

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/6994
IB/80582

DOUTORADO

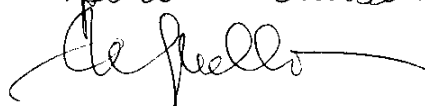
INSTITUTO DE BIOLOGIA

1986

ESTUDO DE PROTEÍNAS NUCLEARES
NÃO-HISTÔNICAS EM GLÂNDULAS SA-
LIVARES DE Bradysia spatitergum
(DIPTERA, SCIARIDAE)

SHIRLEI MARIA RECCO PIMENTEL

SHIRLEI MARIA RECCO PIMENTEL

Este exemplar corresponde à redação
final da tese defendida pela Sra.
Shirlei M. Recco-Pimentel e aprovada
com grau A pela Comissão Julgadora
04/04/86 

ESTUDO DE PROTEÍNAS NUCLEARES NÃO-HISTÔNICAS
EM GLÂNDULAS SALIVARES DE Bradysia spatiatergum
(DIPTERA, SCIARIDAE)

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da UNICAMP para
obtenção do título de doutor
em Ciências

Orientadora - Dra. MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO

CAMPINAS

-1986-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CLASS.	R243e
Author	
Editor	
Combo BC	6994-IB
IB/661	
Cm 000386756	

19/80582
24/6794

Ao EDSON, companheiro de todas as horas.

Às minhas filhas CAROLINA e MARIANA, pelo
sorriso arrancado mesmo nos momentos
mais difíceis.

DEDICO

À

Dra. Maria Luiza Silveira Mello,

que sempre me privilegiou com sua amizade,
pelos exemplos de honestidade e rigor cien-
tífico,

com carinho,

a minha homenagem!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pela orientação segura e competente, pelo incentivo e disposição constantes, pelo muito que tem contribuído para minha formação profissional e pelo carinho e amizade com que tem me distinguido, minha especial gratidão.

Ao Dr. Benedicto de Campos Vidal, não só pelas críticas e sugestões apresentadas na análise prévia deste trabalho, mas também pelos valiosos ensinamentos diários fruto de seu conhecimento e vivência científica, pelo exemplo de dedicação à ciência, e pela disposição e atenção constantes.

Aos Drs. Celso Abbade Mourão, Luiz Carlos Gomes Simões, Christine Hackel, Hebe Myrina Laghi de Souza e Hiroshi Aoyama, pelas valiosas críticas e sugestões apresentadas na análise prévia deste trabalho.

Ao Dr. José Antônio Cordeiro, do Departamento de Estatística da Universidade Estadual de Campinas, pelo assessoramento na análise exploratória de dados e na parte estatística deste trabalho, disposição e interesse constantes.

Ao Laboratório de Estatística do Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação da Universidade Estadual de Campinas, por permitir o uso do terminal do computador.

À Sra. Ana Gagliardi, bibliotecária-chefe do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela atenção e disposição com que sempre me atendeu na obtenção de referências bibliográficas.

Ao Sr. Mário Bianchi, pela ajuda na revelação de filmes e na ampliação de algumas fotografias.

À Srta. Eliane Aparecida de Araujo, desenhista do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pela dedicação e carinho com que desenhou os diagramas e histogramas deste trabalho.

À Sra. Neuza Divina de Oliveira e Srta. Maria Aparecida da Cunha, pelo esmerado trabalho de datilografia.

Ao Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas, onde o presente trabalho foi realizado.

Ao Edson, pelo estímulo, paciência, carinho e disposição, durante todas as etapas de realização deste trabalho.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas, pelo carinho, amizade e colaboração constantes.

A todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos amigos Rita, Lúcia e Ângelo, que no dia a dia tem colaborado e incentivado.

O presente trabalho pôde ser realizado graças à doação de equipamentos pela FAPESP ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP, na pessoa dos Drs. Benedicto de Campos Vidal e Maria Luiza Silveira Mello.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Proteínas nucleares não-histônicas: conceituação geral	1
1.2. Proteínas nucleares não-histônicas: abordagem citoquímica	7
1.3. Dados de análise morfométrica	11
1.4. Análise citoquímica de um grupo de proteínas nu- cleares não-histônicas em glândulas salivares de <u>Bradysia spatitergum</u> : proposta de trabalho	12
2. Material	16
3. Métodos	18
3.1. Cariometria	18
3.2. Análise de proteínas nucleares não-histônicas	18
3.2.1. Obtenção de material para as reações cito- químicas	18
3.2.2. Reações citoquímicas	19
A. "Naphthol yellow S"	19
B. Fluorescência pelo cloreto de dansila	19
C. Fluorescência pelo sulfato de 8-anilino- naftaleno (ANS)	20
3.2.3. Citofotometria dos núcleos corados com "naphthol yellow S"	20
3.2.4. Análise estatística	20
A. Dados cariométricos	21
B. Dados citofotométricos	21
4. Resultados	22
4.1. Cariometria	22
4.2. Análise de proteínas nucleares não-histônicas	41

4.2.1. Fluorescência pelo cloreto de dansila e ANS ..	41
4.2.2. Citofotometria dos núcleos corados com "naphthol yellow S"	41
5. Discussão	69
5.1. Dados cariométricos	69
5.2. Proteínas nucleares não-histônicas remanescentes após extração com NaCl 3M	71
6. Conclusões	77
7. Resumo	79
8. Abstract	80
9. Referências bibliográficas	81

1 - INTRODUÇÃO

1.1. Proteínas nucleares não-histônicas: conceituação geral

As proteínas nucleares não-histônicas são todas aquelas, excetuando-se as histonas, presentes no núcleo celular, constituindo um grupo estrutural e funcional muito heterogêneo (HILL et alii, 1974; ELGIN & WEINTRAUB, 1975). Pode-se genericamente identificá-las segundo várias classes: enzimas do metabolismo cromossômico, proteínas estruturais da cromatina, as proteínas de ativação gênica, proteínas do grupo HMG ("high mobility group"), as da matriz nuclear, as associadas com os produtos de transcrição (empacotamento, processamento e transporte dos RNAs, e as proteínas citoplasmáticas que também participam temporariamente do compartimento nuclear (COMINGS, 1978).

Dentre as proteínas nucleares não-histônicas, as mais estudadas são as associadas à cromatina, cujos pesos moleculares variam de 10.000 a várias centenas de milhares de daltons (ELGIN & WEINTRAUB, 1975). São os componentes presentes em maior quantidade na cromatina isolada. Em células Hela, a análise eletroforética bidimensional permitiu detectar 450 proteínas não-histônicas cromossômicas diferentes, em um total de 10^2 a 10^6 cópias por genoma haplóide. Entretanto, existem dentre estas várias proteínas maiores, das quais uma dúzia ou menos perfaz metade da massa da fração isolada (ELGIN & BONNER, 1972; PETERSON & Mc CONKEY, 1976).

Dentre as enzimas encontram-se, principalmente, as relacionadas com a transcrição, a duplicação e o reparo de DNA, e com a condensação e a descondensação cromatínica (COMINGS, 1978).

As proteínas estruturais são aquelas que podem estar envolvidas ou na alteração e organização dos filamentos de DNA-histonas (ELGIN et alii, 1977) ou no esqueleto ("scaffold") central do cromossomo, o qual foi demonstrado por PAULSON e LAEMMLI (1977) após extração do DNA, das histonas e de algumas proteínas não-histônicas. O esqueleto protéico do cromossomo é composto predominantemente por duas proteínas de alto peso molecular (170.000 e 135.000 daltons), as quais perfazem pelo menos 40% da massa protéica total desta estrutura (LEWIS & LAEMMLI, 1982; EARNSHAW & LAEMMLI, 1983).

Para a classe de proteínas nucleares não-histônicas que participam da regulação da atividade gênica, são inúmeros os trabalhos que demonstram esta função.

As primeiras sugestões desse papel emergiram principalmente de experimentos com cromatina reconstituída e sua transcrição in vitro. Através desta metodologia, em 1973, GILMOUR e PAUL demonstraram que a fração protéica não-histônica era responsável pela transcrição de RNAs específicos para determinado tecido. Em seguida, ficou demonstrado que elementos da fração de proteínas não-histônicas eram responsáveis especificamente pelo estímulo à transcrição do gene para globina (PAUL et alii, 1974; BARRET et alii, 1974), do gene das histonas (STEIN et alii, 1975; KLEINSMITH & STEIN, 1976; PARK et alii, 1977), da ovoalbumina (TSAI et alii, 1976; ROBINSON et alii, 1982), ou ainda das proteínas receptoras que interagem com hormônios esteróides no citoplasma da célula

alvo, concentrando-se no núcleo para ativação gênica (STEIN et alii, 1974; AMABIS & SIMÕES, 1981). Mecanismo de ação semelhante é encontrado em insetos, nos quais a ecdisona se associa ao seu receptor no citoplasma (proteína não-histônica), vai para o núcleo e aí ativa a transcrição de genes específicos (ASHBURNER et alii, 1974; ASHBURNER & RICHARDS, 1976).

Uma propriedade notável das proteínas cromossômicas não-histônicas é a de sofrerem fosforilação e desfosforilação, o que é considerado um mecanismo regulador importante da expressão gênica (STEIN et alii, 1974; MORALES et alii, 1974; EZRAILSON et alii, 1976; MOORE & FREE, 1985). Dentre outras características, o fato das proteínas fosforiladas serem facilmente dissociadas da cromatina, comparado ao que acontece com as proteínas fortemente ligadas ao DNA, estruturais principalmente, sugere que as primeiras tenham um papel regulador (SMART, 1974; apud JOHNSON et alii, 1974).

HMG ("high mobility group") é um grupo de proteínas não-histônicas que se caracteriza por uma alta mobilidade eletroforética e um alto conteúdo de aminoácidos básicos e ácidos (50% dos resíduos). Estas proteínas interagem com a cromatina, sendo dela dissociadas com NaCl 0,35M. Uma outra característica de tais proteínas é sua solubilidade em TCA a 2% (GOODWIN et alii, 1973). Elas têm algumas propriedades em comum com as histonas, por exemplo o fato de terem aproximadamente 25% de aminoácidos básicos e serem extraíveis com ácidos (GOODWIN, 1977). Foi demonstrado que as proteínas HMG-1 e HMG-2 interagem especificamente com subfrações de H1, sugerindo que devam estar envolvidas com ordens superiores de empacotamento dos nucleofilamentos (SMITH & STOCKEN, 1973; SMERDON &

ISENBERG, 1976). Mais recentemente foram encontradas evidências de que a HMG-1 estaria envolvida na duplicação de DNA, ou seja, sua presença seria necessária para a ação da DNA polimerase replicativa (ALEXANDROVA et alii, 1984).

Quanto à matriz nuclear, é uma estrutura proteínácea resistente à extração com tampões de alta e baixa força iônica e também a sais, detergentes não desnaturantes e nucleases. Morfologicamente abrange componentes dos complexos de poro associados à lâmina periférica nuclear, à estrutura fibrilar residual do nucléolo e a uma extensa rede protéica interna (BEREZNEY & COFFEY, 1974, 1977; COMINGS & OKADA, 1976; KAUFMAN et alii, 1981; LONG & OCHS, 1983; LEWIS et alii, 1984). Esta última compreende predominantemente três grandes polipeptídeos de PM entre 60.000 e 70.000 daltons e vários polipeptídeos menores (BEREZNEY & COFFEY, 1974). A maior parte das proteínas da matriz ocorre sob a forma fibrilar, com 20 a 30 Å de espessura e são denominadas matrixinas, podendo se associar formando fibras com espessura de 100-300 Å. Essas proteínas formam uma rede arquitetural na qual a cromatina está ancorada e associada (COMINGS, 1978; PIENTA & COFFEY, 1984).

Na periferia nuclear encontram-se as proteínas de membrana, as dos complexos de poro do envoltório nuclear e as da lâmina interna. As membranas do envoltório nuclear são compostas por 30% de lipídeos e 70% de proteínas, entre as quais encontramos enzimas e glicoproteínas. Os complexos de poro isolados contêm um polipeptídeo principal de peso molecular 68.000 (KROHNE et alii, 1978a), cuja identificação ultraestrutural como um componente dos elementos do poro foi

estabelecida por STICK e KROHNE (1982). A lâmina interna é uma estrutura que em secções ultraestruturais aparece entre a membrana e a cromatina periférica, cuja espessura varia de 80 a 300 nm, conforme os tipos celulares. Estudos de extração química indicam que a lâmina de muitos tipos de células é uma reunião supra-molecular de proteínas que permanece intacta durante os tratamentos do envoltório nuclear, isolado com tampões contendo detergentes não-iônicos e altas concentrações de sais (DWYER & BLOBEL, 1976; SHELTON et alii, 1980; KROHNE et alii, 1981; GERACE et alii, 1984). Na lâmina predominam 3 polipeptídeos cujos pesos moleculares são de 60.000-70.000 daltons e compreendem cerca de 40% da massa protéica total (DWYER & BLOBEL, 1976). Embora os pesos moleculares dos maiores polipeptídeos da lâmina periférica e da matriz intranuclear sejam semelhantes, estudos de localização imunocitoquímica ultraestrutural, utilizando anticorpos contra proteínas da lâmina, indicaram que estas lâminas (A, B e C) ocorrem exclusivamente na periferia nuclear (GERACE et alii, 1978; ELY et alii, 1978; KROHNE et alii, 1978b; AGUTTER & BIRCHALL, 1979; STICK & HAUSEN, 1980; GERACE & BLOBEL, 1981) e também não fazem parte do complexo de poro (revisão em HANCOCK & BOULIKAS, 1982). As evidências experimentais indicam que a lâmina é um componente importante da periferia nuclear à qual o DNA cromossômico está ligado no núcleo interfásico (HANCOCK & BOULIKAS, 1982). A parte periférica da matriz difere da intranuclear não apenas na composição mas também na função (AGUTTER & BIRCHALL, 1979).

Uma série de trabalhos recentes sugere que a matriz nuclear, além de exercer papel estrutural, pode também estar envolvida na duplicação do DNA (DYJKWEL et alii, 1979; VOGELSTEIN et alii, 1980), e na transcrição (JACKSON et alii, 1981) e no processamento do RNA (CIEJEK et alii, 1982). Experimentos imunocitoquímicos possibilitaram a localização de uma proteína nuclear não-histônica, codificada pelos oncogenes myc e myb, na matriz nuclear e também associada a DNA em dupla fita (ABRAMS et alii, 1982; Donner et alii, 1982; LAND et alii, 1983). Este tipo de proteína parece estar associado diretamente ao processo de transformação celular (LAND et alii, 1983).

Deve-se lembrar ainda que muitas das proteínas nucleares não-histônicas podem ser encontradas simultaneamente em mais de uma das classes funcionais citadas. Assim, através de análise eletroforética da distribuição de proteínas não-histônicas, de núcleos isolados de hepatócitos de camundongo submetidos a lavagens em várias soluções, foi sugerido que algumas das proteínas nucleares participariam de complexos com o DNA, bem como com o HnRNA e nucleoplasma (COMINGS & OKADA, 1976; COMINGS & HARRIS, 1976a e b). Também em núcleos de células de embriões de ouriço do mar ficou demonstrado que o envelope nuclear residual e a matriz intranuclear têm em comum com a cromatina moléculas de (glico) proteínas com forte propriedade autoagregativa; esta característica indica também que há associação das proteínas não-histônicas da matriz com a cromatina (SEVALJEVIC et alii, 1981).

Em vista da diversidade de funções, não é de se surpreender que a população de proteínas nucleares não-histônicas possua um alto grau de complexidade (HILL et alii, 1978).

1.2. Proteínas nucleares não-histônicas: abordagem citoquímica

Os estudos de proteínas nucleares não-histônicas têm sido voltados predominantemente para sua extração, caracterização química e algumas vezes imunoquímica, propriedades e possíveis funções, através de métodos bioquímicos e imunológicos. Ao nível citoquímico, especialmente de caráter quantitativo, no entanto, são poucos os trabalhos, o que se deve certamente a dificuldades técnicas, dentre as quais a própria caracterização de tipos de proteínas não-histônicas. Como vantagem, no entanto, tal tipo de estudo possibilitaria a análise a nível celular individual, permitindo comparações entre diferentes tipos celulares ou, para um mesmo tipo celular, comparações em diferentes etapas fisiológicas. Ao nível imunocitoquímico alguns trabalhos vêm buscando localizar em termos qualitativos um ou mais tipos especiais de proteínas não-histônicas que pudessem ser associadas à expressão gênica, em cromossomos politênicos (ELGIN et alii, 1977; ALFAGEME et alii, 1980) e em células transformadas de vertebrados (ABRAMS et alii, 1982; DONNER et alii, 1982).

