0.05M (**Prancha VII**), enquanto outras regiões apresentaram-se violáceas. Essas regiões estão descritas nas Tabelas de **IX** a **XII**. Quando tratados previamente com RNase, os cromossomos apresentaram-se corados em azul na concentração de MgCl_2 0.05M e verde na concentração de MgCl_2 0.08M.

PRANCHA V

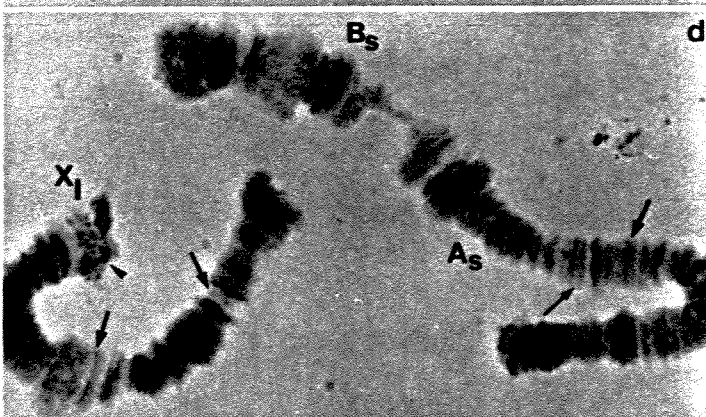
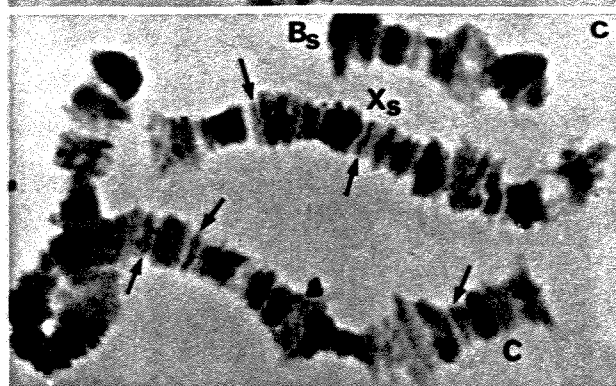
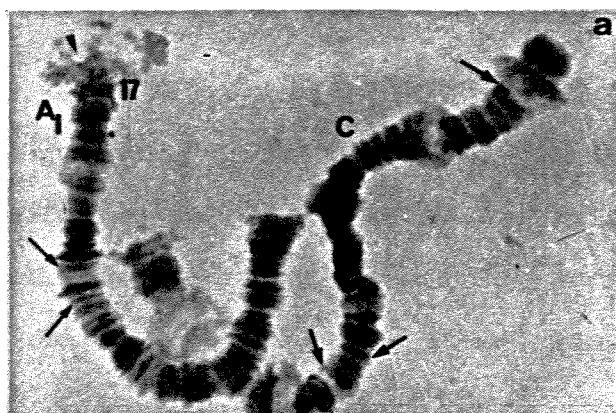
Cromossomos politênicos de *T. pubescens* do 4º estágio larval, região S₁ da glândula salivar, fixados em etanol-ácido acético (3:1), corados em solução de azul de toluidina acrescida de MgCl₂ 0.10M tratados previamente com RNase 0.1%. (→) regiões violáceas; (►) grânulos violáceos.

Figura a - Cromossomo A longo (A₁) e C, fase L₇. Aumento: 920X.

Figura b - Cromossomo B longo (B₁), fase L₇. Aumento: 1.152X.

Figura c - Cromossomos C, X curto (X_s) e B curto (B_s), fase L₇. Aumento: 1.152X.

Figura d - Cromossomos B curto (B_s); A curto (A_s) e X longo (X₁). Aumento: 920X.



PRANCHA VI

Cromossomos politênicos de *T. pubescens* do 4º estágio larval, região S₁ da glândula salivar, fixados em etanol-ácido acético (3:1), corados em solução de azul de toluidina acrescida de MgCl₂ 0.20M tratados previamente com RNase 0.1%. (→) regiões violáceas.

Figura a - Cromossomo A curto (A₈) e X longo (X₁), fase L₇.

Aumento: 1.152X.

Figura b - Cromossomo C e X curto (X₈), fase L₇.

Aumento: 1.152X.

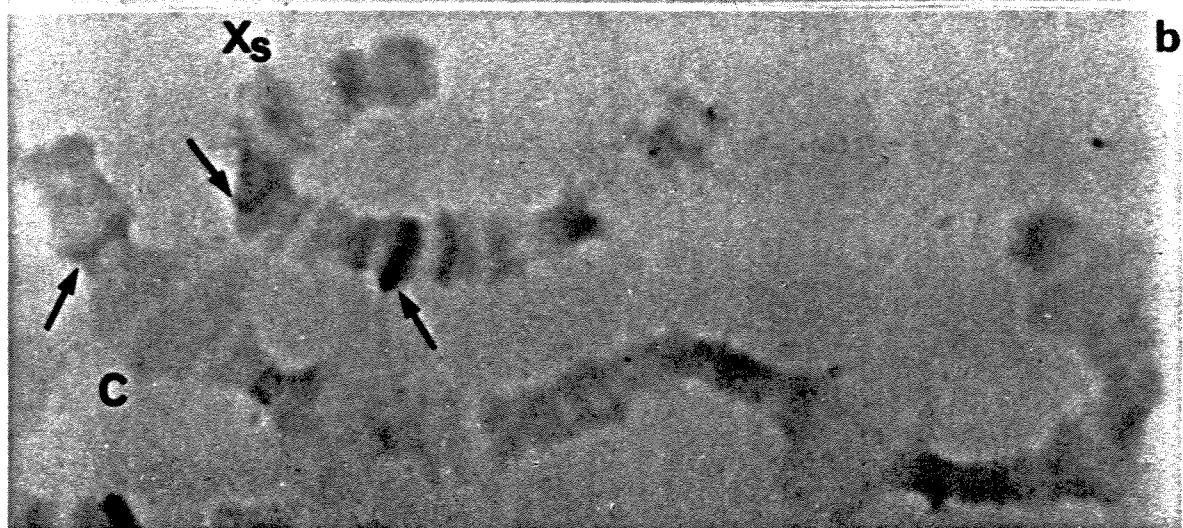
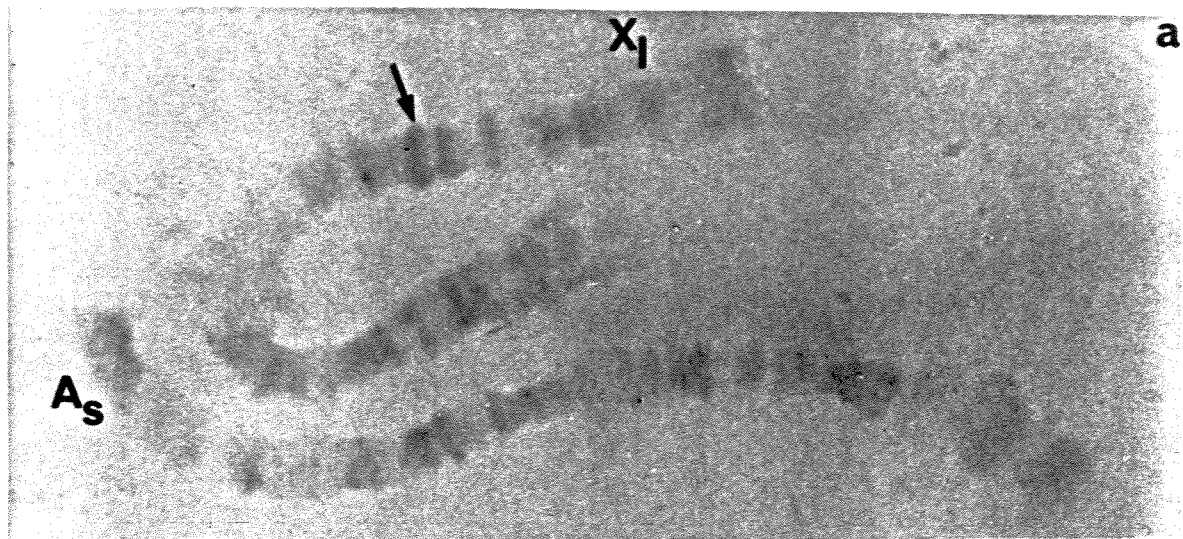


Tabela V - Regiões violáceas identificadas do cromossomo A de *Trichosia pubescens*, quando coradas com azul de toluidina contendo $MgCl_2$ 0,20M, subsequente ao tratamento com RNase.

Região	0,20 após RNase	Região	0,20 após RNase
1E	■●▲	14E	■
2A	■●▲	15C	■●▲
2E	■●▲	16A	■●▲
3A	■●▲	16E	■●▲
3D	■●▲	18D	■●▲
3F	■●▲	18E	■●▲
4C	■	20A	■●▲
5A	■	20E	■●▲
5C	■●▲	20F	■●▲
7D	■●▲	22B	■●▲
8D	■●▲	23A	●▲
8G	■●▲	23C	●▲
11H	■▲	24E	■●▲
12F	■▲	26D	■●▲
12H	▲	27B	■●▲
13B	▲	27D	●▲
14B	■●	28A	■
14C	■●	28B	●▲
		28C	●▲

■ = fase L5

● = fase L7

▲ = fase P1

Tabela VI - Regiões violáceas identificadas do cromossomo B de *Trichosia pubescens*, quando coradas com azul de toluidina contendo $MgCl_2$ 0,20M, subsequente ao tratamento com RNase.

Região	0,20 após RNase
1D	■●▲
1E	■●▲
3C	■●▲
4C	■●▲
5B	■●▲
5F	■●▲
6A	■●▲
8C	■
9A	●
9B	●
10H	■●▲
11C	●
13F	▲
14E	▲
15A	▲
16B	●
18C	■●▲
19A	●
21B	■
22B	■
24D	■●
24E	■●▲
25C	■●▲
25D	■●▲

■ = fase L5

● = fase L7

▲ = fase P1

Tabela VII - Regiões violáceas identificadas do cromossomo C de *Trichosia pubescens*, quando coradas com azul de toluidina contendo $MgCl_2$ 0,20M, subsequente ao tratamento com RNase.

Região	0,20 após RNase
1C	■●▲
1G	■
2B	■●▲
3B	■
3C	■
4B	■●▲
5A	●▲
5B	■
5C	■
8D	■●▲
8F	■●▲
13A	■●▲
13E	■●▲
13F	■●▲
14C	■●▲
14D	■●▲
15D	■●▲
21A	■●▲
21C	■●▲
21D	■●▲

■ = fase L5
● = fase L7
▲ = fase P1

Tabela VIII - Regiões violáceas identificadas do cromossomo X de *Trichosia pubescens*, quando coradas com azul de toluidina contendo $MgCl_2$ 0,20M, subsequente ao tratamento com RNase.

Região	0,20 após RNase
1D	●▲
2D	●▲
3B	■●▲
3C	■●▲
4A	■●▲
4E	■●▲
5D	■●▲
6B	■●▲
7E	■●▲
11A	■●▲
11E	■●▲
12C	■●▲
13B	■
14B	●▲
15A	■●▲
16B	■●▲
16E	■●▲
17A	■●▲
17C	●▲
17D	●▲
19B	■●▲
20A	■●▲
23B	■●▲
23C	■●▲

■ = fase L5

● = fase L7

▲ = fase P1

Nesta condição, verificou-se também a presença de grânulos violáceos, com a mesma distribuição característica descrita nos preparados corados em soluções contendo concentrações crescentes de $MgCl_2$ (**Prancha VII**) ou quando corados em azul de toluidina após tratamento enzimático.

PRANCHA VII

Cromossomos politênicos de *T. pubescens* do 4º estágio larval, região S₁ da glândula salivar, fixados em etanol-ácido acético(3:1), tratados com soluções aquosas de MgCl₂ 0.05M após coloração em solução de azul de toluidina 0.025% pH 4.0. (☆) metacromasia citoplasmática; (→) regiões violáceas; (►) grânulos violáceos.