De modo geral, no entanto, o tipo de abordagem imunocitoquímica para resolver problemas nesse campo requer quantidade razoável de material biológico, em condições fisiológicas comparáveis, a partir do qual se possa isolar e purificar a proteína contra a qual se pretenda obter anticorpos, o que em si é um empecilho para diversos tipos de ensaios experimentais.

Excluindo-se, de outro lado, os trabalhos de análise imunocitoquímico, outros tipos de resultados importantes,

no que se refere às proteínas nucleares não-histônicas, puderam ser obtidos com o uso de métodos citoquímicos.

Assim, em cromossomos politênicos, o acúmulo de proteínas não-histônicas associado ao fenômeno de amplificação gênica em pufes de DNA foi demonstrado por análise citofluorométrica de preparados corados com sulfoflavina após remoção das histonas, associada a dados microinterferométricos (VIDAL, 1977).

FREDERIKS e colaboradores (1980) determinaram citofotometricamente o conteúdo de proteínas não-histônicas em núcleos de hepatócitos de ratos, comparando as células parenquimáticas diplóides e tetraplóides e as não parenquimáticas. Utilizaram para isto a evidenciação dessas proteínas por meio de coloração com "naphthol yellow", após extração de DNA com TCA e de histonas com HCl. A taxa de proteínas não-histônicas encontrada foi a mesma para os três tipos de núcleos, qual seja, de 55% em relação ao total de proteínas.

Em outro trabalho, determinações citofotométricas de proteínas nucleares não histônicas foram efetuadas utilizando-se coloração combinada Feulgen - "naphthol yellow S" em células parenquimáticas de fígado de rato, após hepatectomia parcial. Utilizando-se esta metodologia, foi demonstrado que há um aumento de proteínas não-histônicas significativamente maior na parte regenerada, comparado ao do controle (GAUB, 1978). Por outro lado, posteriormente, por análise eletroforética, foi verificado que não ocorre um aumento qualitativo de proteínas não-histônicas, porém 15 frações destas sofreriam um aumento quantitativo relativo, dentro das 48 horas que se seguem à hepatectomia (MARTINEZ-SALES & BAGUENA, 1981).

O "naphthol yellow S" (ácido 2-4-dinitro-1-naftol-7-sulfônico), introduzido em 1955 por Deitch em citoquímica como um corante quantitativo para proteínas, liga-se eletrostaticamente a grupos básicos livres de proteínas ionizadas, grupos esses originados de uma variedade de diferentes resíduos de aminoácidos básicos e N-terminal.

Portanto, para se poder medir o conteúdo de proteínas nucleares não-histônicas com "naphthol yellow S" a pH 2,7, é preciso que as histonas sejam extraídas, já que os radicais destas proteínas também podem ligar moléculas do corante. A extração das histonas pode ser realizada com NaCl 3M a pH $\approx$ 6,0 (BONNER et alii, 1968; BUTLER et alii, 1979; MELLO & CORDEIRO, 1985), embora remova também certos tipos de proteínas não-histônicas (SPELSBERG et alii, 1972; BIDNEY & REECK, 1978).

Tem sido demonstrado que a presença de ácidos nucleicos bloqueia a maioria dos grupos -NH_3^+ das proteínas básicas nucleares que se ligam ao "naphthol yellow S" (DEITCH, 1955; GAUB, 1976a). DEITCH (1955) e mais recentemente TAS e colaboradores (1980) demonstraram que a fração protéica bloqueada pelo DNA é histônica, o que dispensaria a etapa de remoção do DNA para exposição de grupos NH_3^+ de proteínas não-histônicas no método citoquímico. No entanto, BERDYSHEV e ZHELABOVSKAYA (1972) demonstraram que 23% a 28% das proteínas não-histônicas da cromatina de hepatócitos de rato poderiam estar covalentemente ligadas ao DNA, proteínas estas que teriam o papel de efetuar uma limitação orgãoespecífica da transcrição da cromatina e/ou eliminar parcialmente o efeito inibidor das

histonas. Portanto, a remoção de DNA pelo tratamento com TCA, a quente, liberaria os radicais desse conjunto de proteínas não histônicas ligadas, ainda que temporariamente, aos grupos fosfatos do DNA, expondo-os a se ligarem ao corante (FREDERIKS et alii, 1980).

No que se refere a mudanças estruturais em proteínas em geral e em proteínas não-histônicas, em particular, estudos citoquímicos poderiam ser realizados com uso de um corante fluorescente que interagisse com grupamentos hidrofóbicos das mesmas. O corante ANS (1-anilino-naftaleno-8-sulfonado), por exemplo, é um composto aromático policíclico, fluorescente quando ligado ao substrato protéico, e sensível à polaridade dos solventes (STRYER, 1965). Devido à sua natureza anfifílica, o ANS interage com as interfaces polar/apolar da proteína. Portanto, mudanças nas propriedades de fluorescência do ANS ligado, refletem mudanças em tais interfaces (BROCKLEHURST et alii, 1970; GOSLINE et alii, 1975; VIDAL, 1978, 1980). O uso do butanol como solvente é conveniente por ser este apolar e, nesse caso, os grupos do corante possíveis de se ionizarem, não o fazem.

A riqueza em resíduos lisina pode ser também detectada citoquimicamente nos núcleos, usando-se o cloreto de dansila (1-dimetilamino-naftaleno-5-sulfocloreto), corante fluorescente capaz de se ligar aos grupamentos $-NH_3^+$ disponíveis nos resíduos de lisina das proteínas (ROSSELET & RUCH, 1968; VIDAL, 1980). Obviamente, em se tratando da análise de proteínas não-histônicas, uma remoção prévia das histonas seria também necessária.

1.3. Dados de análise morfométrica

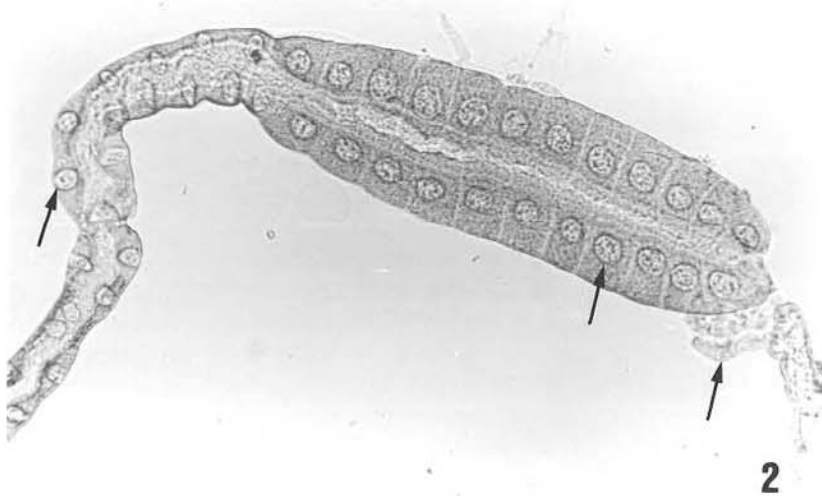
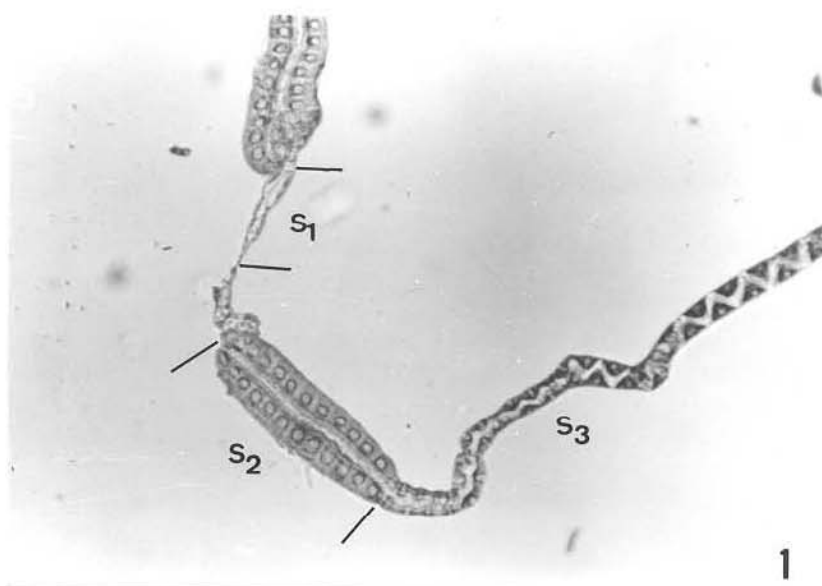
Ao lado dos trabalhos de natureza citoquímica, pode ser obtida uma informação relativa sobre a participação de proteínas nucleares não-histônicas na fisiologia nuclear através de determinações morfométricas, especialmente as cariométricas (PALKOVITS & FISCHER, 1968). Além da clássica relação entre tamanho nuclear e conteúdo de DNA, estabelecida a partir dos primeiros trabalhos de Jacoby, em 1925 (SWIFT, 1969), os métodos cariométricos vêm permitindo o levantamento de outros tipos de informação. Entre estas, se encontram: correlação do entumescimento nuclear em vários tipos celulares e teciduais com o fluxo de água e mudanças eletrolíticas no núcleo (BREEDDERMAN & FOOTE, 1971; RENSING & HARDELAND, 1972), ação de fixadores ao nível nuclear (PORCELLI, 1972; MELLO & ZANARDI, 1976a, b) e variação na atividade fisiológica nuclear e celular correlacionada à variação quantitativa de RNA e proteínas nucleares não-histônicas (PALKOVITS & FISCHER, 1968).

Aumento de tamanho nuclear sem mudança em conteúdo de DNA e histonas, em muitos casos, reflete aumento de proteínas não-histônicas e RNA, associado a atividade nuclear (SCHREIBER, 1964; PALKOVITS & FISCHER, 1968; SCHREIBER et alii, 1969; SWIFT, 1969; RANEK, 1976). Tais variações podem estar associadas, por exemplo, à ação hormonal em que a administração de 50µg de estradiol a ratas induz um aumento de até 342% no volume nuclear das células epiteliais do útero (ALFERT et alii, 1955; GELFONT & CLEMMONS, 1955), ou ao ciclo circadiano no qual as variações em conteúdo de proteínas não-histônicas durante o dia são acompanhadas por mudanças de tamanho nuclear (GAUB, 1976b).

1.4. Análise citoquímica de um grupo de proteínas nucleares não-histônicas em glândulas salivares de *Bradysia spatitergum*: proposta de trabalho

Em *Bradysia spatitergum*, díptero do grupo dos sciarídeos, as glândulas salivares larvais exibem células morfológicamente distintas, conforme se compare suas regiões convencionadas como S_1 , S_2 e S_3 por SILVA (1980) (Figs. 1 e 2). O conteúdo de DNA dessas células varia também conforme a região do órgão e a fase do desenvolvimento larval. É interessante constatar que tais variações são acompanhadas por diferenças no grau de atividade secretora e nos tipos de secreção produzida (SILVA, 1980). Assim, na região S_2 , bem como em S_3 , uma vez atingidos os valores Feulgen-DNA nucleares mais elevados do órgão, o que acontece no início do 4º estágio larval (SILVA, 1981), passam a ser secretadas proteínas reativas ao xylidine ponceau a pH 1,7 e que farão parte da seda produzida pelo inseto para constituir seu casulo (SILVA, 1980). A região S_1 , por outro lado, é pobre em síntese de proteínas e proteoglicanas e por sua vez apresenta valores Feulgen-DNA baixos e menor grau de politenia, em relação aos das regiões S_2 e S_3 (SILVA, 1981). Além disso, as histonas em S_1 são muito mais resistentes à remoção por soluções salinas ou hidrólise ácida, quando comparadas às das regiões S_2 e S_3 , também em início de 4º estágio (MELLO & CORDEIRO, 1985).

Estes últimos achados levaram à sugestão de que núcleos com altos graus de politenia e com atividade transcritiva muito elevada, como os de S_2 e S_3 , apresentem histonas



Figuras 1 e 2. Glândulas salivares de larvas de início de 4º estadio de Bradysia spatitergum, coradas com orceína lacto-acética, sendo evidenciadas as regiões S_1 , S_2 e S_3 . Setas = núcleos. 1. 54x; 2: detalhe de 1, 140x.

com maior grau de extratibilidade ou de alterações conformacionais (MELLO & CORDEIRO, 1985). Nesse sistema, no entanto, não se conhece a participação de proteínas não-histônicas, seja em termos de variações quantitativas em seu conteúdo, seja na apresentação de alguma característica especial qualitativa, como, por exemplo, formação de complexos com o DNA. Esse conhecimento certamente seria importante, uma vez que: a. o processo metabólico é sabidamente variável nas três regiões da glândula e durante o desenvolvimento pós-embrionário, b. que as proteínas nucleares não-histônicas desempenham inúmeras funções, quer estruturais quer na regulação da atividade gênica e, c. há possibilidade da presença de diferentes tipos e quantidades dessas proteínas, de mudanças conformacionais e de diferenças na suscetibilidade à extração, em função da fisiologia celular.

No presente trabalho tem-se como objetivo a determinação:

1. de variações no conteúdo de proteínas nucleares não-histônicas não removíveis pelos processos extrativos de histonas e DNA, por métodos citofotométricos, nas três regiões das glândulas salivares de Bradysia spatitergum, em três fases de seu desenvolvimento pós-embrionário, escolhidas em função da fisiologia celular conhecida (SILVA, 1980, 1981);
2. da participação desse grupo de proteínas em complexos com o DNA;
3. da riqueza em grupamentos hidrofóbicos e em resíduos de lisina nessas proteínas, através da observação de fluorescência em preparados corados com ANS e cloreto de dansila.

Considerando-se que dados cariométricos podem muitas vezes ser informativos quanto a um aumento especial em proteínas nucleares não-histônicas (item I.3), como primeira etapa do trabalho procedeu-se também à determinação de áreas e volumes nucleares nas três regiões glandulares , durante o desenvolvimento pós-embrionário.

2. MATERIAL

Foram utilizadas glândulas salivares de larvas de Bradysia spatitergum (Diptera, Sciaridae), sciarídeo classificado por HARDY (1956) como Sciara (Lucoriella) spatitergum e reclassificado por STEFFAN (1968) como Bradysia spatitergum, nomenclatura atualmente em uso. Foram utilizadas larvas de 1º estadio (até 24 horas após eclosão do ovo), da fase inicial do 4º estadio (7 dias) e da fase de pré-pupa (10 dias). A determinação desses estadios se baseou em dados não publicados, de Norberto Comune, segundo informação de Hebe M. L. de Souza e Maria José L. Silva.

O estoque de B. spatitergum foi iniciado pela Professora Dra. Hebe M.L. de Souza, em 1972, a partir de exemplares por ela coletados em Barão Geraldo, Campinas, SP. Com uma amostra desse estoque teve início e prosseguimento a criação dessas moscas no Departamento de Biologia Celular da UNICAMP. O meio de cultura utilizado foi preparado com 35g de ágar dissolvido em 1 litro e meio de água. O alimento consiste de rama de batata doce (Ipomea batata), seca e moída, depositada sobre o ágar solidificado. O estoque foi mantido em garrafas com capacidade de 1/4 de litro, contendo uma camada de cerca de 2cm de meio de cultura (SILVA, 1977) e também em caixas de acrílico cujas laterais mediam 11cm x 11cm e altura de 3cm. Estas caixas foram utilizadas pela facilidade que proporcionam na escolha e retirada das larvas, bem como no acompanhamento, à lupa, da eclosão dos ovos para obtenção de larvas de 1º estadio. Quando as moscas eclodem, são transferidas para um novo frasco e as fêmeas depositam ovos. Os adul

tos morrem a seguir. Toda a população de moscas foi mantida à temperatura ambiente.