Figura a - Cromossomo A, fase L₅. (✱) ponto específico de quebra. Aumento: 720X.

Figura b - Cromossomo A curto (A_s) e A longo (A₁), fase P₁. Aumento: 1.152X.

Figura c - Cromossomos B longo (B₁), X longo (X₁) e X curto (X_s), fase L₅. Aumento: 920X.

Figura d - Cromossomo C, fase P₁. Aumento: 1.152X.

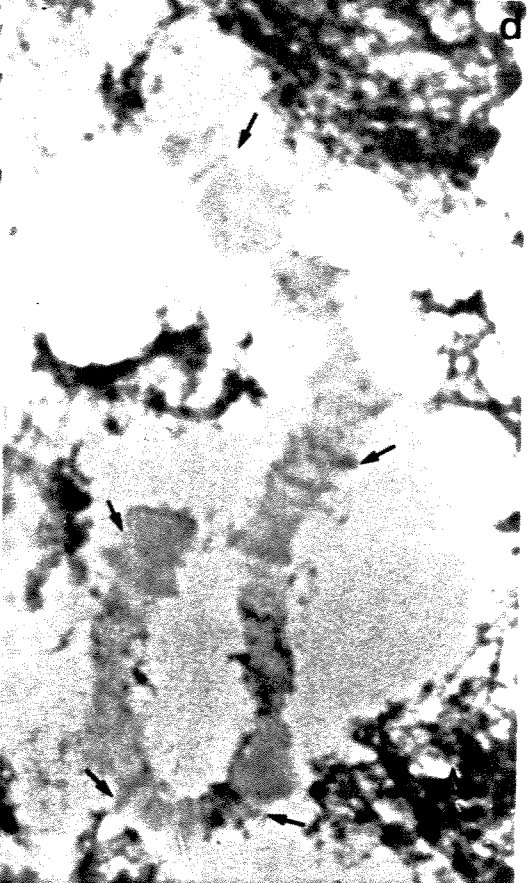
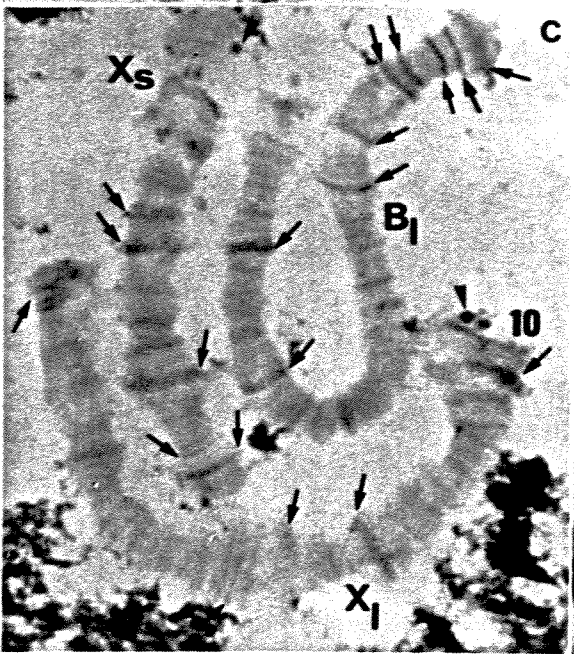
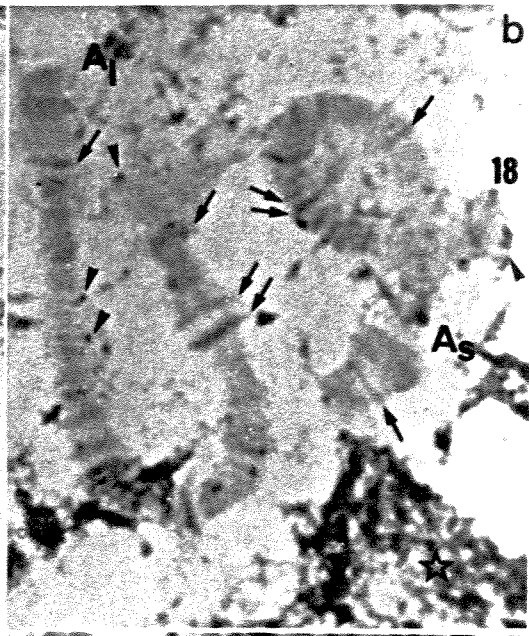
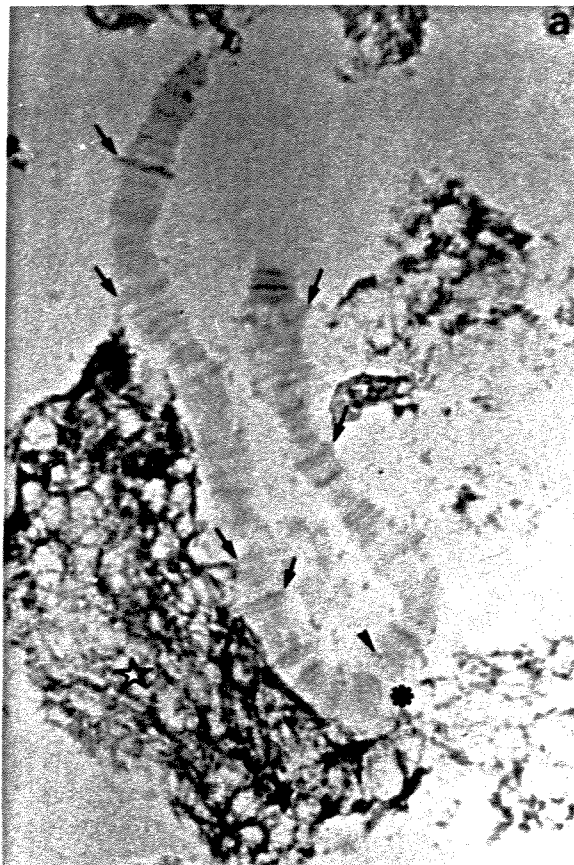


Tabela IX - Regiões violáceas identificadas do cromossomo A de *Trichosia pubescens*, quando submetidas ao tratamento com $MgCl_2$ 0,05M, subsequente à coloração com azul de toluidina 0,025%, pH 4,0.

Região	0,05M	Região	0,05M
1E	■●▲	16E	■●▲
1G	■	18A	■●▲
2A	■●▲	18D	■●▲
2E	■●▲	18E	■●▲
3A	■●▲	19D	●▲
3D	■●▲	19E	●▲
3F	■●▲	20A	■●▲
4C	■	20E	■●▲
5C	■●▲	20F	■●▲
6C	■●▲	21F	■●▲
7D	■●▲	22B	■●▲
8D	■●▲	22E	■●▲
8G	■●▲	23B	■●▲
9C	■●▲	23C	■●▲
9E	■●▲	23D	●
11H	▲	24E	■●▲
12F	▲	25F	■●▲
12H	▲	25G	■●▲
13B	■●▲	26B	■●▲
14C	■●▲	26D	■●▲
14E	■▲	27B	■●▲
14F	■●▲	27D	■●▲
15F	■●▲	28Cc	■●▲
16A	■●▲		

■ = fase L5

● = fase L7

▲ = fase P1

Tabela X - Regiões violáceas identificadas do cromossomo B de *Trichosia pubescens*, quando submetidas ao tratamento com $MgCl_2$ 0,05M, subsequente à coloração com azul de toluidiña 0,025%, pH 4,0.

Região	0,05M	Região	0,05M
1D	■●▲	15F	■●▲
1E	■●▲	16B	■▲
4C	■●▲	17A	■●▲
5C	▲●	18C	■●▲
10A	■	18D	●
10B	■	19A	■●▲
10C	■	19D	●▲
10D	■▲	20A	●
10H	■	20B	●
11B	■●▲	21C	▲
11C	●	22B	■●▲
13F	■	23A	■
14B	■▲	23B	■
14E	■▲	24D	■●
15A	■	24E	■●▲
15B	■▲	25A	■●▲

■ = fase L5

● = fase L7

▲ = fase P1

Tabela XI - Regiões violáceas identificadas do cromossomo C de *Trichosia pubescens*, quando submetidas ao tratamento com $MgCl_2$ 0,05M, subsequente à coloração com azul de toluidina 0,025%, pH 4,0.

Região	0,05M	Região	0,05M
1C	■●▲	12F	■●▲
1G	■●▲	13A	■●▲
2B	■●▲	13E	■●
3B	■●▲	13F	■●▲
3C	■●▲	14C	■●▲
4B	■●▲	14D	■●▲
5B	■●▲	14E	■●▲
5C	■●▲	15C	■●▲
6B	■●▲	15D	■●▲
6C	■●▲	16E	■●▲
6D	■●▲	17A	■●▲
7B	■●▲	17D	■●▲
8C	■▲	17E	■●▲
8D	■▲	18A	■●▲
8F	■●▲	18D	■●▲
9D	■●▲	19A	■●▲
9E	■●▲	20A	■●▲
10D	●▲	20B	■●▲
10F	■	21A	■●▲
11C	■●▲	21C	■●▲
12A	■●▲	21D	■●▲
12C	■●▲	22A	■●▲
12D	■●▲	22B	■●▲
12E	■●▲	23A	■●▲

■ = fase L5

● = fase L7

▲ = fase P1

Tabela XII - Regiões violáceas identificadas do cromossomo X de *Trichosia pubescens*, quando submetidas ao tratamento com MgCl_2 0,05M, subsequente à coloração com azul de toluidina 0,025%, pH 4,0.

Região	0,05M	Região	0,05M
1D	■●▲	12C	■●▲
2D	■●▲	12G	■●▲
3A	■●▲	13A	■●▲
3B	■●▲	13B	■●▲
3C	■●▲	14B	■●▲
4A	■●▲	14C	■●▲
4E	■●▲	15A	■●▲
5D	■●▲	16A	■●▲
6A	■●▲	16B	■●▲
7A	■●▲	16C	■●▲
7B	■●▲	16D	■●▲
7E	■●▲	16E	■●▲
8A	■●▲	17A	■●▲
8B	■●▲	17C	■●
9C	■●▲	17D	■●
9D	■●▲	19A	■●▲
10A	■●▲	19B	■●▲
10B	■●▲	20A	■●▲
10C	■●▲	21C	■●▲
11A	■●▲	22A	■●▲
11E	■●▲	22D	■●▲
		23B	■●▲

■ = fase L5
 ● = fase L7
 ▲ = fase P1

Material fixado em paraformaldeído 1.75%

Na Prancha **VIII** observa-se o fenômeno de metacromasia nos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* tratados com a solução corante de azul de toluidina não acrescida de $MgCl_2$. Nas figuras, apesar de pouco material citoplasmático presente, é possível notar a sua basofilia metacromática. Além disso, podem-se observar grânulos violáceos dispersos e ao longo dos cromossomos.

Os cromossomos tratados com solução corante acrescida de $MgCl_2$ estão apresentados nas Pranchas **IX** e **X**. Na concentração de $MgCl_2$ 0.10M (**Prancha IX**), a coloração dos cromossomos passa a azul, com muitas regiões fortemente coradas, dificultando a distinção de regiões que estejam metacromáticas. Na Prancha **X**, concentração de $MgCl_2$ 0.20M, os cromossomos apresentam-se corados em verde. Portanto, para essa fixação estabeleceu-se o valor de CEC na concentração de $MgCl_2$ 0.20M. Nesta situação, só percebe-se de forma muito sutil as regiões violáceas. Quanto aos grânulos metacromáticos, verificou-se a presença dos mesmos distribuídos ao longo dos cromossomos durante a análise do material, apesar de não aparecerem de forma conspícua na figura apresentada.

Os preparados fixados em paraformaldeído 1.75% não foram submetidos à ação da RNase por apresentarem uma resistência particular à ação enzimática, não possibilitando sua completa digestão (BRACHET, 1953).

PRANCHA VIII

Cromossomos politênicos de *T. pubescens* do 4º estágio larval, região S₁ da glândula salivar, fixados em paraformaldeído 1.75%, corados em solução de azul de toluidina 0.025% pH 4.0. (►) grânulos violáceos.

Figura a - Cromossomo A longo (A₁), fase P₁. Aumento: 1.152X.

Figura b - Cromossomo X longo (X₁), fase P₁. Aumento: 1.152X.

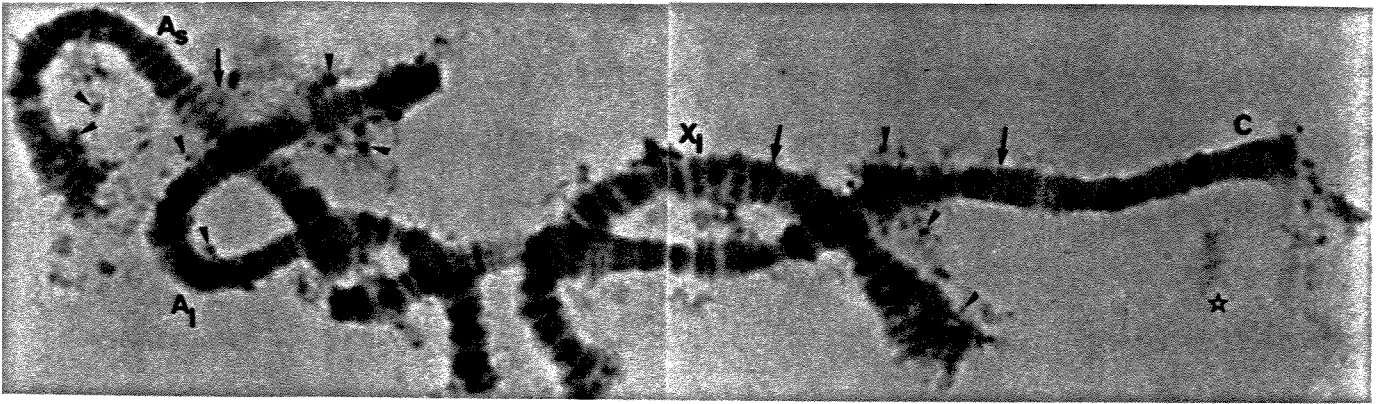
Figura c - Cromossomos A longo (A₁) e A curto (A_s); B curto (B_s); B longo (B₁); C; X longo (X₁) e X curto (X_s), fase P₁. Aumento: 720X.

Figura d - Cromossomo X curto (X_s), fase P₁. Aumento: 1.152X.



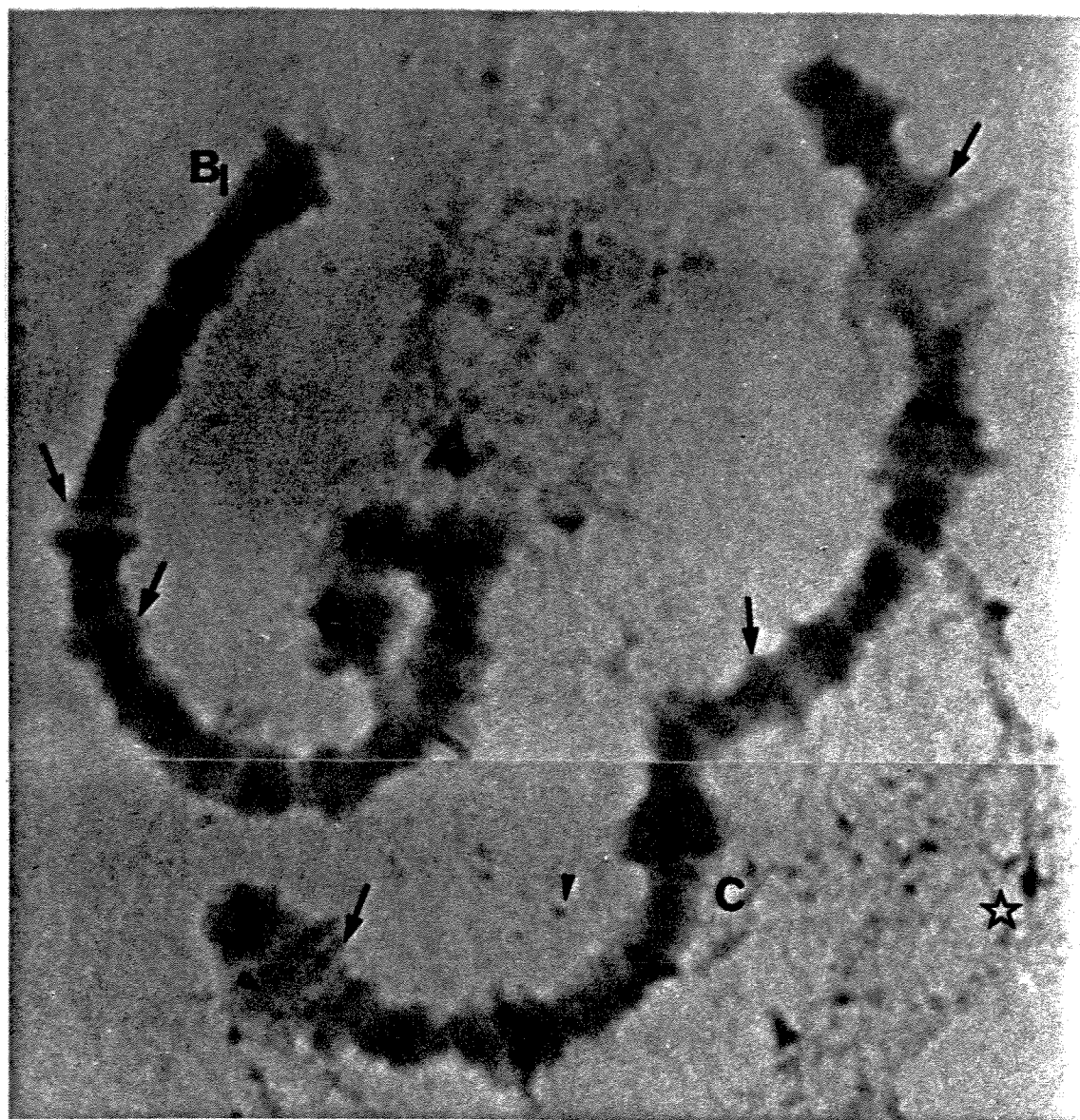
PRANCHA IX

Cromossomos politênicos A longo (A_1); A curto (A_2); C e X longo (X_1), fase P_1 de *T. pubescens* do 4º estágio larval, região S_1 da glândula salivar, fixados em paraformaldeído 1.75%, corados em solução de azul de toluidina acrescida de $MgCl_2$ 0.10M. (☆) metacromasia citoplasmática. (→) regiões violáceas. (►) grânulos violáceos. Aumento: 1.152X.



PRANCHA X

Cromossomos politênicos B longo (B_1) e C, fase L_6 - L_7 de *T. pubescens* do 4º estágio larval, região S_1 da glândula salivar, fixados em paraformaldeído 1.75%, corados em solução de azul de toluidina acrescida de $MgCl_2$ 0.20M. (☆) metacromasia citoplasmática. (→) regiões violáceas. (►) grânulos violáceos. Aumento: 1.152X.



DISCUSSÃO

**CEC de bandas e interbandas de cromossomos
politênicos de *Trichosia pubescens*.**

Os resultados referentes à situação controle mostraram os cromossomos corados em violeta devido às ligações eletrostáticas entre os grupos fosfatos livres dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e as moléculas do corante catiônico, bem como ao padrão de distribuição (frequência e proximidade) das moléculas do corante (MELLO, 1976; VIDAL, 1987). Mesmo nessa situação, observaram-se diferenças no padrão de basofilia metacromática (diferentes tons de violeta) entre as bandas de um mesmo cromossomo. Tais diferenças, provavelmente, foram decorrentes de diferentes níveis de complexação entre DNA e proteínas e/ou RNA e proteínas, bem como concentração desses componentes. Dados semelhantes foram obtidos quando se fizeram medidas microespectrofotométricas em diferentes regiões (heterocromatina e bandas eucromáticas) de cromossomos politênicos de *Rhynchosciara americana* (VIDAL, 1975; MELLO & VIDAL, 1979).

Deve também ser aqui mencionado que o padrão de bandamento dos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* tratados com solução de azul de toluidina mostrou que algumas regiões comportaram-se de forma diferente em comparação ao padrão de bandamento de preparados do mesmo material, corados com orceína lacto-acética.

Presumivelmente essas diferenças se devam aos mecanismos de coloração envolvidos. As moléculas do corante azul de toluidina,

nas condições descritas, ligam-se somente aos grupamentos fosfatos de DNA e RNA (LISON, 1960; MELLO, 1976; MELLO & VIDAL, 1980a, VIDAL, 1987). Quanto à coloração pela orceína lacto-acética seu mecanismo é desconhecido, apesar de ser largamente usada por evidenciar detalhes morfológicos de cromossomos. Supõe-se que a orceína lacto-acética core proteínas (KIERNAN, 1990). Por essa razão, o uso da coloração pelo azul de toluidina nas condições descritas, é mais indicado para estudos de estrutura e organização cromatínica no que se refere especificamente aos ácidos nucléicos.

Os resultados deste trabalho mostraram que o valor estabelecido de CEC foi o mesmo (0.10M) para a maioria das regiões dos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens*, nas fases estudadas do 4º estágio larval, após fixação pelo etanol-ácido acético. Tal valor relativamente baixo de CEC encontra semelhança naquele verificado em eucromatina razoavelmente frouxa como a de hepatócitos de camundongo, sob condições semelhantes de fixação e coloração (AMARAL & MELLO, 1989).

Algumas regiões dos cromossomos politênicos, no entanto, na concentração de $MgCl_2$ 0.10M apresentaram-se fortemente coradas em azul. Embora não tenham sido efetuadas medidas microespectrofotométricas nessas regiões, supostamente, aí ocorreu o fenômeno da metacromasia em que o pico principal da curva de absorção estaria posicionado em comprimentos de onda mais curtos, ao redor de 590nm (metacromasia) (revisões em MELLO, 1976; VIDAL, 1987).

Verificou-se ainda, nessa situação, que algumas regiões

desses cromossomos coraram-se mesmo em violeta, ou seja, não tiveram seu padrão espectral afetado com a adição dos cátions inorgânicos de Mg^{2+} à solução corante. Muitas destas regiões, assim como as que exibiram cor azul foram também observadas quando coradas por soluções de azul de toluidina contendo $MgCl_2$ nas concentrações de 0.12M a 0.50M. Para estas regiões, então os valores de CEC apareceram em intervalos de concentrações mais elevadas de $MgCl_2$ (0.10M-0.30M; 0.30M-0.50M e mesmo superior a 0.50M), ou seja, quando a cor violeta e/ou azul deixou de ser constatada.

1- CEC em regiões de pufes de RNA e DNA

Essas regiões cromossômicas foram em sua maioria identificadas conforme descrito nas Tabelas I a IV. Concluiu-se, através de dados publicados por AMABIS (1974, 1983a,b), AMABIS (1977) e AMABIS & AMABIS (1984a,b), que uma parte dessas regiões cromossômicas representariam "loci" gênicos ativos. A atividade dos "loci" gênicos, num cromossomo politênico e num determinado momento do desenvolvimento, pode resultar na formação de um pufe. Dessa forma, as modificações no padrão de atividade gênica são facilmente detectáveis através de alterações no padrão de pufes desses cromossomos (ASHBURNER, 1970). Porém, nem sempre as mudanças fisiológicas resultam necessariamente em alterações morfológicas. BERENDES (1972) verificou em *Drosophila hydei* que os sítios cromossômicos que incorporavam precursores de RNA não apresentavam

características de um pufe.

O padrão de pufes nos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* é relativamente constante (AMABIS, 1983a). Entretanto, quando surgem as primeiras manchas oculares, na fase L₂ do 4º estágio larval, esse padrão sofre grandes modificações. É neste período que alguns pufes típicos da fase de intermuda regridem e outros pufes são induzidos (AMABIS, 1974). Os pufes induzidos aparecem numa sequência de alterações contínuas que só terminam com a autólise da glândula salivar (FERREIRA, 1988). Essas alterações no padrão de atividade gênica ao final do desenvolvimento são desencadeadas por um aumento da taxa do hormônio ecdisona na hemolinfa (AMABIS, 1974; AMABIS, 1977; AMABIS & JANCZUR, 1978; AMABIS & AMABIS, 1984 a,b).