A frequência de aparecimento de larvas de início de 4º estadio, em diferentes épocas de amostragem, foi sempre extremamente baixa, devido provavelmente a rapidez com que a larva passa pelo início desta fase. Em caixas contendo aproximadamente 200 larvas, apenas 1 ou 2 se encontravam nessa fase. Tal fato dificultou a obtenção de amostras grandes de núcleos de larvas de início de 4º estadio, bem como se tornou severo empecilho a que se procedesse a outro tipo de análise do material proteico cromatínico como, por exemplo, eletroforese em gel.

A dissecação das larvas foi monitorada através de lupa estereoscópica Zeiss. Para observação e fotografia dos núcleos foi utilizado um fotomicroscópio Zeiss.

3. MÉTODOS

3.1. Cariometria

Para obtenção dos valores de áreas e volumes nucleares foram utilizadas glândulas salivares de larvas de 1º e de início de 4º estádios e de pré-pupas, fixadas e montadas em solução de formol a 2%, em meio nuclear de ZWEIDLER E COHEN (1971). Imediatamente após o preparo das lâminas foram realizadas as medidas cariométricas.

Para cada região das glândulas foram medidos os eixos nucleares (diâmetros) usando-se um microscópio Leitz Wetzlar equipado com uma ocular micrométrica Leitz 15x e objetiva 40/0,65. De posse desses dados, os valores de área e volume foram calculados pela aplicação das fórmulas propostas por MELLO e VIDAL (1980):

$$S = \pi \left(\frac{A + B}{4} \right)^2$$

$$V = \frac{\pi}{6} A.B.C, \quad \text{onde}$$

$$S = \text{área}$$

$$V = \text{volume}$$

$$A = \text{diâmetro do eixo maior}$$

$$B = \text{diâmetro do eixo menor}$$

$$C = B$$

3.2. Análise de proteínas nucleares não-histônicas

3.2.1. Obtenção de material para as reações citoquímicas

As glândulas salivares recém-removidas foram tratadas com solução de NaCl 3M por 6 horas, a 4°C em câmara úmida, após o que foram fixadas em formol a 2%, em meio nuclear

de ZWEIDLER & COHEN (1971) por 20 minutos. A seguir, as glândulas foram levemente esmagadas nesta solução, para expulsão dos núcleos. As lamínulas foram removidas após congelamento do preparado em nitrogênio líquido. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 13 a 14 horas, secadas ao ar e submetidas a reações citoquímicas para proteínas.

3.2.2. Reações citoquímicas

A. "Naphthol Yellow S"

Parte do material foi tratada com ácido tricloroacético (TCA) a 5%, a 90°C, por 15 minutos e lavada em TCA a 5% a frio, para remoção de DNA. A seguir, tanto o material tratado como aquele não tratado com TCA foram corados com uma solução de "naphthol yellow S" a 0,1% em ácido acético a 1%, a pH 2,7, por 30 minutos, e lavados em ácido acético a 1%, por 1 minuto e em álcool butílico terciário por 30 minutos. Após diafanização em xilol durante 20 minutos, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá (DEITCH, 1966). A coloração controle pôde ser dispensada, uma vez que MELLO E CORDEIRO (1985) demonstraram que após tratamento com NaCl 3M não são mais verificadas histonas reativas ao fast-green alcalino em nenhuma das regiões da glândula de B. spatitergum.

B. Fluorescência pelo cloreto de dansila

O material foi lavado em etanol 95% por 2 minutos e a seguir corado com uma solução de cloreto de dansila a 0,1% em etanol 95%, saturado com NaHCO₃, por 6 horas no escuro, lavado em etanol 95% também saturado com NaHCO₃, desidratado em etanol absoluto, diafanizado em xilol e montado em eukitte (ROSSELET & RUCH, 1968). A fluorescência foi investigada ao fotomicroscópio Zeiss equipado com filtro de emissão I e filtro de barragem 530.

C. Fluorescência pelo sulfato de 8-anilino-naftaleno (A.N.S.)

O material foi corado com uma solução de A.N.S. a 0,1% em butanol, por 30 minutos no escuro. A seguir, as preparações foram lavadas em butanol, diafanizadas em xilol e montadas em eukitte (VIDAL, 1978). A fluorescência foi investigada ao fotomicroscópio Zeiss equipado com filtro de emissão IIIB e filtro de barragem 410.

3.2.3. Citofotometria dos núcleos corados com "naphthol yellow S"

Os valores de absorbância "naphthol yellow S" - proteínas não-histônicas nucleares, em unidades arbitrárias (U.A.), foram obtidos com um citofotômetro de varredura automática Zeiss, acoplado a um microcomputador Microdata. As condições de trabalho foram: objetiva Planapo 100/1,3 = 100x; $\text{optovar} = 2,0$; condensador LD Epiplan = 16/0,30; passo de varredura = $0,5\mu\text{m} \times 0,5\mu\text{m}$ (eixos X e Y); comprimento de onda = 450nm.

3.2.4. Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada pelo pacote MINITAB versão 81, implantado no computador DIGITAL DEC 10 da Universidade Estadual de Campinas, utilizando-se o terminal do Laboratório de Estatística do Instituto de Matemática, Estatística e Ciência da Computação (IMECC).

A. Dados cariométricos

Para cada região (S_1 , S_2 e S_3) da glândula salivar nas três diferentes fases do desenvolvimento foram calculados a média aritmética, o desvio padrão, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança. Foram também efetuados testes t com correção de Welch (BICKEL & DOCKSUM, 1977) e análise de variância, para comparação dos dados.

Com os valores de área e volume foram construídos histogramas de frequência distribuídos em escala em progressão geométrica (MELLO & RAYMUNDO, 1980) e também calculadas as frequências percentuais dos valores de área e volume para cada intervalo de classe.

Os dados foram apresentados ainda sob a forma de Ramo e Folhas, e descritos segundo o diagrama esquemático de TUCKEY (1977).

B. Dados citofotométricos

Os resultados referentes aos valores "naphthol yellow S" - proteínas não-histônicas nas diferentes regiões, após cada tratamento em cada fase do desenvolvimento, foram apresentados de forma semelhante ao descrito no item 3.2.4.A..

4. RESULTADOS

4.1. Cariometria

Os valores de áreas e volumes nucleares obtidos para as três regiões das glândulas, nas três fases do desenvolvimento, foram dispostos em ordem crescente e apresentados sob a forma de ramos e folhas (TUCKEY, 1977) nas figuras 3 a 11 e 14 a 22. Os valores de volume foram normalizados com $\sqrt[5]{}$.

No ramo e folhas são colocados os valores numéricos ordenados de forma crescente, distribuídos em classes. As classes são colocadas à esquerda do traço vertical e escolhidas em função dos números iniciais do menor até o maior valor do conjunto de dados. Cada linha (folha) apresenta os valores pertencentes à classe correspondente. Para evitar o espalhamento dos dados que pode ocorrer quando há um número grande de classes, os ramos e folhas foram construídos utilizando-se duas classes em cada folha, separadas por dois pontos (:). Tomando-se como exemplo a figura 3, tem-se que, o menor valor é 21,03 e o maior é 103,51. Assim, as classes estarão distribuídas duas a duas, de 1 a 10 (1:2;; 9:10), e os valores pertencentes a estas classes, alinhados à direita do traço vertical. Na primeira linha não há valores relativos à classe do dígito 1 e encontram-se, portanto, apenas os valores pertencentes à classe do dígito 2 (21,03; 22,10; 23,54; 23,59; 23,98; 29,95).

A apresentação dos dados sob a forma de ramo e folhas se justifica não só pelo fato de se conhecer a simetria dos dados distribuídos ordenadamente em classes, mas também completam-se com eles as informações contidas nos diagramas esquemáticos que, como tal, não informam o número de pontos

existentes em cada quarto do diagrama, uma vez que uma aparente simetria nos caixotes não significa necessariamente que os dados sigam uma distribuição normal. Os ramos e folhas são ainda a primeira etapa para a elaboração dos diagramas esquemáticos.

As figuras 12 e 13 mostram as relações entre áreas nucleares para as três regiões glandulares nas três fases do desenvolvimento e as figuras 23 e 24 as relações entre volumes nucleares. Nas figuras 12 e 23, cada bloco representa a distribuição dos valores de área e volume, respectivamente, de cada região ao longo do desenvolvimento. O primeiro traço horizontal é o primeiro quartil, que determina que 25% dos valores das áreas e volumes nucleares estão localizados abaixo desse ponto. O segundo traço horizontal é a mediana, indicadora de que 50% dos núcleos têm suas áreas e volumes distribuídos abaixo desse ponto ou seja, desse valor e 50% acima. O terceiro traço é o segundo quartil, localizando-se abaixo dele 75% das áreas nucleares. Os pontos representados por um círculo vazio são chamados pontos soltos e se localizam na região delimitada por uma diferença interquartílica e até uma diferença e meia, acima do segundo quartil e abaixo do primeiro. Os pontos representados por um círculo cheio são ditos pontos desgarrados, localizando-se na região acima ou abaixo de uma diferença interquartílica e meia. Os pontos soltos ocorrem com baixa frequência enquanto os desgarrados ocorrem com baixíssima frequência (TUKEY, 1979).

Figuras 3, 4 e 5. Ramo e folhas dos valores das áreas nucleares em μm^2 calculados para as regiões S_1 (Fig. 3), S_2 (Fig. 4) e S_3 (Fig. 5) da glândula salivar de larvas de 1º estadio. Na primeira linha da figura 3, embaixo, lê-se 21,03; 22,10; 23,54; 23,59; 23,98; 29,95; na segunda, 30,78; 33,85, e assim por diante.

Fig. 3

-2
x10

S₁ 11:12
9:10 051059:351
7:8 186651854996:195552
5:6 134140191249307417535588762822938999:124242362426742800992
3:4 078385432520707707:094289295342342394394447495542760760760815815865865920920970
1:2 :103210354359398995

Fig. 4

-2
x10

S₂ 33:34 :356
31:32
29:30
27:28 070070070582:998
25:26 816
23:24 047047875978:232
21:22
19:20 781893
17:18 053157273367577672920:086289614
15:16 109109207295971:072072263365661960972
13:14 365903978:176176452730
11:12 310805892:145233479748828
9:10 729:109899982
7:8 988:984
5:6 :925

Fig. 5

-2
x10

S₃ 21:22 :128
19:20
17:18
15:16 394
13:14 009182273540540:634
11:12 057300395728805979:311400509658838
9:10 026581967:029505577660660825825
7:8 051058118193321443721917:060340626767833841908917984
5:6 411529:117242298305483917917
4:4 :705914

	-2	Fig. 6
	x10	
S ₁	17:18	262
	15:16	197:309
	13:14	893893:042356827
	11:12	057141141:154479568568
	9:10	127136272357426581651:038189423577660825
	7:8	118186186246582713988:131203552841908
	5:6	134529588762822877:117124235483483800800925
	3:4	805:191865
	1:2	928:624

	-1	Fig. 7
	x10	
S ₂	9:10	010743:403628
	7:8	399419504589592725745770:088131151176
	5:6	151256398470524524743762:005118245350353391526844874886905926
	3:4	170464624624637639653681741774937:061092140202280410705722825978
	1:2	:077305656662953980

	-2	Fig. 8
	x10	
S ₃	51:52	:198
	49:50	
	47:48	
	45:46	579
	43:44	
	41:42	548:657
	39:40	075690:918
	37:38	274411:308760
	35:36	366499951:813967
	33:34	362491:061356
	31:32	150275:509797974
	29:30	013270529544651:064
	27:28	070582833966966:353622622742742998
	25:26	207320688:058432446562692
	23:24	289398398642875:108231231231467467703703
	21:22	098:009009925
	19:20	236458570:207650
	17:18	261367577:194397494614
	15:16	306681:468661856856
	13:14	:082
	11:12	:479828918

Figuras 6, 7 e 8. Ramo e folhas dos valores das áreas nucleares em μm^2 calculados para as regiões S₁ (Fig. 6), S₂ (Fig. 7) e S₃ (Fig. 8) da glândula salivar de larvas de início de 4º estadio. Na primeira linha da figura 6, embaixo, lê-se 19,28; 26,24; na segunda, 38,05; 41,91; 48,65, e assim por diante.

Figuras 9, 10 e 11. Ramo e folhas dos valores das áreas nucleares calculados em μm^2 para as regiões S_1 (Fig. 9), S_2 (Fig. 10) e S_3 (Fig. 11) da glândula salivar de pré-pupas. Na primeira linha da figura 9, embaixo, lê-se 34,32; 36,10; 36,16, e assim por diante.

Fig. 9

-2
x10

S₁

15:16	022781
13:14	009540726998:914
11:12	:145658838918
9:10	127426503:351875899908
7:8	051118314382512721854988:131195203268413552692692833
5:6	027134300365417523535701822883883:061117612925992
3:4	432610616658849948:089389976

Fig. 10

-2
x10

S₂

25:26	2452
23:24	31125686:6301
21:22	0945:20363877
19:20	027136497057:08121846220425239198
17:18	0298:0315065419375241
15:16	174274927808:431755417131
13:14	11571736176873928247:083008632564289949166676
11:12	0564162821029214:21392666591564829781
9:10	5006549871768618:6275
7:8	5696:022432905971641391709170
5:6	:06112347

Fig. 11

-2
x10

S₃

15:16	:5252
13:14	344697019966:84809644
11:12	3949
9:10	24283103405259278145:0829426250089800
7:8	1087232125593181359039994845633178328055912393239548:19652397308544135737824789328959
5:6	04714346507152595613651681929309:3124428742874670487354619864
3:4	2095279762219531:4582475087359087

Figura 12. Diagramas esquemáticos representando as relações entre os valores das áreas nucleares calculados para as regiões S_1 , S_2 e S_3 da glândula salivar nas três fases do desenvolvimento pós-embriônico.

Em cima, os esquemas de cinco números, onde # = número de observações; * = menor valor de área; J_1 = 1º quartil; MD = Mediana; J_2 = 2º quartil; * = maior valor de área. x = valor extremo, mínimo ou máximo, que se encontra dentro do comprimento de uma diferença de junta da junta respectiva.

ÁREA NUCLEAR

#	60	60	60	61	63	89	60	60	60
*	21.03	69.25	47.05	26.24	207.65	124.79	34.32	606.11	320.95
J ₁	43.19	130.97	71.89	64.21	381.46	209.86	55.32	1110.96	587.05
MD	49.20	163.14	93.04	88.41	552.38	264.46	76.17	1417.14	755.88
J ₂	61.83	191.98	118.92	108.83	740.47	305.81	99.27	1877.56	934.05
*	103.35	343.56	221.28	172.62	1062.75	521.98	157.81	2524.52	1652.52

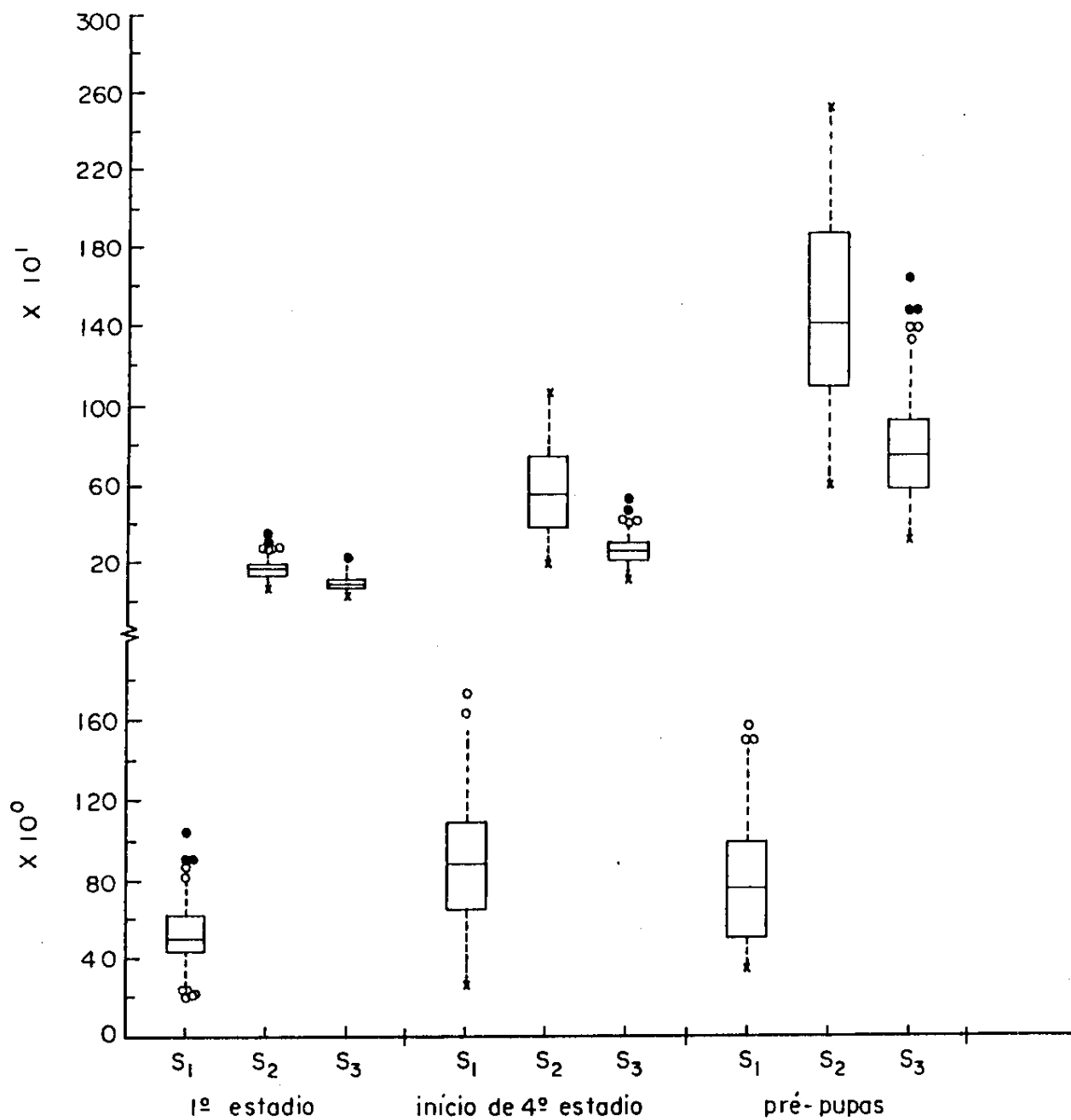
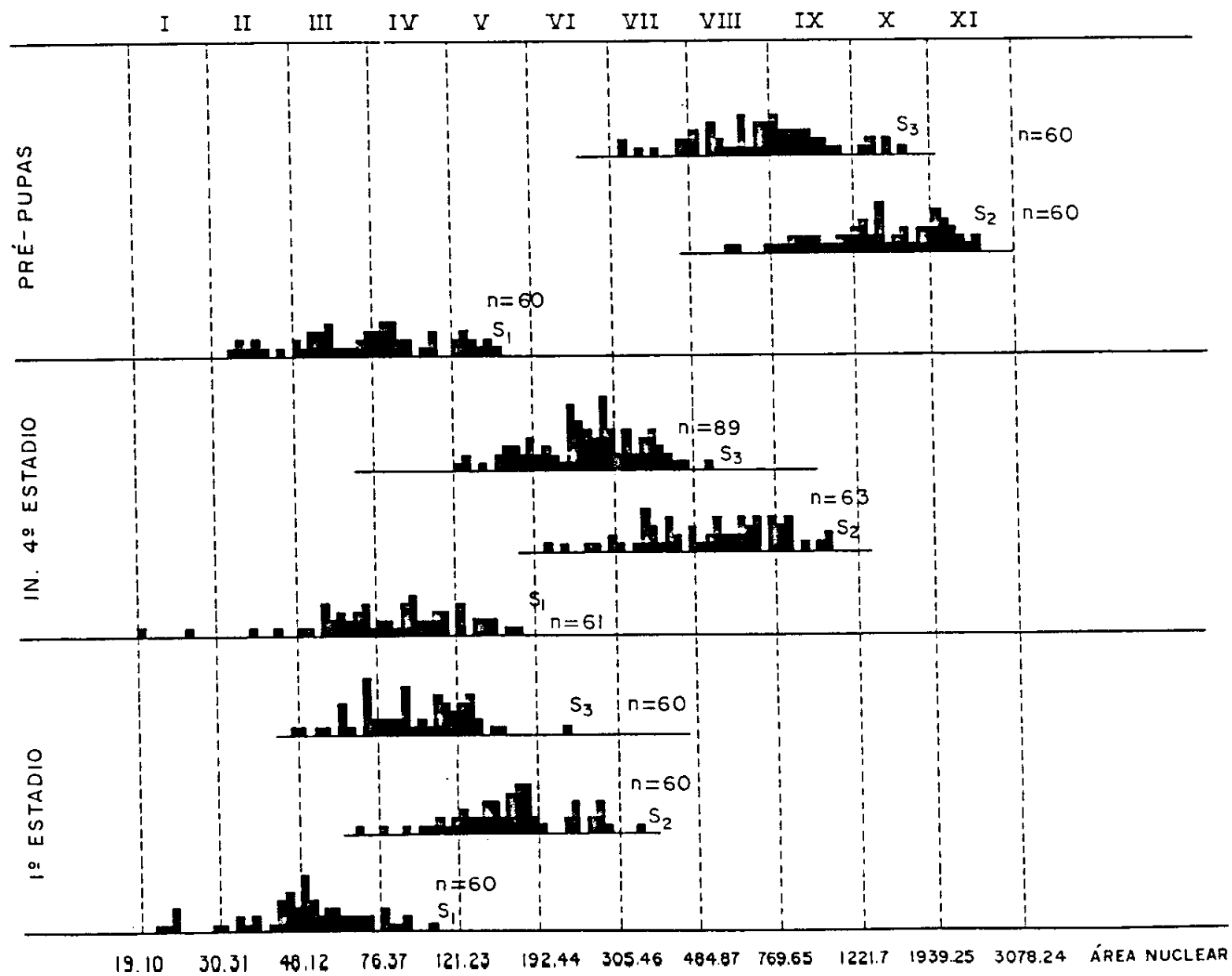


Figura 13. Histogramas das frequências relativas dos valores de área nuclear nos vários intervalos de classe para as regiões glandulares S_1 , S_2 e S_3 nas três fases do desenvolvimento. I a XI correspondem aos intervalos de duplicação dos valores.



	-4	Fig. 14
	x10	
	42:43	
	40:41	
	38:39	
	36:37	468:070
	34:35	466485562:063167
S ₁	32:33	031293589701970:238902
	30:31	258321405408571658830971:825
	28:29	053258463564745860996:093095101135305333427484541562667854959975
	26:27	534649:078155190544917924948
	24:25	:324955
	22:23	456516:499754938

	-4	Fig. 15
	x10	
	52:53	:640
	50:51	
	48:49	031079895957:642
	46:47	009282594806:588876
S ₂	44:45	105260385429
	42:43	005435553566808851888:373439441470493781797974
	40:41	002125732740897:009121225899
	38:39	812811:209317348564713888892972
	36:37	241364510:151801858892
	34:35	165506
	32:33	
	30:31	:914

	-4	Fig. 16
	x10	
	46:47	529
	44:45	
	42:43	
	40:41	009319321366421666
S ₃	38:39	402520776822955:385
	36:37	035163228835:131368425490618780806980999
	34:35	077311457654974:065118300601731747
	32:33	101304380437606:034183369384410623651
	30:31	125232360553605775958968
	28:29	742:902
	26:27	
	24:25	:615

Figuras 14, 15 e 16. Ramo e folhas dos volumes nucleares em μm^3 calculados para as regiões S₁ (Fig. 14), S₂ (Fig. 15) e S₃ (Fig. 16) da glândula salivar de larvas de 1º estadio. Na primeira linha da fig. 14, embaixo, lê-se 2,2456; 2,2516; 2,3499; 2,3754; 2,3938; na segunda, 2,5324; 2,5955, e assim por diante. Idem para as outras figuras.

	-4	Fig. 17
	x10	
S ₁	42:43	269638:319884
	40:41	381549:339339
	38:39	020095300345364:517767
	36:37	363479560651881888:012060252
	34:35	202288409531815992:037346772779864
	32:33	033158171646651867867988:199273708799
	30:31	110233922:234686700
	28:29	289303513:490975
	26:27	228
	24:25	
	22:23	872:205

	-4	Fig. 18
	x10	
S ₂	72:73	634653693
	70:71	:228
	68:69	251:323
	66:67	016402:310648867
	64:65	166592781:520592835
	62:63	066194347940:089147262629718
	60:61	258299902:077181373
	58:59	211279383553:447
	56:57	000620672:752
	54:55	158439643714913973:285
	52:53	089939:266431801900
	50:51	395657989:138730
	48:49	863
	46:47	164172
	44:45	446

	-4	Fig. 19
	x10	
S ₃	60:61	068
	58:59	:279
	56:57	263756
	54:55	204252309790975:296391458464756974
	52:53	035274406429903:977431933
	50:51	002051308414692755904:150177340688713985
	48:49	061101164290350350412458668863984:308444483506941970
	46:47	184295349357704721874954:000385521680940
	44:45	112471746815830846:985
	42:43	137243:241262375458565
	40:41	:020508654745764776
	38:39	:105237988

Figuras 17, 18 e 19. Ramo e folhas dos volumes nucleares em um^3 calculados para as regiões S₁ (Fig. 17), S₂ (Fig. 18) e S₃ (Fig. 19) da glândula salivar de larvas de início de 4º estadio. Na primeira linha da figura 17, embaixo, lê-se 2,2872; 2,3205, e assim por diante.

	-4	
	x10	Fig. 20
	42:43	093295
	40:41	135392842:013909
	38:39	394994:257384
	36:37	131408808883941:332
S ₁	34:35	039064316358457:063186468
	32:33	075124345437484575841960:058224713
	30:31	044097112251437816:036
	28:29	239933:269298435531659948
	26:27	276451511771:072190318
	24:25	:510792

	-4	
	x10	Fig. 21
	96:97	641
	94:95	445:103
	92:93	088440:071
	90:91	147991:633
S ₂	88:89	250
	86:87	:197508531780
	84:85	462502579:541
	82:83	217272376469748:729834966996
	80:81	386614741886:351932
	78:79	505790:286831
	76:77	312:001372542
	74:75	110230648:449608642
	72:73	273:221
	70:71	197:076098774
	68:69	:064361948
	66:67	805:870
	64:65	:039
	62:63	073

	-4	
	x10	Fig. 22
	84:85	283
	82:83	226456
	80:81	350402:663
	78:79	
S ₃	76:77	337
	74:75	226:750
	72:73	063:334972
	70:71	579:269427438549
	68:69	205241255355547502628875
	66:67	513615802859:039045256959
	64:65	148204421615:241896903
	62:63	:128441743
	60:61	563737946:055236617931936
	58:59	076:203
	56:57	080309:815
	54:55	441
	52:53	:335613712

Figuras 20, 21 e 22. Ramo e folhas dos volumes nucleares em μm^3 calculados para as regiões S₁ (Fig. 20), S₂ (Fig. 21) e S₃ (Fig. 22) da glândula salivar de pré-pupas. Na primeira linha da figura 20, embaixo, lê-se 2,5510; 2,5792; na segunda, 2,6276; 2,6451, e assim por diante.

Figura 23. Diagramas esquemáticos representando as relações entre os valores de volumes nucleares calculados para as regiões S_1 , S_2 e S_3 da glândula salivar nas três fases do desenvolvimento pós-embriônico. Em cima, os respectivos esquemas de cinco números, onde # = número de observações; * = menor valor de volume; J_1 = 1º quartil; MD = Mediana; J_2 = 2º quartil; * = maior valor de volume. x = valor extremo, mínimo ou máximo, que se encontra dentro do comprimento de uma diferença de junta da junta respectiva.

VOLUME

#	60	60	60	61	63	89	60	60	60
*	2.25	3.19	2.56	2.29	4.45	3.92	2.55	6.21	5.33
J ₁	2.74	3.95	3.25	3.21	5.42	4.57	2.96	7.44	6.18
MD	2.95	4.22	3.52	3.48	6.03	4.87	3.27	8.08	6.68
J ₂	3.14	4.42	3.79	3.74	6.45	5.21	3.66	8.51	7.14
*	3.71	5.36	4.65	4.39	7.27	6.01	4.21	9.66	8.43

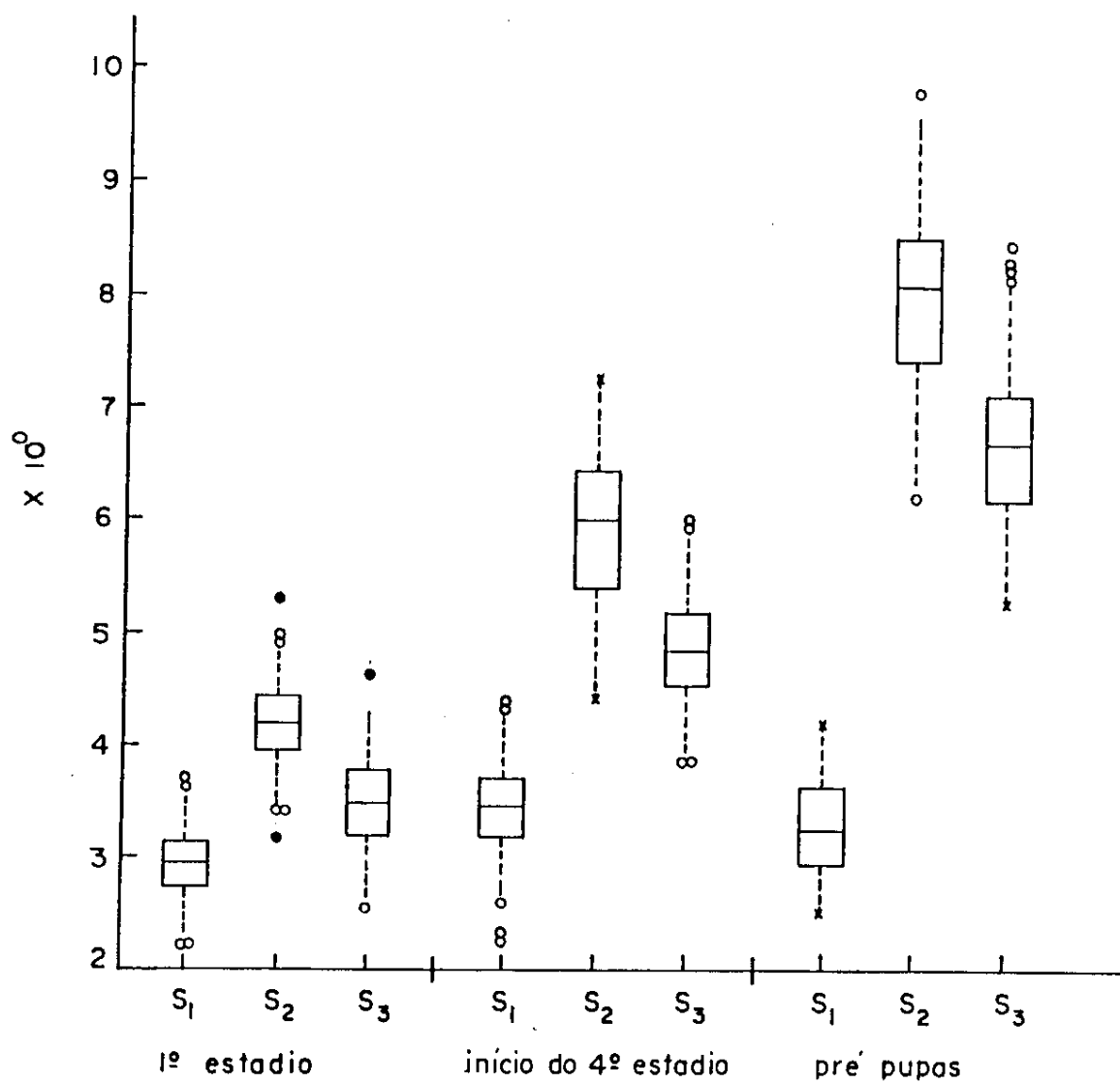
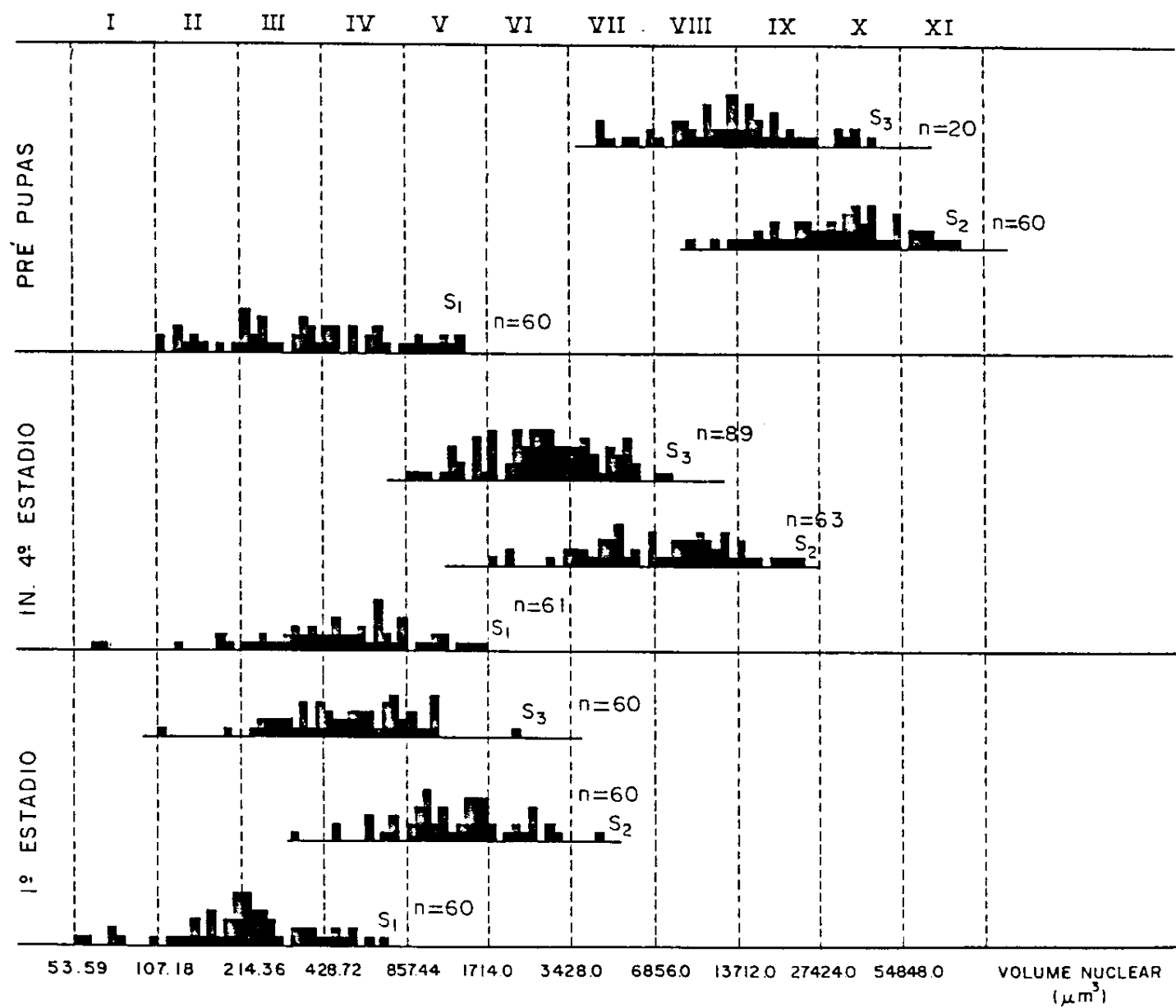