Portanto, das regiões que permaneceram metacromáticas após tratamento com a solução corante contendo MgCl₂ maior que 0.10M, algumas corresponderiam a sítios cromossômicos ricos em ribonucleoproteínas (RNP) e/ou sítios cromossômicos que estariam transcrevendo. Nestes sítios o RNA recém-sintetizado não seria liberado imediatamente no nucleoplasma, resultando no seu acúmulo (BERENDES, 1968).

Dentre as regiões que fazem parte deste grupo, ou seja, das que formam pufes de RNA, algumas assumiram valores de CEC em um mesmo intervalo de concentrações de MgCl₂. Outras regiões apresentaram valores de CEC em diferentes intervalos de concentrações de MgCl₂, numa determinada(s) fase(s), e há ainda, o caso de regiões que só foram identificadas na fase L₅. Para maior

clareza, essas regiões aparecem nomeadas na Tabela XIII.

Estes dados estariam de acordo com as descrições de SCOTT (1973), segundo as quais a CEC de RNA se daria em concentrações salinas mais elevadas do que a do DNA, demonstrando diferente resposta entre a competição de cátions inorgânicos com as moléculas do corante em complexos de RNA/proteínas em relação aos complexos DNA/proteínas.

Também de acordo com essa suposição, verificou-se a metacromasia no citoplasma das células glandulares em condições de tratamento com corante adicionado de soluções mais concentradas de $MgCl_2$, semelhante ao relatado em hepatócitos de camundongo e células epiteliais de *Triatoma infestans* (AMARAL & MELLO, 1989).

Destacaram-se também, além das regiões que formam os pufes de RNA, regiões que em determinados momentos do desenvolvimento larval sofrem amplificação gênica (aumento adicional de DNA), a partir das quais são formados os pufes de DNA (BREUER & PAVAN, 1955; PAVAN, 1965).

Os pufes de DNA desempenham um importante papel nos processos metabólicos em momentos que precedem a muda pupal (PAVAN, 1965; SIMÕES, 1970; LARA et alii, 1991). A maioria destes estão intimamente associados com a produção de grandes quantidades de proteínas específicas presentes na secreção salivar em curtos períodos de tempo. Por esta razão têm recebido grandes destaques, como nos trabalhos de WINTER, et alii (1977a,b; 1980); De TOLEDO et alii (1978); BONALDO, et alii (1979); LAICINE et alii (1980) e GLOVER (1982).

Tabela XIII - Regiões cromossômicas que correspondem a sítios ricos em ribonucleoproteínas e/ou sítios que originam pufes de RNA em momentos específicos do desenvolvimento larval de *Trichosia pubescens*.

Cromossomo	Regiões Cromossômicas
A	1G, 5A, 5C, 6C, 7A, 8D, 9C, 9E, 10A, 10B, 10F, 11A, 11H, 12C, 12F, 14B, 14C, 14E/14F, 15C, 19B, 19D/19E, 20E/20F, 21E, 21F, 22E, 23A, 23B, 23C, 23D/23F, 24E, 26B, 28Ca
B	2B, 3B, 4C, 5C, 10D, 11C, 13B/13E, 14E, 15A/15B, 15F, 16B, 17B, 17C, 18D, 19D, 20A, 20C, 20D, 21B, 21C, 23A, 23B, 24E, 25D
C	1C, 1G, 3B, 5A, 5B, 5C, 6C, 6D, 9D/9E, 10B, 10F, 11C, 15C, 16E/17A, 17E, 19A, 20A, 22A, 22B, 23D
X	3A, 3B, 5D, 6A, 7B, 8B, 11B, 11D, 12C, 13B/13C, 14B, 14C, 14F/15Aa, 15A, 16A, 16B, 16C, 16D, 17C, 17D, 18A, 19B, 20A, 21C, 22A, 22D, 23B, 23C

As regiões que originam os pufes de DNA em *Trichosia pubescens* são: A2Eb, A13Bb, A28AB e A28BbCa, no cromossomo **A**; B1DbEa, B3Cb, B5F, B6A, B18Ca e B25Cd, no cromossomo **B**; C1Ed, C2AbBa, C2Bb, C3Ca, C4B, C6Bc, C7B, C8A, C8Cb, C8Da, C10D, C13Ea, C18A, C21CbDa e C23Ab, no cromossomo **C**; X3C, X6B, X15Ab e X18Db, no cromossomo **X** (AMABIS, 1983a).

Com exceção das regiões C1E e C8A (não identificadas), algumas tiveram diferentes respostas ao longo da pufação, demonstradas nos valores estabelecidos de CEC em intervalos de concentrações de $MgCl_2$, nas fases em estudo. Presumivelmente, essas diferenças se devam ao comportamento das mesmas quanto a expansão e regressão dos pufes de DNA no decorrer do desenvolvimento e/ou quanto a atividade gênica nesses pufes.

No diagrama apresentado no **ANEXO 5** (AMABIS, 1983a), é possível notar o comportamento dos maiores pufes de DNA separadamente. Esses pufes se caracterizam por apresentarem um período de maior atividade, refletida em suas dimensões e no número dos mesmos, nas fases L_5 , L_6 , L_7 e P_1 . Nas fases seguintes (P_2 e P_3) há uma redução quanto ao número de pufes de DNA. No entanto, os pufes que se expandem tardiamente apresentam uma cinética de expansão e regressão mais rápida (FERREIRA, 1988).

Certas regiões que originam pufes de DNA tiveram em uma ou em duas fases do desenvolvimento, valores de CEC superiores em relação à outra(s) fase(s). É o caso das regiões A2Eb, A13B, A28A, A28B, B18C, C2A, C2B, C6B, C10D, C23A, X6B e X18D. Provavelmente, essas diferenças se devem às mudanças na composição e/ou

organização dos complexos nucleoprotéicos nessas regiões em decorrência de maior ou menor atividade gênica nas fases em estudo, durante o processo de pufação.

As regiões B3C (não identificada em P1), B5F, B6A, C3C, C7B, C18A e C21CD assumiram, nas 3 fases, valores de CEC entre as concentrações de $MgCl_2$ 0.30M e 0.50M. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de ter ocorrido alterações nos complexos nucleoprotéicos nessas regiões, uma vez que cada fase pode ter atingido a CEC em diferentes concentrações de $MgCl_2$ contidas nesse intervalo. Quanto às regiões B1DE, B25C, C4B, C8C, C8D, X3C e X15A não se pode assegurar que tenham tido diferentes valores de CEC, já que não foi pesquisada sua resposta ao método para valores de concentração de $MgCl_2$ acima de 0.50M, nas 3 fases estudadas.

Do exposto fica claro não haver um padrão único de mudanças em CEC ao longo da pufação para os vários pufes de RNA e DNA considerados, o que sugere sua complexidade e variações funcionais destes.

2- CEC de regiões heterocromáticas e/ou sub-replicadas

Dentre as regiões que apresentaram metacromasia quando os cromossomos foram tratados com solução corante adicionada de $MgCl_2$ 0.10M algumas correspondem a regiões heterocromáticas. As regiões heterocromáticas presentes nos cromossomos politênicos das glândulas salivares de *Trichosia pubescens* são: A16E, A17A, A17B, **A17C**, **A17D**, **A18A**, **A19A**, **A19B** e A22B, no cromossomo **A**; B2A, **B5F**, **B6A**, **B6C**, **B6D**, **B7A**, **B7B**, **B7C**, **B8A**, **B8B**, **B8C**, **B9A**, **B9C** e **B10A**, no cromossomo **B**; C10C/C10D, **C12C**, C12D, C12E, C12F e C14C, no cromossomo **C**; X10A, **X10B**, **X10C**, X11E e X16E/X17A, no cromossomo **X** (AMABIS, comunicação pessoal). Dentre as regiões citadas, as que aparecem destacadas em negrito correspondem aos pontos específicos de quebra desses cromossomos, interpretados por AMABIS (1974; 1983b) como "loci" sub-replicados.

O fato dessas áreas heterocromáticas apresentarem CEC mais elevada do que a maioria das áreas eucromáticas está de acordo com os dados para a heterocromatina de cromocentros comparada à eucromatina em *Triatoma infestans* (MELLO & VIDAL, 1989). Estes resultados têm sido admitidos como devido à diferenças em disponibilidade de fosfatos livres no DNA e em supra-organização cromatínica quando se comparam os estados de empacotamento desses dois tipos cromatínicos (MELLO & VIDAL, 1989).

RUDKIN (1965; 1969) em seus estudos com células politênicas da glândula salivar e células diplóides de gânglios cerebrais de *Drosophila melanogaster*, constatou através de medidas

microespectrofotométricas após reação de Feulgen, que os núcleos politênicos contêm significativamente menos DNA se todo este se duplicasse durante o processo de politenização. Essa diferença se deve ao atraso na replicação da heterocromatina. Assim, para RUDKIN (1969) o processo de sub-replicação é uma das características de heterocromatina de cromossomos politênicos. Além disso, durante o processo de politenização, o ritmo e o número de ciclos de replicação entre os 2 tipos de cromatina difere (BERENDES & KEYL, 1967). Dessa forma, têm-se dado grande atenção quanto ao processo de síntese não sincronizada de DNA ao longo de cromossomos politênicos (BERENDES 1966; MULDER *et alii*, 1968; SIMÕES, 1970; CORDEIRO, 1972; SANTELLI, 1974).

Em *Trichosia pubescens*, o último ciclo de replicação caracteriza-se por uma sincronização da síntese de DNA entre os núcleos, desencadeada pelo hormônio ecdisona (AMABIS, 1974). JANCZUR (dados não publicados, informação pessoal) se propôs então, a determinar o padrão de duplicação cromossômica após a injeção de ecdisona em vários tempos utilizando precursores de síntese de DNA. Dados embora preliminares, revelaram diferentes padrões de marcação, sendo que o padrão de marcação heterocromática predomina desde o início do tratamento. A interpretação dada a esses dados foi de que a síntese de DNA inicia-se primeiramente em regiões heterocromáticas logo após a indução pelo hormônio ecdisona, e em seguida, vão surgindo regiões com marcações graduais até que todo o cromossomo passe a sintetizar DNA. E ainda, que esse padrão de marcação se repete ao longo do desenvolvimento normal.

De acordo com os dados de JANCZUR (comunicação pessoal), as regiões que no decorrer do 4º estágio larval vão aparecendo com marcações graduais, descritas na Tabela I a IV são: A1E, A2A, A3F, A4C, A7D, A10G, A12H, A14F, A15E, A15F, A16A, A20A, A23F, A25G, A27D e A28C, no cromossomo A; B1D, B5A, B5C, B5E, B10C, B10H, B11B, B11G, B13A, B17A, B19A e B22B, no cromossomo B; C2A/C2B, C3C, C8D, C8F, C12A, C13A, C13F, C14D, C15D, C18D, C20B e C21A, no cromossomo C; X1D, X2D, X4A, X4E, X7A, X7E, X8A, X9C, X9D, X11A, X12G/X13A, X19A e X19E, no cromossomo X, além das regiões heterocromáticas anteriormete citadas.

Comparando-se os dados obtidos neste trabalho com os dados de JANCZUR (não publicados), notou-se que essas regiões tiveram variações nos valores de CEC, sugerindo que essas diferenças possam ser devidas ao processo de síntese de DNA particular às mesmas.