Figura 24. Histogramas das frequências relativas dos valores de volume nuclear nos vários intervalos de classe para as regiões glandulares S_1 , S_2 e S_3 nas três fases do desenvolvimento. I a XI correspondem aos intervalos de duplicação dos valores.



Na maioria dos casos, a distribuição dos dados absolutos é bastante simétrica (figuras 3 a 11). Assimetria mais evidente em direção a valores menores observa-se para S_1 de pré-pupas (figuras 9 e 12), o que quer dizer que 50% dos valores estão localizados em um número menor de classes, em comparação aos 50% de valores maiores restantes.

Se compararmos cada região da glândula ao longo do seu desenvolvimento (figura 12), verificamos que as distribuições desses valores se alteram de maneiras diferentes. Em S_1 de pré-pupas há um decréscimo dos valores de áreas e de volumes nucleares em relação a 1º e início de 4º estádios (1º estádio < pré-pupas < início de 4º estádio). Já em S_2 e S_3 as áreas e volumes nucleares se distribuem em faixas de valores crescentes, de forma que 1º estádio < início de 4º estádio < pré-pupas.

A amplitude de variação é muito maior do que a diferença de juntas, indicando um grande espalhamento dos valores em si.

Observa-se que, em todos os casos, os 50% de valores menores de área e volume se distribuíram em uma faixa menor, enquanto que as áreas dos outros 50% de núcleos maiores se distribuíram em uma faixa maior (assimetria para valores maiores), ou seja, valores mais espalhados. Note-se também que os pontos soltos e desgarrados se encontram localizados principalmente naqueles 25% de valores maiores de áreas (exceto S_1 de 1º estádio), indicando presença de núcleos extremamente grandes comparados com a amostra como um todo, em contrapartida à ausência de núcleos extremamente pequenos (figura 12). Observando-se os valores de volume na figura 23 não

se detecta esta característica tão nitidamente, possivelmente devido ao fato desses valores terem sido normalizados por $\sqrt[5]{}$.

Comparando-se as áreas e volumes nucleares de S_2 e S_3 , em cada fase do desenvolvimento (figuras 12, 13, 23 e 24), verifica-se que os valores são muito diferentes, como confirmado pelo teste t de Welch (tabelas 1 e 3). Por outro lado, o comportamento de cada região comparada ao longo do desenvolvimento só não foi significativamente diferente para a região S_1 , de início de 4º estadio comparada à de pré-pupa (tabelas 2 e 4).

As distribuições dos valores de áreas e volumes nucleares nos vários intervalos de duplicação são mostradas nas figuras 13 e 24 e as frequências relativas percentuais para cada classe são apresentadas na tabela 5. Nesta tabela, são mostrados ainda os intervalos de duplicação dos valores Feulgen-DNA, os quais foram determinados por SILVA (1981). A comparação dessas frequências indica, surpreendentemente, que os valores Feulgen-DNA atingem maiores intervalos de duplicação em comparação àqueles dos valores de área e volume nas três regiões em início de 4º estadio e pré-pupas. Por outro lado, considerando as regiões glandulares em cada fase do desenvolvimento, verificamos que apenas para a fase de 1º estadio larval as frequências maiores estão localizadas em intervalos de duplicações de valores Feulgen-DNA inferiores aos de áreas e volumes. Nas outras duas fases estudadas ocorre o inverso.

Tabela 1. Teste t de Welch para comparação dos valores de áreas nucleares das regiões S_2 e S_3 entre si nas três fases do desenvolvimento pós-embrionário.

Fases do desenvolvimento	S_2	S_3	$S_2 \times S_3$	
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	GL	t
1º estadio	171,49 $\pm$ 57,0	98,04 $\pm$ 31,3	91	8,750**
Início de 4º estadio	564,45 $\pm$ 20,5	269,88 $\pm$ 80,7	75	10,836**
Pré-pupas	1483,20 $\pm$ 492,0	796,61 $\pm$ 295,0	96	9,268**

** significativo ao nível de 1%

Tabela 2. Teste t de Welch para comparação dos valores de áreas nucleares entre diferentes fases do desenvolvimento para as regiões S_1 , S_2 e S_3 . 1º est. = 1º estadio; In. 4º = Início de 4º estadio; P.P. = pré-pupas.

Região	1º est.	In. 4º	P.P.	1º est. x In. 4º		In. 4º x P.P.		1º est. x P.P.	
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	GL	t	GL	t	GL	t
S_1	52,50 $\pm$ 18,0	89,20 $\pm$ 33,6	81,1 $\pm$ 32,9	91	7,502**	118	1,345	91	5,901**
S_2	171,49 $\pm$ 57,0	564,45 $\pm$ 20,5	1483,2 $\pm$ 492,0	71	14,645**	78	13,390**	60	20,495**
S_3	98,04 $\pm$ 31,3	269,88 $\pm$ 80,7	796,6 $\pm$ 295,0	122	18,156**	65	13,514**	60	18,268**

** significativo ao nível de 1%

Tabela 3. Teste t de Welch para comparação dos valores de volumes nucleares das regiões S₂ e S₃ entre si nas três fases do desenvolvimento.

Fases do desenvolvimento	S ₂	S ₃	S ₂ x S ₃	
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	GL	t
1º estadio	4,21 ± 0,42	3,53 ± 0,37	116	9,462**
Início de 4º estadio	5,95 ± 0,69	4,88 ± 0,47	102	10,650**
Pré-pupas	8,04 ± 0,81	6,70 ± 0,75	117	9,441**

** significativo ao nível de 1%

Tabela 4. Teste t de Welch para comparação dos valores de volumes nucleares entre diferentes fases do desenvolvimento para as regiões S₁, S₂ e S₃. 1º est. = 1º estadio; In.4º = Início de 4º estadio; P.P. = pré-pupas.

Região	1º est.	In. 4º	P.P.	1º est. x In.4º		In.4º x P.P.		1º est. x P.P.	
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	GL	t	GL	t	GL	t
S ₁	2,97 ± 0,32	3,47 ± 0,45	3,31 ± 0,46	108	7,122**	118	1,930	105	4,762**
S ₂	4,21 ± 0,42	5,95 ± 0,69	8,04 ± 0,81	102	17,081**	115	15,422**	88	32,647**
S ₃	3,53 ± 0,37	4,88 ± 0,47	6,70 ± 0,75	143	19,564**	90	16,677**	86	29,429**

** significativo ao nível de 1%

Tabela 5. Frequências percentuais nos vários intervalos de duplicação dos valores Feulgen-DNA, áreas e volumes nucleares de S_1 , S_2 e S_3 de glândulas salivares em três fases do desenvolvimento pós-embrionário de B. spatitergum. 1º = 1º estadio; In 4º = Início de 4º estadio; PP = pré-pupas.

Variável	Fases do desenvolvimento	S ₁						S ₂									S ₃								
		I	II	III	IV	V	VI	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Valores Feulgen-DNA (Silva,1981)	1º	27	73	0	0	0	0	13	43	44	0	0	0	0	0	0	53	43	4	0	0	0	0	0	0
	In 4º	0	0	0	17	35	48	0	0	0	0	0	3	37	50	0	0	0	0	0	0	20	53	27	
	PP	0	0	0	7	40	53	0	0	0	0	0	0	20	30	0	0	0	0	0	0	0	17	43	
Áreas nucleares	1º	10	32	45	13	0	0	2	15	60	23	0	0	0	0	0	0	2	28	47	21	2	0	0	0
	In 4º	3	3	35	39	20	0	0	0	10	32	41	17	0	0	0	0	0	0	0	20	51	28	1	0
	PP	0	4	35	32	19	0	0	0	0	0	0	5	27	47	21	0	0	0	0	0	0	10	42	38
Volumes nucleares	1º	10	35	42	13	0	0	2	15	60	21	2	0	0	0	0	0	2	32	47	17	2	0	0	0
	In 4º	3	7	30	44	16	0	0	0	0	10	37	39	14	0	0	0	0	0	0	18	50	30	2	0
	PP	0	18	38	27	17	0	0	0	0	0	0	5	30	50	15	0	0	0	0	0	0	13	42	35

4.2. Análise de proteínas nucleares não-histônicas

4.2.1. Fluorescência pelo cloreto de dansila e ANS

Na figura 25 é apresentada a fluorescência nuclear devida à ligação do cloreto de dansila aos resíduos de lisina (ROSSELET & RUCH, 1968) na região glandular S_2 de início de 4º estadio larval após tratamento com NaCl 3M. As três regiões glandulares, embora não documentadas aqui, apresentam fluorescência amarela fraca, semelhante à imagem mostrada na figura 25. Observou-se também que proteínas ricas em lisina fluorescem intensamente, principalmente no lúmen da região S_3 .

A fluorescência nuclear devida ao ANS apresentou-se de cor azul prateada bem fraca, inclusive no interior do lúmen. Apenas os bordos do lúmen mostravam-se mais fluorescentes devido provavelmente à presença de fosfolipídios das microvilosidades das células glandulares. Não foram observadas, portanto, diferenças notáveis de fluorescência, quer devido à riqueza em resíduos de lisina, quer devido à presença de grupos hidrofóbicos das proteínas, quando as três regiões glandulares foram comparadas entre si, nas três fases do desenvolvimento.

4.2.2. Citofotometria dos núcleos corados com "naphthol yellow S"

Nas figuras 26 a 33 são apresentados alguns aspectos da reatividade do material cromatínico ao "naphthol yellow S". Os núcleos das regiões glandulares S_1 , S_2 e S_3 de pré-pupas (figuras 26 a 32) e de 1º estadio (figuras 31 a 33) mostram, em geral, uma coloração pouco intensa. Foram encon-

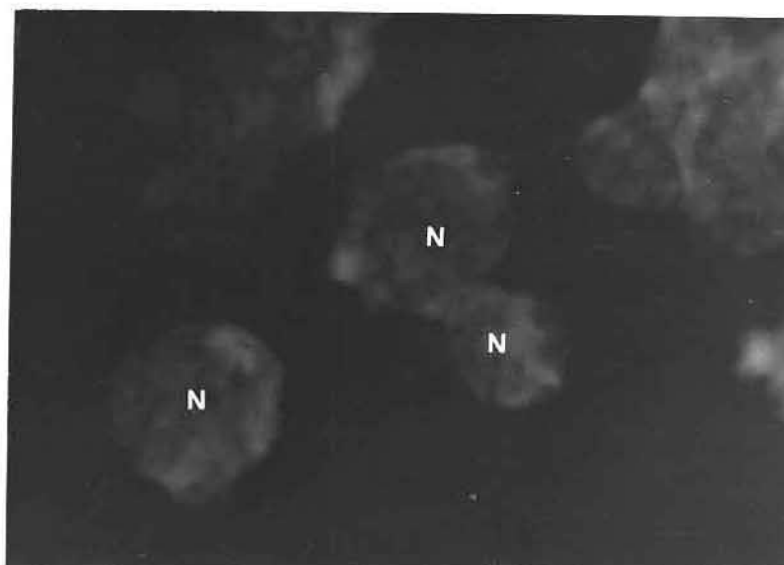


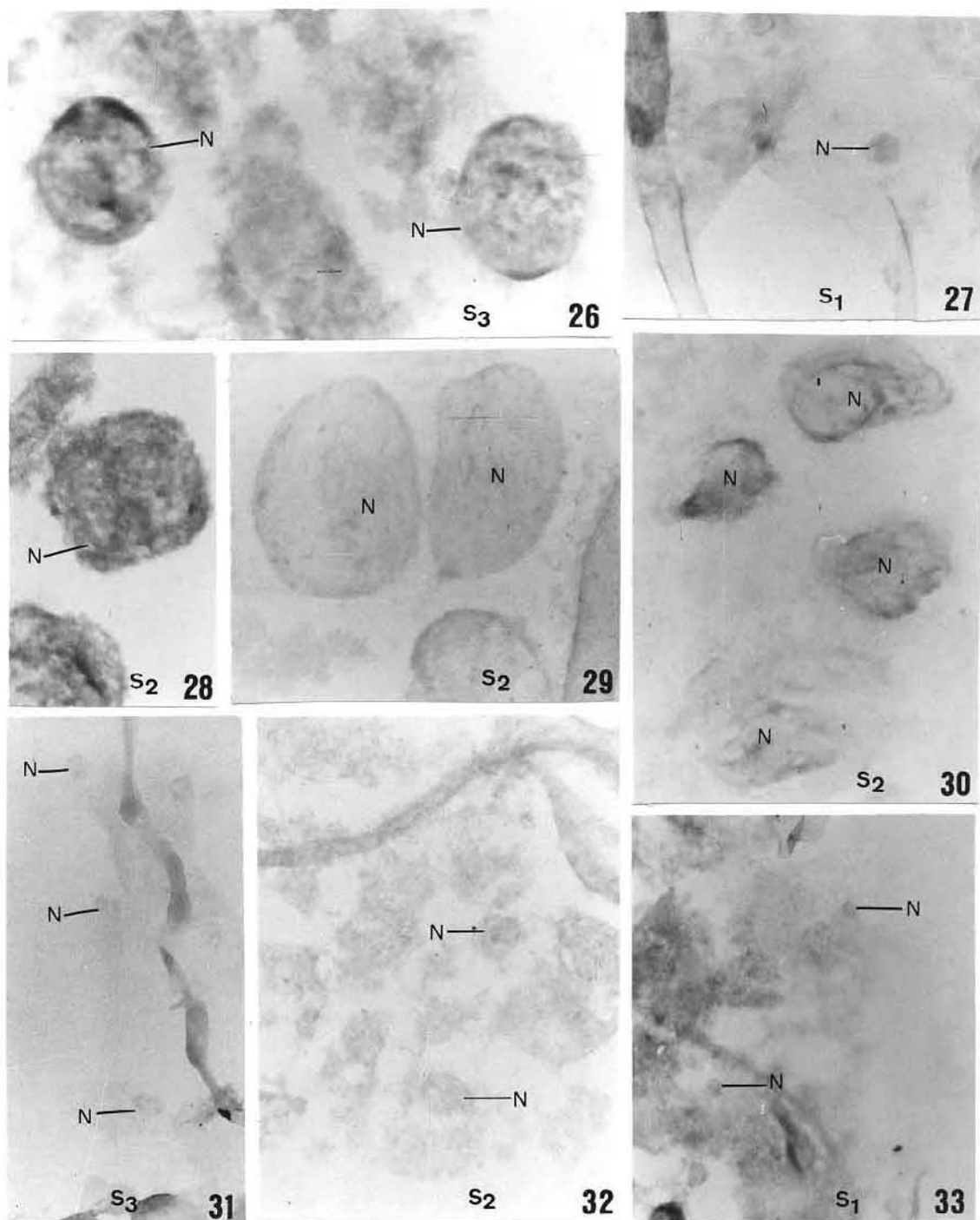
Figura 25. Núcleos da região S_2 glandular de larvas de início de 4º estadio, com fluorescência devida à ligação do cloreto de dansila aos resíduos de lisina das proteínas não histônicas. N = Núcleo. 260x.

trados alguns núcleos da região S_2 de pré-pupa aparentando estar em processo degenerativo (figuras 29 e 30).