3- O papel do tratamento com RNase nos dados de CEC

O valor de CEC nos preparados tratados previamente à coloração com RNase diferiu em relação ao dos preparados que não foram submetidos ao tratamento enzimático, sendo superior nos primeiros. Dados semelhantes foram também obtidos em hepatócitos de camundongo e em células epiteliais de *Triatoma infestans* (AMARAL & MELLO, 1989). É possível que junto com a remoção do RNA haja ocorrido extração de proteínas que antes estariam bloqueando grupos fosfatos, passando a serem requeridas concentrações mais elevadas

de $MgCl_2$, para competirem com as moléculas do corante catiônico pelos sítios de ligação. A remoção de RNA poderia também trazer uma expansão da cromatina e maior exposição de seus grupos fosfatos de DNA à ação competitiva azul de toluidina- Mg^{2+} (AMARAL & MELLO, 1989).

Ainda, uma outra possibilidade a ser considerada diz respeito a formação de híbridos DNA-RNA nesses cromossomos. BUSEN e colaboradores (1982) demonstraram através da técnica de imunofluorescência indireta a distribuição de híbridos DNA-RNA nos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens*. A maior parte desses híbridos seriam originados nas regiões ativas, pela hibridização de RNA recém-sintetizado com o DNA molde, desnaturado sob certas condições de fixação. Esta reação seria muito rápida devido à proximidade e ao tipo de ligação, através da RNA polimerase, do RNA recém-sintetizado ao DNA molde e/ou decorrente da grande quantidade de RNA em se tratando de uma região cromossômica ativa (FERREIRA, 1988).

Já cromossomos fixados com formaldéido não revelaram padrões distintos de fluorescência, ao contrário dos cromossomos fixados em etanol-ácido acético (3:1). Quando esses cromossomos fixados em etanol-ácido acético (3:1) foram tratados com RNase, a reação com o anticorpo foi totalmente negativa (BUSEN *et alii*, 1982; FERREIRA, 1988). Portanto, ao se extrair o RNA nos cromossomos fixados em etanol-ácido acético (3:1) não ocorreria a formação desses híbridos, e o DNA manteria a sua configuração de dupla hélice, tendo assim um tipo de resposta diferente em relação

aos cromossomos não tratados previamente à coloração com RNase.

Nas tabelas V a VIII, do presente trabalho pôde-se verificar dados comprobatórios de que regiões anteriormente descritas como ricas em RNA, teriam valores de CEC em concentrações mais altas. Nesta situação, o comportamento dessas regiões se deve à estrutura e/ou organização do DNA cromossomal que como já foi comentado, comportar-se-ia de maneira diferente.

Contudo, não se exclui a possibilidade de que a detecção de CEC mais elevadas nessas regiões em preparados não tratados com RNase tenha sido somente devida ao RNA. É possível também, que além da presença do RNA nesses sítios cromossômicos, a própria estrutura do DNA cromossomal tenha contribuído para isso, uma vez que o processo de pufação envolve modificações na estrutura cromatínica. As regiões envolvidas na formação de um pufe sofrem uma descompactação, resultando numa alteração na composição das proteínas histônicas como também nas não histônicas, alterando a conformação cromatínica.

4- A CEC em preparados fixados em paraformaldeído a 1.75%

Como era de se esperar, o valor estabelecido de CEC em preparados fixados com paraformaldeído 1.75% foi superior ao obtido nos preparados fixados em etanol-ácido acético (3:1). A técnica de esmagamento em material fixado com etanol-ácido acético é de grande aplicabilidade em estudos cromossômicos por permitir romper facilmente a membrana celular e nuclear. No entanto, o etanol-ácido acético extrai muitas proteínas histônicas, ribossomais e proteínas não histônicas, resultando em mudanças significativas, como o rompimento da estrutura cromatínica (LARSON *et alii*, 1988).

Por outro lado, nos preparados fixados com solução de paraformaldeído a 1.75%, e em seguida, ácido acético, é dificultado o rompimento da membrana nuclear, durante o processo de esmagamento, embora apresente a vantagem de que são retidas as proteínas e praticamente mantida a mesma estrutura cromatínica (HILL *et alii*, 1987). Neste caso seria dificultada a competição entre as moléculas do corante com os íons Mg^{2+} , resultando na necessidade de concentrações mais elevadas de $MgCl_2$, como se comprovou neste trabalho.

5- Dados de CEC após utilização da variante do método

A variante do método de CEC foi proposta para visualizar o nucléolo e suas mudanças estruturais ao nível da microscopia de luz, graças à diferente resposta ao método apresentada por RNA em comparação ao DNA (MELLO *et alii*, 1993). O uso desta variante, nos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens*, foi proposto com a intenção de se destacar regiões ricas em ribonucleoproteínas e de compará-las com os resultados do método tradicional. Contudo, constatou-se que a concentração de $MgCl_2$ 0.05M usada em outros materiais (MELLO *et alii*, 1993), não foi ideal para abolir a metacromasia dos complexos DNA/proteínas dos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* (Tabelas IX a XIII). Possivelmente, para evidenciação de complexos RNA/proteínas neste material a concentração adequada esteja entre 0.05 - 0.08M, conforme pareceu indicar um teste realizado em paralelo.

Grânulos metacromáticos

Os grânulos detectados em associação ou na proximidade aos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens* e destacados em várias figuras apresentadas para diferentes condições de tratamento neste trabalho, parecem corresponder a micronúcleolos (AMABIS, 1983b).

Em diferentes espécies da família Sciaridae, o material nucleolar é formado por subunidades menores (micronúcleolos) aglomeradas, que durante o processo de esmagamento das glândulas salivares espalham-se no nucleoplasma ou se associam à regiões cromossômicas específicas, como as regiões teloméricas e heterocromáticas (De LUCCHINI *et alii*, 1982; DESSEN & PERONDINI, 1991; GORAB, 1991).

BEDO (1992) demonstrou que em células tricógenas de *Lucilia cuprina* e *Chrysomya bezziana*, ambas da família Calliphoridae, o material nucleolar fragmenta-se em muitas partes, durante o processo de politenização, aparecendo disperso no nucleoplasma. A fragmentação do nucléolo ocorreria progressivamente com o aumento da politenização.

Estudos realizados através de hibridização "in situ" e endógena, como também incorporação de uridina, revelaram que os micronúcleolos e/ou fragmentos nucleolares contêm sequências complementares a rDNA e com certa atividade transcricional (ANANIEV *et alii*, 1981; De LUCCHINI *et alii*, 1982; KALAMUCK *et alii*, 1990; DESSEN & PERONDINI, 1991; GORAB, 1991; BEDO, 1992 e outros).

Em *Trichosia pubescens*, tem sido relatado que as sequências complementares a rDNA hibridizam fortemente com a região 10 do cromossomo **X**, bem como com as regiões 17 e 13 dos cromossomos **A** e **C**, respectivamente. No cromossomo **B**, os micronúcleolos raramente foram observados em alguns "loci" cromossômicos (GORAB, 1991). Esses dados sugerem que os grânulos metacromáticos que apareceram associados com certos sítios cromossômicos correspondam a essas estruturas com marcações, contendo portanto, além de RNA, rDNA. De fato, o valor de CEC para esses grânulos foi mais elevado do que para a maioria das regiões cromossômicas que em 0.10M de $MgCl_2$ atingiram a CEC. Além disso, os micronúcleolos em preparados tratados com RNase continuaram a exibir basofilia, embora mais fraca e aparentemente ocupando menor área da estrutura. Finalmente, dados nossos não publicados, indicam que os micronúcleolos se revelaram Feulgen-positivos e exibiram padrões de birrefringência após coloração com azul de toluidina, típicos de complexos DNA-proteína (ALMEIDA *et alii*, 1974; VIDAL, 1979).

O valor de CEC dos micronúcleolos, submetidos ao tratamento enzimático ao contrário do que aconteceu na maioria das bandas eucromáticas, foi inferior em relação aos não tratados previamente com RNase. Certamente, isso ocorreu devido à remoção de ribonucleoproteínas (RNP), neles presentes.

Para GORAB (1991), baseando-se em seus resultados obtidos através da hibridização "in situ" e endógena, tanto em *Trichosia pubescens* como em outras espécies de sciarídeos, as sequências complementares a rDNA não fariam parte integrante das regiões

cromossômicas específicas e sim dos micronucléolos que se encontram associados a elas. Assim, as sequências contidas nos micronucléolos não teriam origem nessas regiões.

A presença de genes ribossomais não integrados em glândulas salivares de *Sciara coprophila* representa 1/3 do rDNA total (De LUCCHINI, *et alii*, 1982). Alguns autores sugerem que a presença de rDNA extracromossomal e formação de micronucléolos estejam relacionados a uma possível sub-replicação desses genes durante o processo de politenização. Esta sub-replicação durante o processo de politenização estaria ligada a um mecanismo de amplificação fora deste processo para restabelecer a quantidade de rDNA presente em núcleos diplóides (De LUCCHINI, *et alii*, 1982; BEDO, 1992).

CONCLUSÕES

1- A maioria das regiões dos cromossomos politénicos de *Trichosia pubescens*, nas fases L₅, L₇ e P₁ do desenvolvimento, e após fixação por etanol-ácido acético (3:1) apresentou o mesmo valor de CEC, medido em molaridade de Mg²⁺, ou seja 0.10M. A CEC foi considerada atingida quando a metacromasia usualmente observada com a coloração pelo azul de toluidina a pH 4.0 foi abolida. No caso, o valor constatado foi dos mais baixos já relatados, o que deve estar relacionado ao estado particular de organização cromatínica deste sistema.

2- CEC superior a 0.10M foi detectada em sítios cromossômicos ricos em ribonucleoproteínas e/ou sítios que estariam transcrevendo (pufes de RNA e pufes de DNA).

3- Tanto para as regiões que formam os pufes de RNA como para aquelas que formam os pufes de DNA constatou-se não haver um padrão único de mudanças em CEC ao longo da pufação, sugerindo a complexidade e as variações funcionais desses pufes.

4- Também as regiões heterocromáticas e/ou sub-replicadas, apresentaram valores de CEC mais elevados do que a maioria das regiões eucromáticas desses cromossomos. As variações nos valores de CEC nessas regiões são atribuídas aos diferentes níveis de condensação cromatínica e também, possivelmente, ao processo de síntese não sincronizada de DNA ao longo desses cromossomos.

5- O tratamento por RNase, anterior à coloração, tornou os valores de CEC mais elevados, de modo semelhante ao que já foi descrito para cromatina de outros organismos e atribuído à re-estruturação dos complexos nucleoprotéicos ou não formação de híbridos DNA-RNA.

6- A fixação pelo paraformaldeído a 1.75%, que melhor preserva a composição em proteínas dos cromossomos politênicos provocou elevação de CEC em comparação aos resultados obtidos após fixação em etanol-ácido acético (3:1).

7- No método variante de CEC, proposto para evidênciação de complexos ribonucleoprotéicos em *Drosophila araccataca*, a concentração de $MgCl_2$ 0.05M mostrou-se insuficiente para abolir a metacromasia dos complexos DNA/proteínas dos cromossomos de *Trichosia pubescens*, sugerindo diferenças na organização cromatínica desses dois tipos de cromossomos politênicos.

8- Grânulos distribuídos ao longo dos cromossomos ou associados a certas regiões cromossômicas e interpretados como micronucléolos, contendo rDNA além de RNA, exibiram valor de CEC superior em relação à maioria das regiões cromossômicas. Nos micronucléolos, ao contrário do que aconteceu na maioria das regiões cromossômicas, os valores de CEC decresceram após tratamento com RNase. Isto demonstra que nos micronucléolos o RNA é o principal componente a contribuir com sítios de ligação ao

corante catiônico e que sua remoção não provocou uma re-estruturação de complexos DNA-proteína ao menos tão drástica ou perceptível como sugerida para a cromatina propriamente dita.

RESUMO

A concentração crítica de eletrólitos (CEC) da cromatina, considerada como a concentração salina na qual o fenômeno de metacromasia é abolido, numa situação em que se emprega azul de toluidina como corante catiônico e íons Mg^{2+} como cátions inorgânicos, foi determinada em cromossomos politênicos de glândulas salivares do sciarídeo *Trichosia pubescens*, nas fases L_5 , L_7 e P_1 do desenvolvimento larval. O objetivo era determinar se os valores de CEC variavam em áreas cromossômicas com diferente supra-estrutura e/ou composição nucleoprotéica.