Nas figuras 34 a 51 são apresentados os valores "naphthol yellow" - proteínas nucleares não-histônicas resistentes à extração com NaCl 3M, sob a forma diagramática de ramo e folhas. Nas figuras 52 a 58 são mostrados os respectivos diagramas esquemáticos e os histogramas de frequência.

A região S_1 após tratamento com NaCl 3M e extração por TCA, comparada à mesma região, porém não tratada por TCA, apresentou valores distribuídos em intervalos maiores apenas para a fase de início de 4º estadio. Em 1º estadio e pré-pupa os valores diminuíram após o referido tratamento (figuras 52, 55 e 56; tabelas 6, 7 e 8). O teste t de Welch indicou serem estas diferenças significativas ao nível de 5% para início de 4º estadio e a 1% para as outras duas fases do desenvolvimento (tabela 9).

A região S_2 apresentou valores mais baixos nas três fases do desenvolvimento após tratamento com TCA (figura 53; tabelas 6, 7 e 8). O teste t , no entanto, indicou serem significativamente diferentes apenas os valores de 1º e início de 4º estadios (tabela 9). Por outro lado, em pré-pupas, embora a diferença não seja significativa, a dispersão dos 50% de valores localizados entre o 1º e 2º quartil diminui após tratamento por TCA. Além disso, a não significância foi influenciada pelos pontos desgarrados que aparecem no diagrama referente a tratamento com TCA (figura 53), pois de fato excluindo-se os pontos referidos anteriormente, o teste t indicou serem aquelas amostras significativamente diferentes ao nível de 1% ($t = 3,986$; GL = 45).



Figuras 26 a 33. Núcleos das regiões S_1 , S_2 e S_3 de pré-pupas (26 a 30) e 1º estadio (31 a 33) corados com "naphthol yellow S" após tratamento com NaCl 3M. Notar núcleos com aspecto degenerativo nas figuras 29 e 30. N = Núcleo. 345x.

Fig. 34

-3	
x10	
27:28	:564
25:26	:894
23:24	384:645749
21:22	:518
19:20	736:565
17:18	027206573824
15:16	510
13:14	292404692:618
11:12	003
9:10	286392:330626740835
7:8	
5:6	
3:4	:145

Fig. 35

-3	
x10	
27:28	943
25:26	
23:24	
21:22	
19:20	
17:18	
15:16	
13:14	358536:408
11:12	:311615
9:10	547:279366
7:8	090253350:210389
5:6	469:018109
3:4	983:263303

Figuras 34 e 35. Ramo e folhas dos valores "naphthol yellow S" - proteínas não histônicas nucleares em unidades arbitrárias da região S_1 da glândula salivar de larvas de 1º estadio tratadas com NaCl 3M (coloração não precedida de tratamento com TCA, Fig. 34; coloração precedida de tratamento com TCA, Fig. 35). Na primeira linha da figura 34, embaixo, lê-se 4,145; na segunda, 9,286; 9,392; 10,330; 10,626; 10,740; 10,835, e assim por diante.

Fig. 36

-2	
x10	
19:20	:241802
17:18	:185523
15:16	183474678743862:447905
13:14	086769
11:12	425935
9:10	:173294813880
7:8	316917:061464540
5:6	362

Fig. 37

-2	
x10	
13:14	:441
11:12	222:014
9:10	200657:153
7:8	430:007446856868888
5:6	130158174978:248542994
3:4	:190263432588610630874

Figuras 36 e 37. Ramo e folhas dos valores "naphthol yellow S" - proteínas não histônicas nucleares em unidades arbitrárias da região S_2 da glândula salivar de larvas de 1º estadio. 36: método sem TCA; 37: método com TCA. Na primeira linha da figura 36, embaixo, lê-se 53,62; na segunda, 73,16; 79,17; 80,61; 84,64; 85,40, e assim por diante.

Fig. 38

-2	
x10	
17:18	:685
15:16	
13:14	241
11:12	495655721
9:10	
7:8	376780
5:6	206209262296353400414679802835:393364494697707833948990
3:4	647799:155481793

Fig. 39

-2	
x10	
15:16	
13:14	:836
11:12	:899
9:10	:037
7:8	585:131502743
5:6	032622:091155354432
3:4	019793:056106310352651832972
1:2	:950

Figuras 38 e 39. Ramo e folhas dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não histônicas em unidades arbitrárias da região S₂ da glândula salivar de larvas de 1º estadio. 38: método sem TCA; 39: método com TCA. Na primeira linha da figura 38, embaixo, lê-se 36,47; 37,99; 41,55; 44,81; 47,93, e assim por diante.

Fig. 40

	-2 x10
21:22	011
19:20	
17:18	:637
15:16	454961
13:14	
11:12	869:695
9:10	626895:330347
7:8	556615:186200699816
5:6	746966969:101129742
3:4	802:534

Fig. 41

	-2 x10
21:22	170
19:20	426
17:18	397
15:16	935
13:14	:020269298902
11:12	024083:042971
9:10	211:053120
7:8	016344:337490983
5:6	:492
3:4	:841

Figuras 40 e 41. Ramo e folhas dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não histônicas em unidades arbitrárias da região S₁ da glândula salivar de larvas de início de 4º estadio. 40: método sem TCA; 41: método com TCA. Na primeira linha da figura 40, embaixo, lê-se 38,02; 45,34, e assim por diante.

Fig. 42

-2	
x10	
37:38	:5182
35:36	
33:34	7767:5438
31:32	:8173
29:30	0133:02116335
27:28	:11255581
25:26	
23:24	:3139
21:22	:9488
19:20	:8048
17:18	2627:400540578086
15:16	1797265774668640:1849
13:14	2553:072619602646420087869626
11:12	383944239427:266328949262
9:10	9728:3860
7:8	07268523

Fig. 43

-2	
x10	
37:38	
35:36	
33:34	
31:32	
29:30	5589
27:28	0488
25:26	2358:0689
23:24	0293
21:22	:5151
19:20	:0707
17:18	00067447:43515759
15:16	085468498162
13:14	6483:3733
11:12	082610008402456055139057
9:10	1951:1912386856187695
7:8	:0244
5:6	212132183555
3:4	087527086346:0973787584789508

Figuras 42 e 43. Ramo e folhas dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não histônicas em unidades arbitrárias da região S₂ da glândula salivar de larvas de início de 4º estadio. 42: método sem TCA; 43: método com TCA. Na primeira linha da figura 42, embaixo, lê-se, 707,26; 885,23; na segunda, 997,28; 1038,60; e assim por diante.

Fig. 44

-2	
x10	
23:24	
21:22	5093
19:20	
17:18	
15:16	:6351
13:14	6324
11:12	
9:10	371740969440:4563
7:8	1038382245885193655382408806:02661440512859836769
5:6	00861334310843064474541577259120:190146314819666475427822
3:4	75678832:08501985334280038680

Fig. 45

-2	
x10	
17:18	
15:16	
13:14	4203:1172
11:12	70167194:9666
9:10	005410032356:4196
7:8	37523795543555495917:38816471
5:6	026818252475412152967242834194939798:1100202828422921487754996848689579109798
3:4	36585564:029060726461

Figuras 44 e 45. Ramo e folhas dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares histônicas em unidades arbitrárias da região S₃ da glândula salivar de larvas de início de 4º estadio. 44: método sem TCA; 45: método com TCA. Na primeira linha da figura 44, embaixo, lê-se 375,67; 388,32; 408,50; 419,85; e assim por diante.

Fig. 46

-2	
x10	
25:26	403
23:24	
21:22	
19:20	:355454
17:18	198431
15:16	:951
13:14	258509576750838:296
11:12	090101279407724:512678820
9:10	544640:101314
7:8	676:114
5:6	325:104
3:4	:167
1:2	:947

Fig. 47

-2	
x10	
17:18	
15:16	269
13:14	
11:12	
9:10	
7:8	153252374:782926
5:6	107610829896937950:412432492
3:4	148:442818
1:2	468692791874:439631810

Figuras 46 e 47. Ramo e folhas dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não histônicas em unidades arbitrárias da região S₁ da glândula salivar de pré-pupas. 46: método sem TCA; 47: método com TCA. Na primeira linha da figura 46, embaixo, lê-se 29,47; na segunda, 41,67, e assim por diante.

Fig. 49

-2	
x10	
87:88	3229
85:86	
83:84	
81:82	
79:80	
77:78	
75:76	:9500
73:74	
71:72	
69:70	
67:68	
65:66	
63:64	
61:62	
59:60	
57:58	
55:56	5959
53:54	
51:52	
49:50	
47:48	
45:46	
43:44	
41:42	
39:40	
37:38	:1525
35:36	
33:34	
31:32	
29:30	
27:28	
25:26	7413
23:24	38529187
21:22	2876
19:20	:80668778
17:18	392591469839
15:16	:7186
13:14	22406135:64938482
11:12	9446
9:10	9595:59766784
7:8	5491
5:6	9521:6867

Fig. 48

-2	
x10	
55:56	9105
53:54	
51:52	
49:50	:0915
47:48	:6431
45:46	3103
43:44	1335
41:42	
39:40	
37:38	53553574
35:36	:6374
33:34	9608
31:32	7430
29:30	6127
27:28	1611:8951
25:26	1856:76188675
23:24	
21:22	:8727
19:20	0448
17:18	:47344897
15:16	03443475355560847361
13:14	
11:12	7796:07477694

Figuras 48 e 49. Ramo e folhas dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não histônicas em unidades arbitrárias da região S₂ da glândula salivar de pré-pupas. 48: método sem TCA; 49: método com TCA. Na primeira linha da figura 48, embaixo, lê-se 1177,96; 1207,47; 1276,94, e assim por diante.

Fig. 50

-2	
x10	
45:46	4687
43:44	
41:42	
39:40	
37:38	
35:36	
33:34	
31:32	
29:30	
27:28	7986
25:26	5782
23:24	:44729227
21:22	:1557
19:20	1566339061647640:577058798636
17:18	:611092199261
15:16	7290:7776
13:14	50178875:74279523
11:12	25866929:419957678736
9:10	:5707
7:8	2954
5:6	:2768

Fig. 51

-2	
x10	
47:48	0915
45:46	:6027
43:44	
41:42	0519
39:40	:6593
37:38	
35:36	16429084
33:34	7823:22183893
31:32	:2999
29:30	28756848
27:28	1463
25:26	
23:24	
21:22	
19:20	48755890
17:18	
15:16	2005:9019
13:14	
11:12	44246909
9:10	
7:8	:9788

Figuras 50 e 51. Ramo e folhas dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não histônicas em unidades arbitrárias da região S₃ da glândula salivar de pré-pupas. 50: método sem TCA; 51: método com TCA. Na primeira linha da figura 50, embaixo, lê-se 627,68; na segunda, 729,54, e assim por diante.

Figura 52. Diagramas esquemáticos representando as relações entre os valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não-histônicas para a região S_1 da glândula salivar nas três fases do desenvolvimento. (1º = 1º estadio larval; In 4º = Início de 4º estadio; p.p. = prē-pupas). Em cima, os respectivos esquemas de cinco números, onde: # = número de observações; * = menor valor; J_1 = 1º quartil; MD = Mediana; J_2 = 2º quartil; * = maior valor. x = valor extremo, mínimo ou máximo, que se encontra dentro do comprimento de uma diferença de junta da junta respectiva.

S_1

#	25	24	30	20	22	25
*	4.1	38.0	29.5	3.98	48.4	14.7
J_1	10.8	61.2	96.4	6.1	84.9	27.7
MD	15.5	84.5	121.2	8.3	110.5	58.3
J_2	21.1	111.1	138.4	12.5	143.0	66.9
*	28.6	220.1	254.0	21.9	211.7	152.7

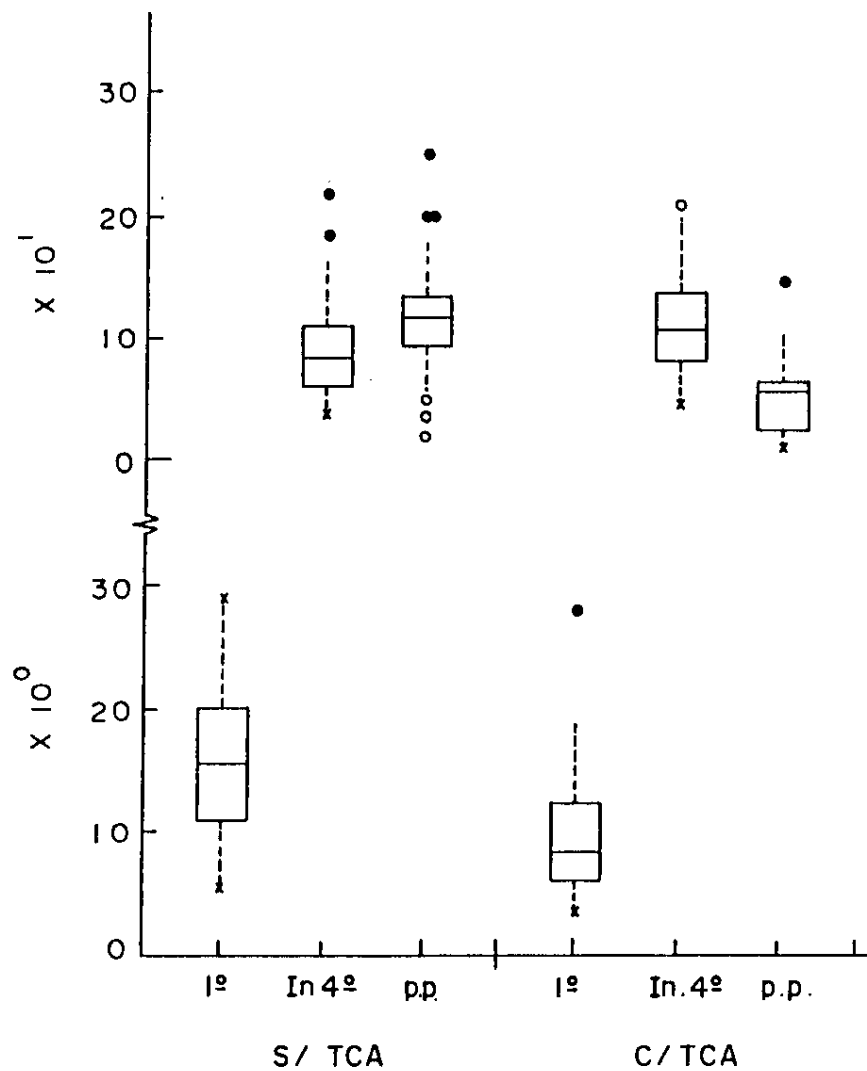


Figura 53. Diagramas esquemáticos representando as relações entre os valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não-histônicas para a região S_2 da glândula salivar nas três fases do desenvolvimento. (1º = 1º estadio larval; In 4º = Início de 4º estadio larval; pp = pré-pupas. Em cima, os respectivos esquemas de cinco números, onde: # = número de observações; * = menor valor; J_1 = 1º quartil; MD = Mediana; J_2 = 2º quartil; * = maior valor. x = valor extremo, mínimo ou máximo, que se encontra dentro do comprimento de uma diferença de junta da junta respectiva.