Constatou-se que a maioria das regiões cromossômicas em preparados fixados em etanol-ácido acético atingiram a CEC na concentração de $MgCl_2$ 0.10M e que sítios cromossômicos ricos em ribonucleoproteínas e/ou pufes de RNA e DNA exibiram valores superiores de CEC. Não foi detectado um padrão único de mudanças em valores de CEC ao longo da pufação, sugerindo-se complexidade e variações funcionais para tais pufes. As regiões heterocromáticas e/ou sub-replicadas também tiveram valores de CEC superiores a 0.10M devido aos seus diferentes níveis de condensação cromatínica, ou ao processo de síntese não sincronizada de DNA em comparação a outras regiões dos cromossomos.

Os valores de CEC em cromossomos tratados com RNase foi mais elevado em decorrência da re-estruturação dos complexos nucleoprotéicos ou não formação de híbridos de DNA-RNA. O valor de CEC em cromossomos fixados em paraformaldeído foi superior aqueles obtidos nos preparados fixados em etanol-ácido acético (3:1), certamente devido ao diferente nível de preservação de proteínas

promovido por estes fixadores.

Numa variante do método de CEC, proposta para evidenciação de complexos ribonucleoprotéicos, a concentração de 0.05M de $MgCl_2$ não foi ideal para cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens*, diferindo de resultados já reportados para cromossomos politênicos de *Drosophila aracataca*.

Micronucléolos distribuídos ao longo dos cromossomos ou dispersos no nucleoplasma, tiveram valores de CEC superiores em relação aos da maioria das regiões cromossômicas. Estes valores decresceram após tratamento com RNase, demonstrando que o RNA é o principal componente a contribuir com sítios de ligação às moléculas de azul de toluidina nessa estrutura.

ABSTRACT

The critical electrolyte concentration (CEC) of chromatin, measured as the saline concentration which metachromasy is abolished, when employing toluidine blue as a cationic dye and Mg^{2+} ions as inorganic cations, was determined for the polytene chromosomes of salivary glands of the sciarid *Trichosia pubescens*. The L_5 , L_7 and P_1 phases of larval development were studied. The objective was to determine the CEC values for various chromosome areas with different supra-structure and/or nucleoprotein composition.

Most of the chromosome regions in preparations fixed with acetic acid-ethanol (1:3) attained the CEC concentration of 0.10M $MgCl_2$. Areas rich in ribonucleoprotein (RNP) and/or RNA and DNA puffs displayed high CEC values. A singular regular pattern of CEC values was not detected during puff development which, suggests the complexity and variable functions to these puffs. Heterochromatic and/or sub-replicated regions had CEC values above 0.10M due to their different levels of chromatin condensation, or to the non synchronized process of DNA syntheses in comparison with the other chromosome regions.

The CEC value of chromosomes treated with RNase was higher as a result of the re-organization of nucleoprotein complexes or the non formation of DNA-RNA hybrids. The CEC value of paraformaldehyde fixed chromosomes was higher than that attained in the acetic acid-ethanol (1:3) fixed preparations, clearly due to the different levels of protein preparation confirmed by these fixatives.

In a variant of the CEC method, proposed to identify nucleoprotein complexes, the concentration of 0.05M $MgCl_2$ was not ideal for polytene chromosomes of *Trichosia pubescens*, which differs from results already reported for *Drosophila araccata* polytene chromosomes.

Micronucleoli distributed along of the chromosomes or dispersed in the nucleoplasm had higher CEC values in relation to most of the chromosome regions. These values decrease after RNase treatment, demonstrating that RNA is the principal component which contributes binding sites for toluidine blue molecules in this structure.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.C.; VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. Chromosome connective filaments: DNA and RNA syntheses and macromolecular stereo-arrangement. **Annls. Histochem.**, **19**(1): 35-45, 1974.
- ALONSO, P. & PEREZ-SILVA, J. Giant chromosomes in protozoa. **Nature**, **205**: 313-14, 1965.
- AMABIS, D.C. **Efeito da ecdisterona sobre o padrão de pufes dos cromossomos politênicos de glândulas salivares de *Trichosia pubescens***. São Paulo: USP, 1977 69p.
Dissertação (Doutorado em Biologia). Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- & AMABIS, J.M. Effects of ecdysterone in polytene chromosomes of *Trichosia pubescens*. **Dev. Biol.**, **102**: 1-9, 1984a.
- & ----- . Hormonal control of gene amplification and transcription in the salivary gland chromosomes of *Trichosia pubescens*. **Dev. Biol.**, **102**: 10-20, 1984b.
- AMABIS, J.M. DNA-puffing patterns in the salivary glands of *Trichosia pubescens* (Diptera-Sciaridae). **Genetica**, **62**: 3-13, 1983a.

- . Estudos dos cromossomos politênicos de *Trichosia pubescens*. São Paulo: USP, 1974. 110 p. Dissertação (Doutorado em Biologia). Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- . The polytene chromosomes of the salivary gland of *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae) **Rev. Bras. Genet.**, 6(3): 415-24, 1983b.
- . & JANCZUR, C. Experimental induction of gene activity in the salivary gland chromosomes of *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae). **J. Cell Biol.**, 78: 1-7, 1978.
- AMARAL, M.J.L.V. & MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of heterochromatin and euchromatin in cells of starved animals. **Cytobios**, 59: 159-65, 1989.
- ANANIEV, E.V.; BARSKY, V.E.; ILYIN, Y.V. & CHURIKOV, N.A. Localization of nucleoli in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. **Chromosoma** 81: 619-28, 1981.

- ANDRIOLI, L.P.M. & AMABIS, J.M. Clones com sequências complementares a pufes de DNA expressam proteínas da secreção salivar em *Trichosia pubescens* (Díptera: Sciaridae). **Rev. Bras. Genet.**, 14(3) suppl.255, 1991.
- ASHBURNER, M. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. **Adv. Insect Physiol.**, 1: 1-95, 1970.
- & BERENDES, H. D. Puffing of polytene chromosomes. In: ----- & WRIGHT, T.R.F. **The Genetics and Biology of *Drosophila***. Academic, 1978, cap. 14, 316-76.
- BEDO, D.G. Nucleolar fragmentation in polytene trichogen cells of *Lucilia cuprina* and *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae). **Genome**, 35: 283-93, 1992.
- BEERMANN, W. Chromomeres and genes. In: ----- **Developmental studies on giant chromosomes**. New York, Springer-Verlag, 1972, cap. 1, p.1-33.
- . Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. **Cold Spring Harbor. Symp. quant. Biol.**, 21: 217-32, 1956

----- & BAHR, G.F. The submicroscopic structure of the Balbiani-ring. **Exp Cell Res.**, 6: 195-201, 1954.

BELETTI, M.E. & MELLO, M.L.S. Detecção de anomalias ao nível do complexo DNA-proteína em espermatozóides de touro. **Rev. Bras. Genet.**, 14(3)suppl: 207, 1991.

BERENDES, H.D. The control of puffing in *Drosophila hydei*. In: BEERMANN, W. **Developmental studies on giant chromosomes**. Springer-Verlag, New York, 1972, cap 6, 181-207.

----- . Differential replication of male and female X chromosomes in *Drosophila hydei*. **Chromosoma**, 20: 32-43, 1966.

----- . Factors involved in the expression of gene activity in polytene chromosomes. **Chromosoma**, 24: 418-37, 1968.

----- & KEYL, H.G. Distribution of DNA in heterochromatin and euchromatin of polytene nuclei of *Drosophila hydei*. **Genetics**, 57: 1-13, 1967.

- BONALDO. M.F.; SANTELLI, R.V.; LARA, F.J.S. The transcript from a DNA puff of *Rhynchosciara* and its migration to the cytoplasm. **Cell**, **17**: 827-33, 1979.
- BRACHET, J. The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. **Q. Jl. microsc. Sci.**, **94**: 1-10, 1953.
- BREUER, M.E. & PAVAN, C. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. **Chromosoma**, **7**: 317-86, 1955.
- BRITTO, C.M.C. & MELLO, M.L.S. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of "pé-duro" bulls. **Rev. Bras. Genet.**, **11**(2): 349-54, 1988.
- BUSEN, W.; AMABIS, J.M.; LEONCINI, O.; STOLLAR, B.D. & LARA, F.J.S. Immunofluorescent characterization of DNA-RNA hybrids on polytene chromosomes of *Trichosia pubescens* (Diptera:Sciaridae). **Chromosoma**, **87**: 247-62, 1982.
- CASSAGNAU, P. Sur la structure des chromosomes salivares de *Bilobella massoudi* Cassegnau (Collembola:Neanuridae). **Chromosoma**, **24**: 42-58, 1968

- CAVALHEIRA, G.G. & GUERRA, M. Cromossomos politênicos em células do tapete da antera de *Vigna unguiculata* (L.) WALP. **Rev. Bras. Genet.**, 14(3) Suppl.: 84, 1991.
- CORDEIRO, M. **Replicação de DNA em cromossomo politêncio de *Rhynchosciara americana***. São Paulo: USP, 1972 103p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- CUNHA, P.R. & AMABIS, J.M. Análise da indução de atividade gênica por "heat shock" em cromossomos politênicos de sciarídeos. **Rev. Bras. Genet.**, 14(3) suppl.: 254, 1991.
- DANTAS, M.M **Efeitos de choques de temperatura sobre fenótipos nucleares de *Triatoma infestans* Klug, em condições de insetário da SUCEN de Mogi Guaçu, S.P.** Campinas: UNICAMP, 1990, 89 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.
- De LUCCHINI, S.; GERBI, S.A.; CARRI, M.T. Extrachromosomal ribosomal DNA in polytene nuclei of *Sciara coprophila*. **J. Cell Biol.**, 95: 212a, 1982.

- DESSEN E.M.B. & PERONDINI, A.L.P. Nucleolar subunits in the salivary gland nuclei of *Sciara ocellaris* (Diptera: Sciaridae). **Rev. Bras. Genet.**, **14**(3): 673-83, 1991.
- De TOLEDO, S.M. & LARA, F.J.S. The translation of messages transcribed from "DNA puffs" of *Rhynchosciara* **Biophys. Res. Commun.**, **85**: 160-66, 1978.
- ELGIN, S.C.R.; AMERO, S.A.; EISSENBERG, J.C.; FLEISCHMANN, G.; GILMOUR, D.S. & JAMES, T.C. Distribution patterns of nonhistone chromosomal proteins on polytene chromosomes: functional correlations In: GUSTAFSON, J.P. & APPELS, R. **Chromosomes structure and function impact of new concepts**. New York, Plenum, 1988.
- FERREIRA, J.F. **Pufes de DNA de *Trichosia pubescens* (Diptera:Sciaridae) e a sua relação com a síntese de proteínas**. São Paulo: USP, 1988. 140 p. Dissertação (Doutorado em Biologia). Instituto de Biociências, da Universidade de São Paulo.
- FICQ, A. & PAVAN, C. Autorradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. **Nature**, **180**: 983-84, 1957.

- GABRUSEWYCZ-GARCIA, N. Cytological and autorradiographic studies in *Sciara coprophila* salivary chromosomes. **Chromosoma**, 15: 312-44, 1964.
- GLOVER, D.M.; ZAHA, A.; STOCKERK, A.J.; SANTELLI, R.V.; PUEYO, M.T.; De TOLEDO, S.M.; LARA, F.J.S. Gene amplification in *Rhynchosciara* salivary gland chromosomes. **Proc natn Acad.Sci U.S.A.**, 79: 2947-51, 1982.
- GORAB, E. **Detecção de sequências específicas em cromossomos politênicos de espécies da família Sciaridae (Diptera).** São Paulo: USP, 1991. 75 p. Dissertação (Mestrado em Biologia). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- . DIEZ, J.L.; AMABIS, J.M. Atividade transcricional de sequências repetitivas em díptera. **Rev. Bras. Genet.** 14(3)suppl: 254, 1991.
- HILL, R.J.; MOTT, M.R. & STEFFENSEN, D.M. The preparation of polytene chromosomes for localization of nucleic acid sequences, proteins and chromatin conformation. **Int. Rev. Cytol.**, 108: 61-118, 1987.

JAMIRICH, M; GREENLEAF, ARNO, L.; BAUTZ, E.K.F.

Localization of RNA polimerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, **74**(5): 20079-83, 1977.

KALAMUCK, K.E.; WETZEL, F.L.; PROCNIER, J.D. Relative abundance of various rDNA repeat types in polytene nuclei of *Drosophila melanogaster*. **Genome**, **33**: 240-46, 1990.

KIERNAN, J.A. **Histological & Histochemical Methods: theory & practice**. 2^o ed. Ontario Pergamon Press, 1990. 433p.

KORGE, G. Polytene chromosomes. In: HENNIG, G.W. **Structure and function of eukaryotic chromosomes (Results and problems in cell differentiation)**. Berlin, Springer-Verlag, 1987 v. 14 cap. 3 p. 27-58.

LAICINE, E.M.; ALVES, M.A.; ALMEIDA, J.C.; RIZZO, E.; ALBERNAZ, W.C. & SAUAIA, H. Developmental of DNA puffs patterns of polypeptide synthesis in the salivary glands of *Bradysia hygida*. **Chromosoma**, **89**: 280-84, 1984.

LARA, F.J.S.; STOCKER, A.J.; AMABIS, J.M. DNA sequence amplification in sciarid flies results and perspectives. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **24**: 233-248, 1991.

LARSON, M.L.P.; ALMEIDA, J.C.; ALVES, M.A.R. & SAUAIA, W.

The effect of perchlorid and fixation on DNA preservation in the salivary gland of *Bradysia hygida*. **Gegenbaurs Morphol. Jahrb.**, **134** (6): 933-40, 1988.

LISON, L. Acides nucléiques, nucleoproteínes, nucleotides.

In: ----- . **Histochemie et citochemie animales**. Paris, Gauthier Villars, 1960 v.1 cap. 12 p. 355-97.

MELLO, M.L.S. **Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero- e eucromatina**. Campinas: UNICAMP, 1976, 211 p. Dissertação (Livre-docência). Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

----- . Induced metachromasia in bull spermatozoa
Histochemistry, **74**: 387-92, 1982.

----- & VIDAL, B.C. Acid lability of
deoxyribonucleic acids of some polytene chromosome
regions of *Rhynchosciara americana*. **Chromosoma**, **81**:
419-29, 1980a.

- & ----- . Changes in anisotropic and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper, *Staurorhectus longicornis* Giglio-Toss. **Adv. Insect Reprod.**, 1: 75-83, 1977.
- & ----- . Critical electrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, 59: 87-93, 1989.
- & ----- . Linear dichroism and anomalous dispersion of the birefringence on sperm heads. **Acta Histochem.**, 45: 104-14, 1973.
- & ----- . Padrões de basofilia em cromossomos politênicos de *Rhynchosciara americana* **Ciênc. Cult.(S. Paulo)**, 31(7): 604, 1979.
- & ----- . **Práticas de Biologia Celular.** Edgard Bluecher. São Paulo, 1980b, 71p.
- & PRETTI, M.C. The salivary secretion of spinning larvae of *Rhynchosciara americana*. **Protoplasma**, 102: 349-60, 1980.

- ; RAIMUNDO, H.H.; PRETTI, M.C. Action of hycanthone methaensulfonate on chromatin basophilia on anisotropy in onion meristems. **Cytologia**, **43**: 397-404, 1978.
- ; VIDAL, B.C.; DANTAS, M.M. & MONTEIRO, A.L.P. Visualization of the nucleolus with a critical electrolyte concentration method. **Acta Histochem. Cytochem.** , **26**: , 1993.
- METZ, C.W. Structure of the salivary gland chromosome in *Sciara*. **J.Hered.**, **26**: 177-88, 1935.
- MILLAR, S.; HAYWARD, D.C.; READ, C.A.; BROWNE, M.J.; SANTELLI, R.V.; VALLEJO, F.G.; PUEYO, M.T.; ZAHA, A.; GLOVER, D.M. & LARA, F.J.S. Segments of chromosomal DNA from *Rhynchosciara americana* that undergo additional rounds of DNA replication in the salivary gland DNA puffs have only weak ARS activity in yeast. **Gene**, **34**: 81-6, 1985.
- MORGANTE, J.S. Three new species of Brazilian Sciaridae (Diptera: Nematocera). **Rev. Bras. Biol.**, **29**: 571-76, 1969.

- MULDER, M.P. van DUYN, P. & GLOOR, H.J. The replicative organization of DNA in polytene chromosomes of *Drosophila hydei*. **Genetica**, **39**: 385, 1968.
- NAGL, W. Banded polytene chromosomes in the legume *Phaseolus vulgaris*. **Nature**, **221**: 70-71, 1969.
- PAVAN, C. Nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and the problem of differentiation. **Brookhaven Symp. Biol.**, **18**: 222-41, 1965.
- & BREUER, M.E. Differences in nucleic acid content of the loci in polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae*, according to tissues and larval stages. In: **Simpósio sobre secreção celular**. Belo Horizonte, 1955, B.H., G. Schreiber, 1955. p 90-99.
- PELLING, C. A replicative and synthetic chromosomal unit the modern concept of the chromomere. **Proc R. Soc.**, **164**: 279-89, 1966.
- RECCO-PIMENTEL, S.M. & MELLO, M.L.S. Characterization of the heterochromatin of *Drosophila nebulosa*. **Cytobios**, **48**: 111-24, 1986.

-----; -----.; VIDAL, B.C. Metachromasia and anisotropy of polytene chromosomes subjected to a C-banding isopropanol treatment. **Cell. Mol. Biol.**, **28**(1): 79-83, 1982.

RUDKIN, G.T. Non-replicating DNA in giant chromosomes. **Genetics**, **52**: 470, 1965

----- . Non replicating DNA in *Drosophila* **Genetics** (Suppl), **61**: 227-38, 1969.

----- . Replication in polytene chromosomes. In: BEERMANN, W. **Developmental studies on giant chromosomes**. New York Springer-Verlag, 1972. cap. 3, p. 58-80.

SANTELLI, G.M.M. **Aspectos da fisiologia dos cromossomos politênicos de *R. angelae* no fim do 4º estadio larval**. São Paulo: USP, 1974 126p. Dissertação (Doutorado). Departamento em Biologia do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

SAUAIA, H.; LAICINE, E.M.; ALVES, M.A.R. Hydroxyures induced inhibition of DNA puff development in the salivary gland chromosomes of *Bradysia hygida*. **Chromosoma**, **34**: 129-51, 1971.

SCOTT, J.E. Affinity, competition and specific interaction in the biochemistry of polyelectrolytes. **Biochem. Soc. Trans.**, 1: 787-806, 1973.

----- . Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues. In: GLICK, D. **Methods of biochemical analysis**. New York Interscience, 1960. v.8, p. 145-97.

----- . Critical Electrolyte Concentration (CEC) effects in interactions between acid glycosaminoglycans and organic cations and polycations. In: BALAZARS, E.A. ed. **Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix**. London Academic, 1970 v.2.

----- & DORLING, J. Differential staining of acidic glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. **Histochemie**, 5:221-33, 1965.

----- & STOCKWELL, R.A. On the use and abuse of the critical electrolyte concentration approach to the localization of tissue polyanions. **J. Histochem.**, 15: 111-3, 1967.

- SIMÕES, L.C.G. Studies on DNA synthesis during larval development of *Rhynchosciara* sp. **Rev. Bras. Biol.**, **30**(2): 191-99, 1970
- SIMONI, I.C. & MELLO, M.L.S. Investigation of hycanthone binding to DNA in chromatin with different supra-organization, composition, and function. **Acta Histochem.**, **79**: 97-105, 1986.
- VIDAL, B.C. Cromossomos politênicos: diferenças estruturais reveladas pela basofilia metacromática. **Ciênc.Cult. (São Paulo)**, **27**(1): 54-06, 1975.
- . Métodos em biologia celular. In: VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. **Biologia Celular**. São Paulo, Atheneu, 1987. cap. 2, p. 5-34.
- . The effect of clupein on anisotropy and basophilia of polytene chromosomes. **Histochemistry**, **60**: 309-16, 1979.
- . Variation in dry mass concentrations and protein contents in DNA puffs. **Caryologia**, **30**(1): 69-76, 1977.

----- & MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes "in vitro". *Acta Histochem. Cytochem.*, **22**(4): 471-78, 1989.

WHITE, M.J.D. Os cromossomos politênicos e plumosos. In: WHITE, M.J.D. *Os Cromossomos*. São Paulo Edusp, 1977. cap 5, p. 59-70.

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

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

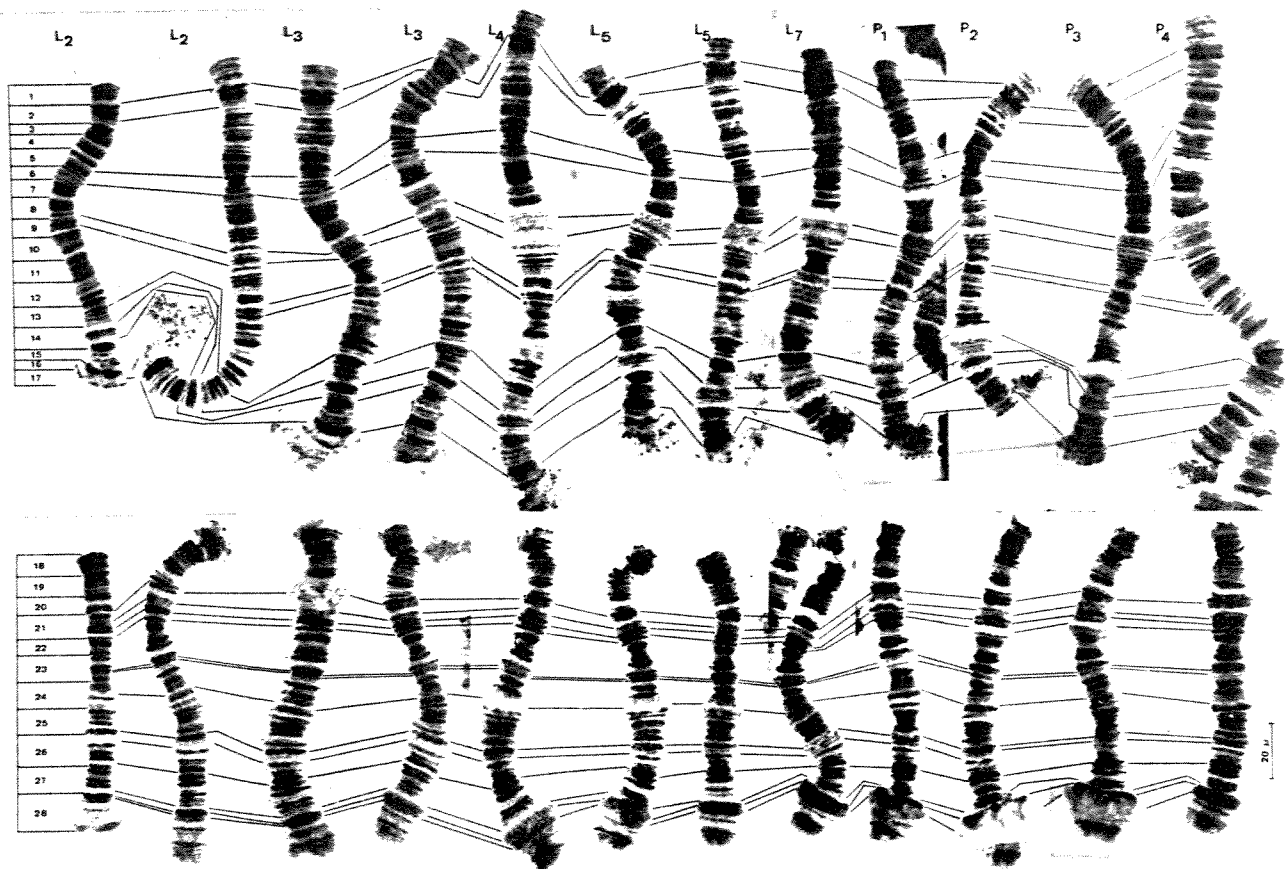
-----; De BIANCHI, A.G.; TERRA, W.R. & LARA, F.J.S.