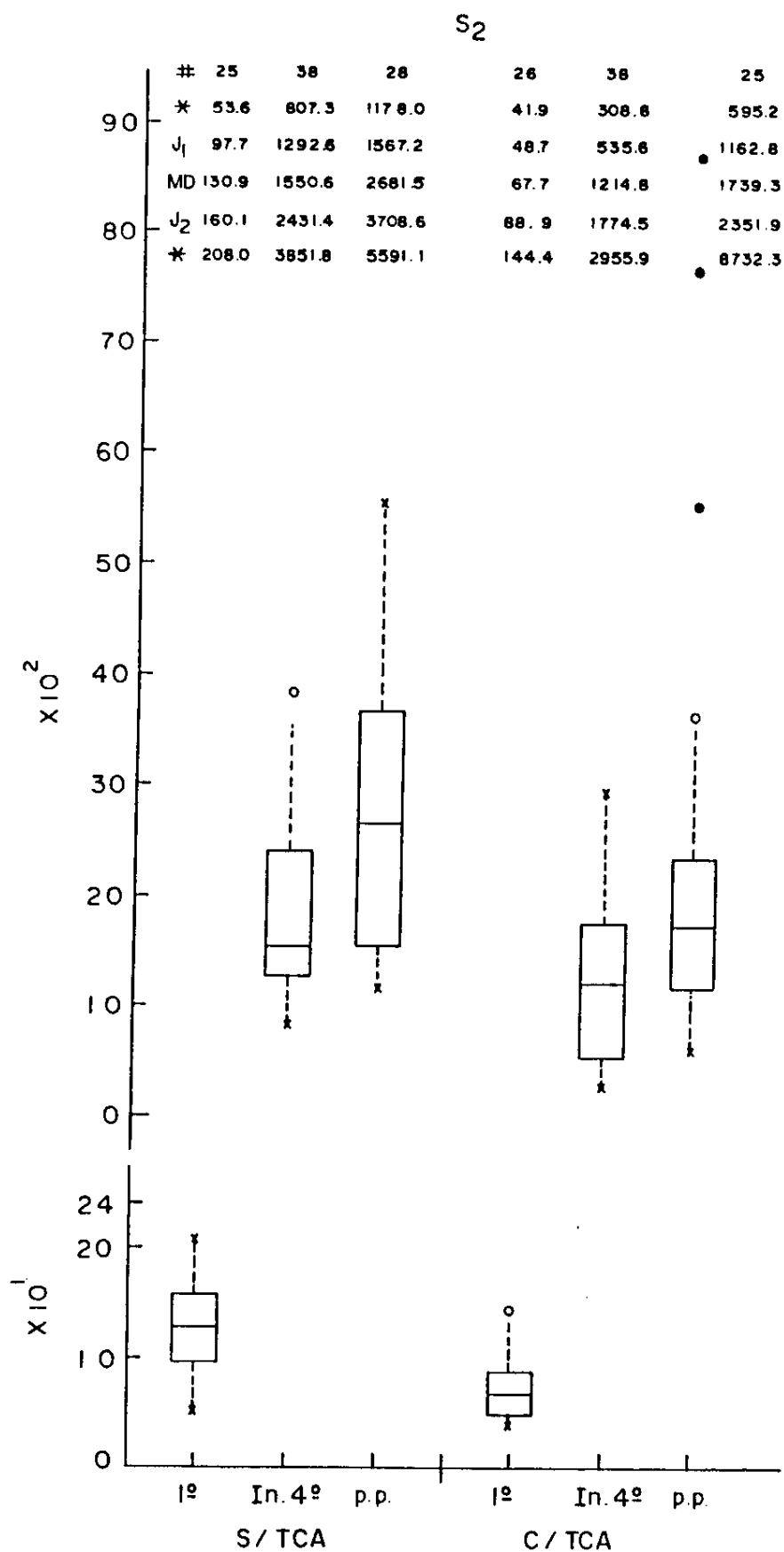


Figura 54. Diagramas esquemáticos representando as relações entre os valores "naphthol yellow S" -proteínas nucleares não-histônicas para a região S_3 da glândula salivar nas três fases do desenvolvimento. (1º = 1º estadio larval; In 4º = Início de 4º estadio larval; pp = pré-pupas. Em cima, os esquemas de cinco números, onde: # = número de observações; * = menor valor; J_1 = 1º quartil; MD = Mediana; J_2 = 2º quartil; * = maior valor. x = valor extremo, mínimo ou máximo, que se encontra dentro do comprimento de uma diferença de junta da junta respectiva.

S₃

#	30	40	30	23	40	20
*	36.5	375.7	627.7	29.5	336.6	897.9
J ₁	52.6	537.1	1287.4	43.2	562.7	1819.5
MD	60.9	676.8	1431.5	56.2	661.7	3099.2
J ₂	69.9	832.8	2058.8	79.9	851.8	3553.6
*	186.9	2150.9	4546.9	148.4	1411.7	4709.2

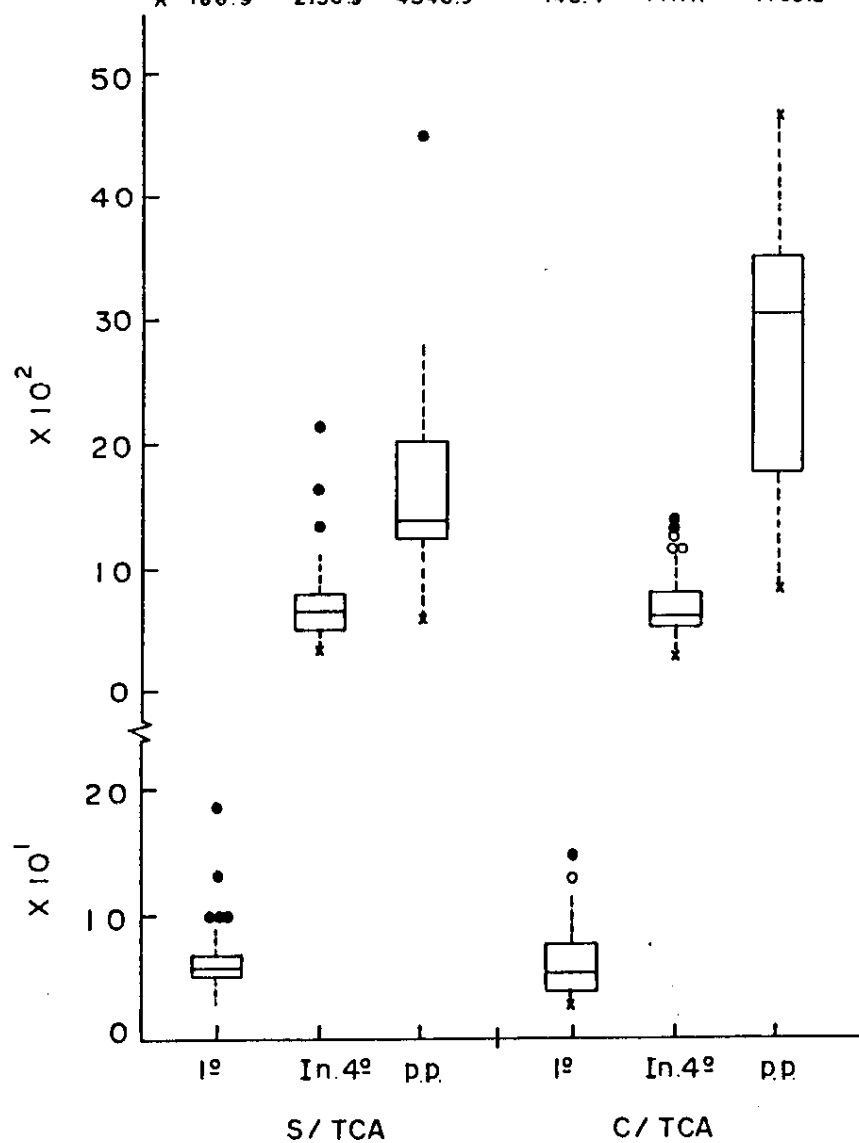


Figura 55. Histogramas das frequências dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não-histônicas em unidades arbitrárias dos núcleos da regiões glandulares S_1 , S_2 e S_3 nas três fases do desenvolvimento estudadas. I a XII correspondem aos intervalos de duplicação dos valores.

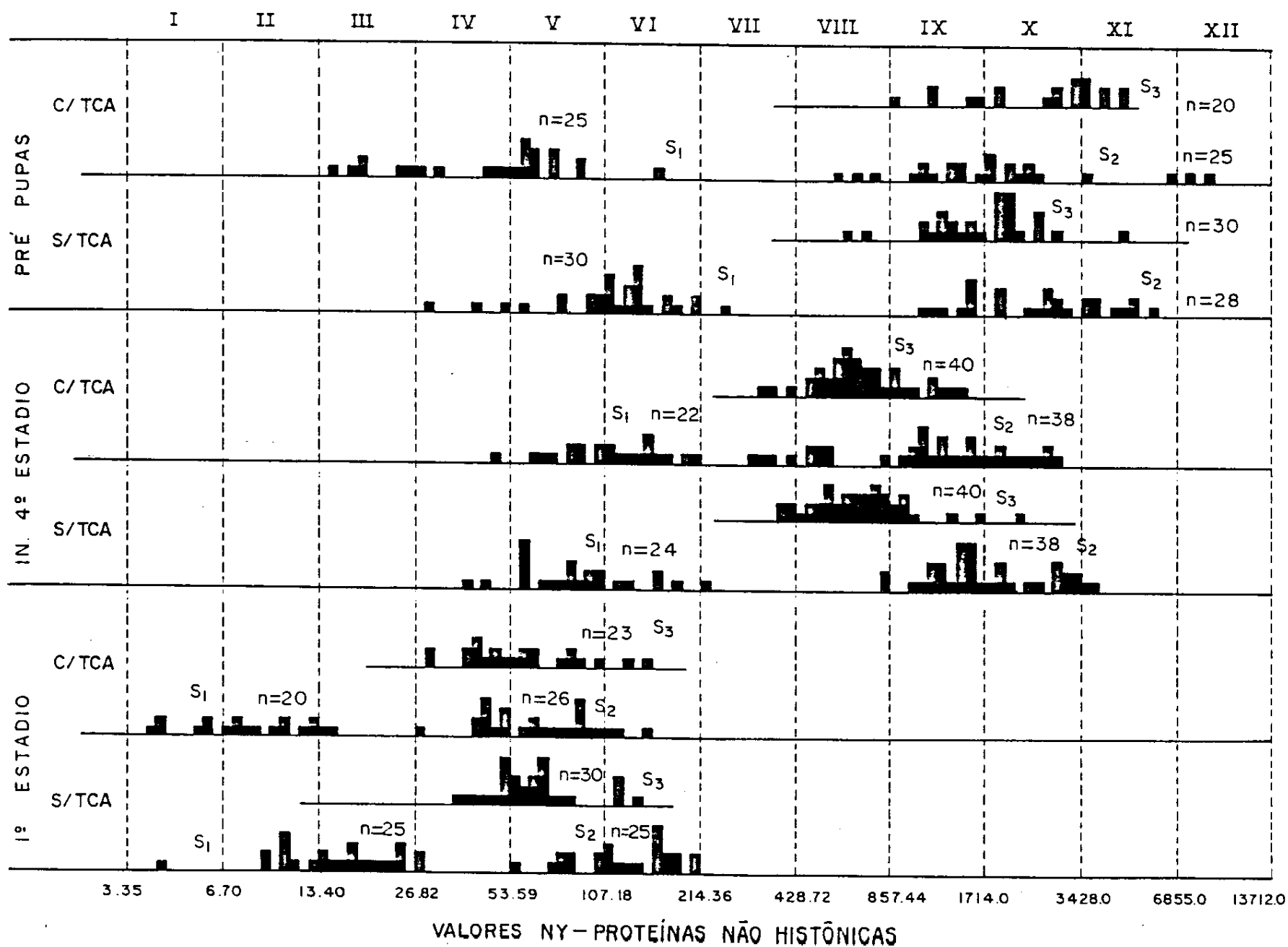


Figura 56. Histogramas das frequências dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não-histônicas em unidades arbitrárias dos núcleos da região S_1 nas três fases do de desenvolvimento. I a VII correspondem aos intervalos de duplicação dos valores.

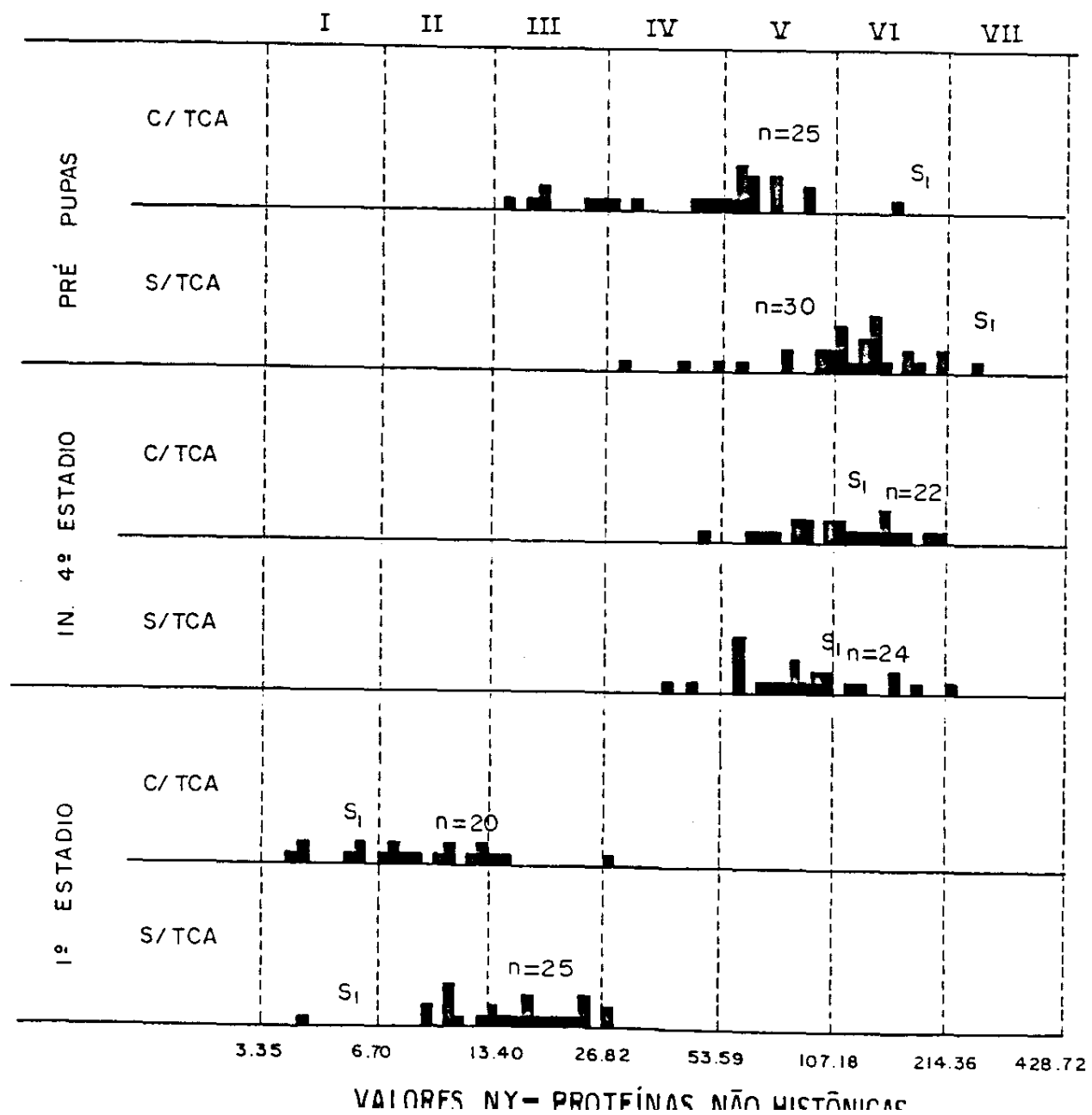


Figura 57. Histogramas das frequências dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não-histônicas em unidades arbitrárias dos núcleos da região S_2 nas três fases do desenvolvimento. IV a XII correspondem aos intervalos de duplicação dos valores.