The giant DNA puffs of *Rhynchosciara americana* code for polypeptides of the salivary gland secretion. **J. Insect Physiol.**, 23: 1455-59, 1977b.

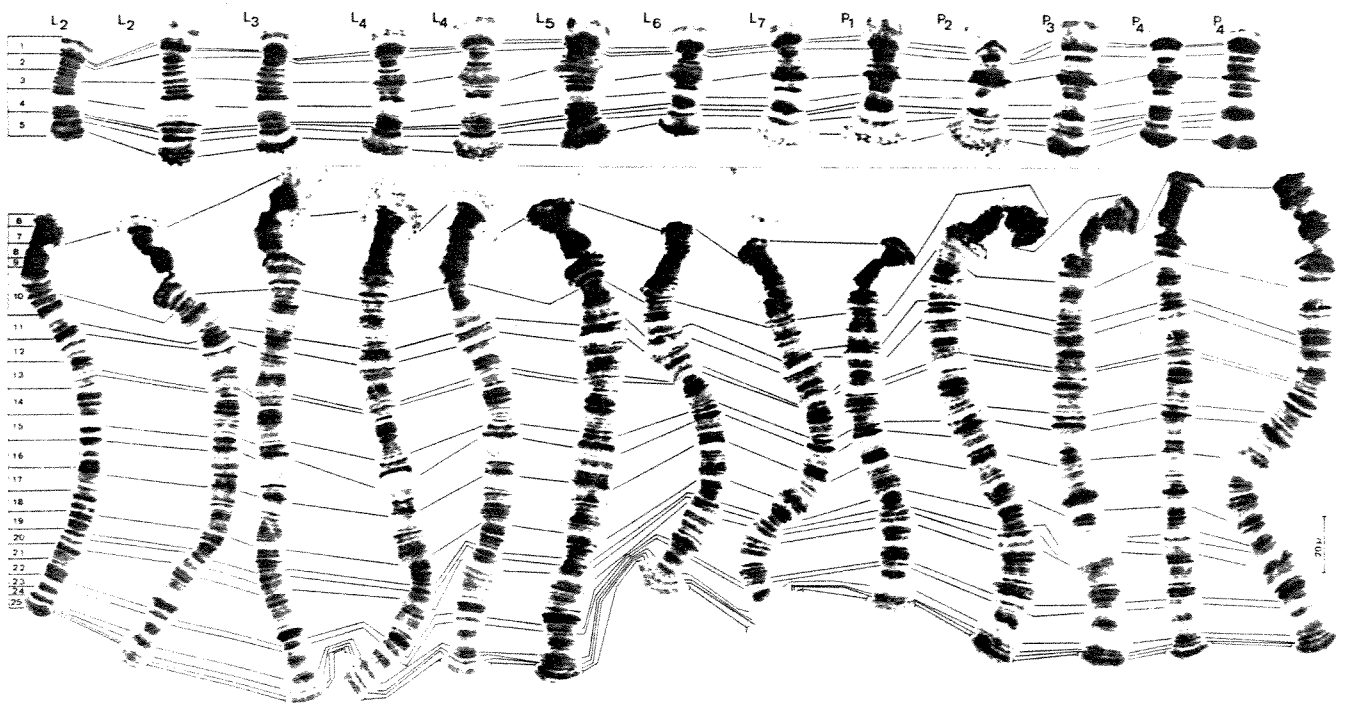
ZAHA, A.; LEONCINI, O.; STOCKER, A.J.; HOLLENBERG, C.P. & LARA, F.J.S. Hybridization of poly (A)+ RNA from salivary glands of *Rhynchosciara americana* to restriction DNA fragments and polytene chromosomes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 17: 257-64, 1984.

ANEXOS

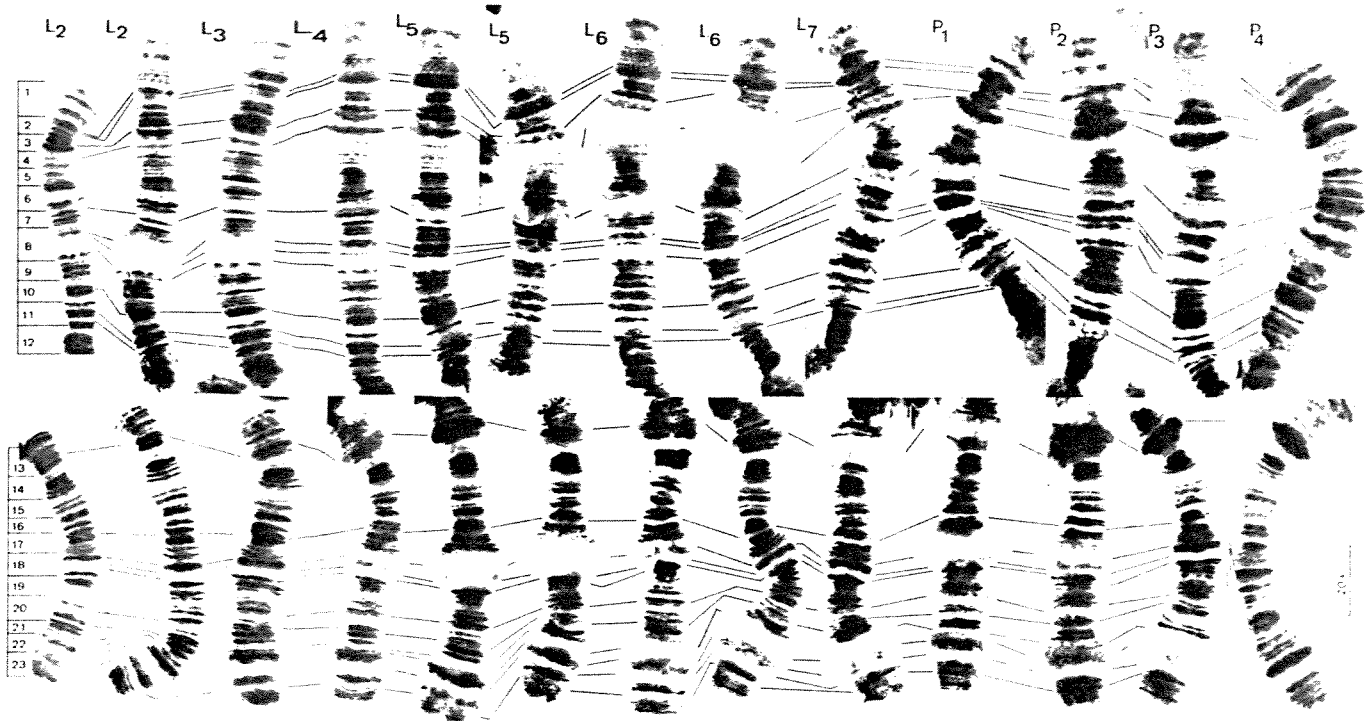
ANEXO 1 - Cromossomo politênico A da glândula salivar de *Trichosia pubescens*, nas diferentes fases do desenvolvimento larval, fixado em etanol-ácido acético e corado com orceína lacto-acética (AMABIS, 1983a).



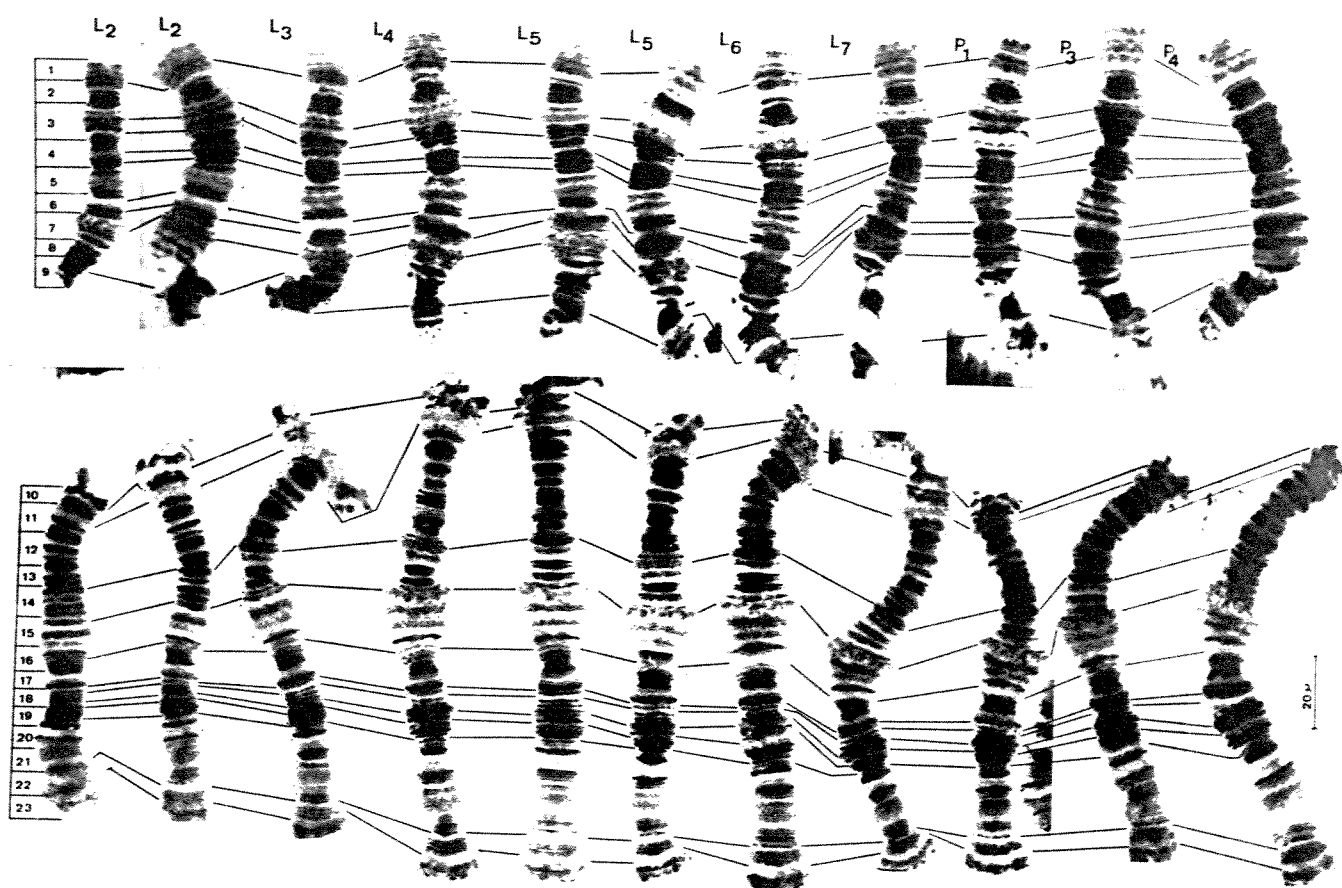
XO 2 - C I omossomo politênico B da glândula salivar de
T r i chosia pubescens, nas diferentes fases do
d e s envolvimento larval, fixado em etanol-ácido
a c é tico e corado com orceína lacto-acética
(A M ABIS, 1983a).



ANEXO 3 - Cromossomo politênico c da glândula salivar de *Trichosia pubescens*, nas diferentes fases do desenvolvimento larval, fixado em etanol-ácido acético e corado com orceína lacto-acética (AMABIS, 1983a).



ANEXO 4 - Cromossomo politênico x da glândula salivar de *Trichosia pubescens*, nas diferentes fases do desenvolvimento larval, fixado em etanol-ácido acético e corado com orceína lacto-acética (AMABIS, 1983a).



ANEXO 5 - Representação diagramática do comportamento dos maiores pufes de DNA no final do 4º estágio larval de *Trichosia pubescens* (AMABIS, 1983a).