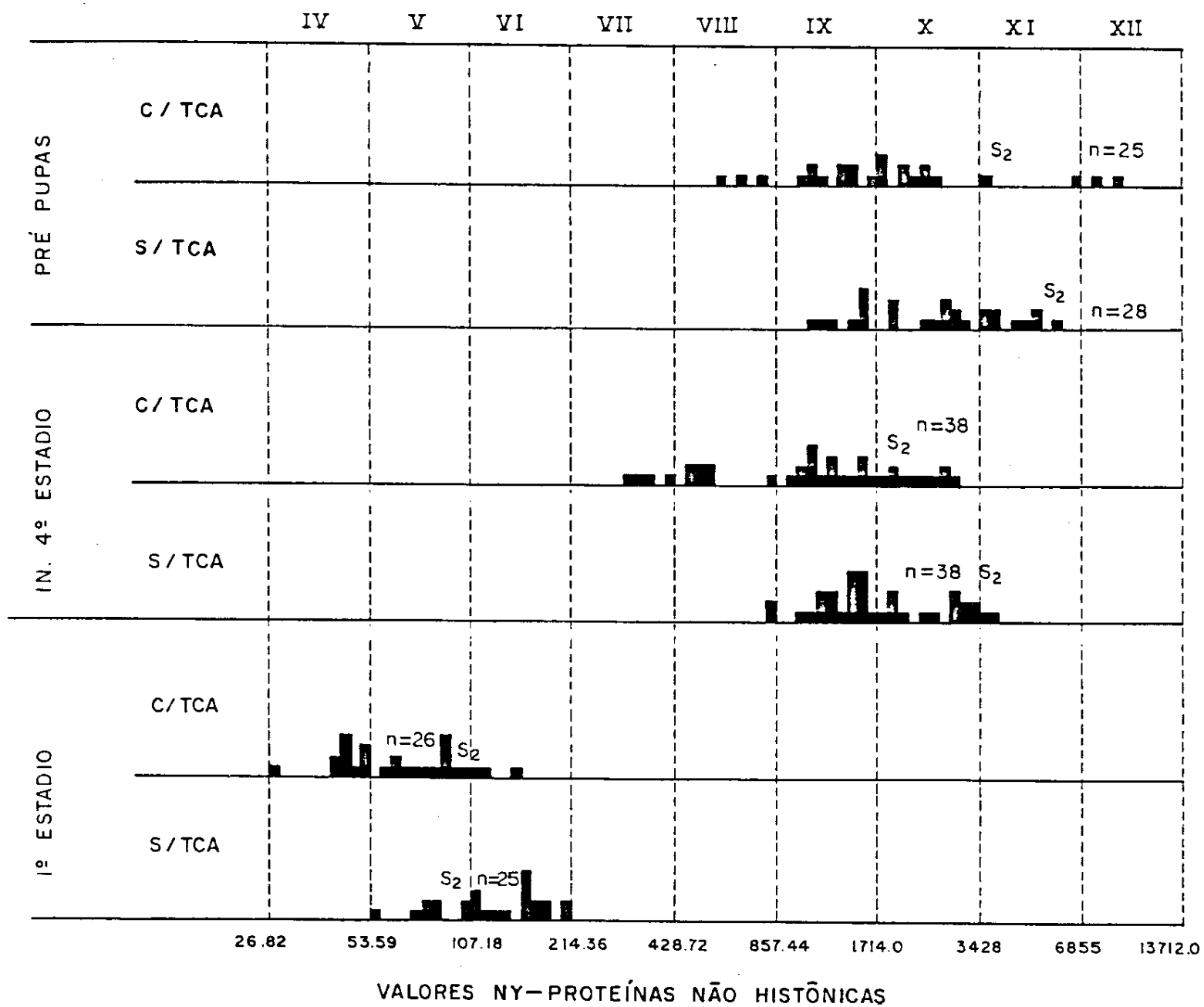
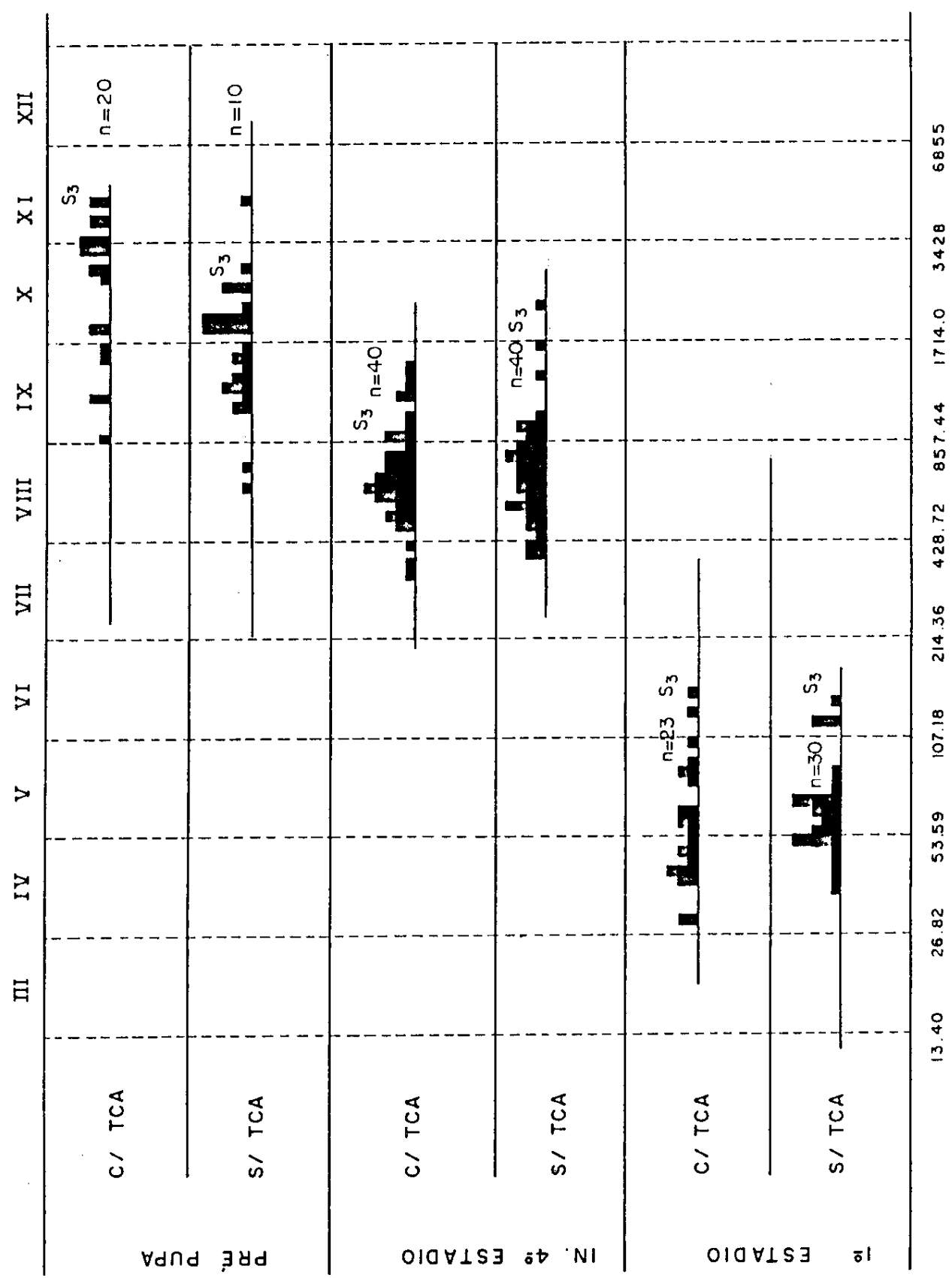


Figura 58. Histogramas das frequências dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não-histônicas em unidades arbitrárias dos núcleos da região S_3 nas três fases do desenvolvimento. III a XII correspondem aos intervalos de duplicação dos valores.



VALORES NY — PROTEÍNAS NÃO HISTÔNICAS

Tabela 6. Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação para as medidas "naphthol yellow S" - proteínas não histônicas (em $\lambda=450\text{nm}$) nas condições experimentais de tratamento com NaCl 3M antes da fixação, com e sem tratamento pelo TCA, para os núcleos das regiões glandulares S_1 , S_2 e S_3 de larvas de 1^o estágio.

Região	sem TCA			com TCA		
	N	$\bar{X} \pm S$	CV(%)	N	$\bar{X} \pm S$	CV(%)
S_1	25	16,30 $\pm$ 6,31	38,71	20	9,64 $\pm$ 5,41	56,12
S_2	25	130,8 $\pm$ 42,9	32,80	26	73,1 $\pm$ 27,4	37,48
S_3	30	70,2 $\pm$ 32,5	46,30	23	64,1 $\pm$ 30,2	47,11

Tabela 7. Valores de média, desvio padrão e coeficientes de variação para as medidas "naphthol yellow S" - proteínas não histônicas (em $\lambda=450\text{nm}$) nas condições experimentais de tratamento com NaCl 3M antes da fixação, com e sem tratamento por TCA, para os núcleos das regiões glandulares S_1 , S_2 e S_3 de larvas de início de 4º estadio.

Região	sem TCA			com TCA		
	N	$\bar{X} \pm S$	CV(%)	N	$\bar{X} \pm S$	CV(%)
S_1	24	96,20 $\pm$ 45,34	47,13	22	117,92 $\pm$ 42,91	36,39
S_2	38	1879,64 $\pm$ 823,16	43,79	38	1306,77 $\pm$ 731,0	55,94
S_3	40	745,65 $\pm$ 342,09	45,88	40	728,33 $\pm$ 262,16	35,99

Tabela 8. Valores de média, desvio padrão e coeficientes de variação para as medidas "naphthol yellow S" - proteínas não histônicas (em $\lambda=450\text{nm}$) nas condições experimentais de tratamento com NaCl 3M antes da fixação, com e sem tratamento por TCA, para os núcleos das regiões glandulares S_1 , S_2 e S_3 de pré-pupa.

Região	sem TCA			com TCA		
	N	$\bar{X} \pm S$	CV(%)	N	$\bar{X} \pm S$	CV(%)
S_1	30	122,85 $\pm$ 48,99	39,88	25	54,21 $\pm$ 30,29	55,87
S_2	28	2786,15 $\pm$ 1280,79	45,97	25	2327,00 $\pm$ 2055,24	88,32
S_3	30	1804,30 $\pm$ 740,48	41,04	20	2852,90 $\pm$ 1173,90	41,15

Tabela 9. Teste t de Welch para comparação dos valores "naphthol yellow S" - proteínas não-histônicas obtidos para os núcleos das regiões S₁, S₂ e S₃ da glândula salivar após tratamento com NaCl 3M antes da fixação, com e sem TCA antes da coloração, nas três fases do desenvolvimento.

Região	1º estadio		Início de 4º estadio		Pré-pupas	
	t	GL	t	GL	t	GL
S ₁	3,808**	42	1,669*	43	6,354**	49
S ₂	5,707**	40	3,210**	72	0,965	39
S ₃	0,705	49	0,254	73	3,551**	29

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

Finalmente, para a região S_3 , apenas os dados de pré-pupas apresentaram-se significativamente diferentes sob influência do TCA (tabela 9). Neste caso, os valores aumentaram após extração com TCA (figura 54) e ocorreu não só uma dispersão dos 50% de valores intermediários como também uma inversão nesta distribuição, ou seja, os 25% de valores que ocupam a faixa mais estreita (entre 1º e 2º quartil) estão localizados abaixo da mediana no material não tratado e acima da mediana no tratado com TCA, ou seja, há uma assimetria invertida dos 50% de valores internos.

Na maioria dos casos, os pontos soltos e desgarrados se encontram localizados nos 25% de valores extremos maiores (figuras 52, 53 e 54).

Comparando-se cada região, com ou sem tratamento por TCA, ao longo do desenvolvimento, verifica-se que sempre os valores de 1º estadio são bem menores que os de início de 4º estadio e pré-pupas, consideradas as três regiões (figuras 52 a 57). Como era de se esperar (SILVA, 1980), os valores obtidos nas diferentes fases do desenvolvimento são significativamente diferentes entre si, ao nível de 1% (tabela 10). Comparações feitas entre as fases do desenvolvimento duas a duas mostram que os valores de pré-pupas, com exceção da região S_1 após tratamento com TCA, em relação a início de 4º estadio, sempre se distribuíram em uma faixa de valores maiores (figuras 52 a 54). Essas diferenças foram significativas ao nível de 1%, com exceção de S_1 sem TCA e S_2 com TCA, significativos ao nível de 5% (tabela 11). No caso da região S_1 , no entanto, a não significância a 1% se

Tabela 10. Análise de variância para os valores de absorbância "naphthol yellow S" - proteínas não histônicas para cada condição de tratamento dos núcleos das regiões S₁, S₂ e S₃ da glândula salivar, comparando-se as três fases do desenvolvimento pós-embrionário

Região	sem TCA		com TCA	
	F	$\frac{GL}{E/D}$	F	$\frac{GL}{E/D}$
S ₁	52,48**	2/76	65,39**	2/64
S ₂	60,73**	2/88	23,10**	2/86
S ₃	108,82**	2/97	126,72**	2/80

** significativo ao nível de 1%

deve aos pontos soltos dos 25% dos valores mais baixos, uma vez que excluindo-se os três pontos soltos do diagrama de pré pupas, o teste t indicou serem os valores comparados significativamente diferentes ao nível de 1% ($t = 2,8897$; $GL = 49$).

Os valores "naphthol yellow" - proteínas nucleares não-histônicas de S_1 são sempre os menores da glândula em todas as fases do desenvolvimento estudadas (figuras 52 e 55; tabelas 6, 7 e 8). S_2 e S_3 apresentam valores altos em todos os tratamentos. No entanto, nem sempre a média aritmética des creve bem o conjunto de dados, uma vez que os coeficientes de variação foram muito altos, em alguns casos maior que 50% (ta_{belas} 6, 7 e 8).

Na maioria dos casos S_2 ocupa pelo menos um intervalo de duplicação superior ao de S_3 . Isto não ocorre para a região S_2 de pré-pupas que ocupa pelo menos um intervalo de duplicação menor do que de S_3 , e região S_2 de 1º estadio cuja distribuição de seus valores nos intervalos de classe é muito semelhante a S_3 (figura 55).

Tabela 11. Teste t de Welch para comparação dos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não histônicas das regiões S_1 , S_2 e S_3 entre as diferentes fases do desenvolvimento, para cada condição de tratamento.

Região	Fases do desenvolvimento	Tratamento			
		sem TCA		com TCA	
		t	GL	t	GL
S_1	1º estadio x Início de 4º estadio	8,554 ^{**}	23	11,734 ^{**}	21
	Início de 4º estadio x Pré-pupas	2,071 [*]	50	5,807 ^{**}	37
	1º estadio x Pré-pupas	11,796 ^{**}	30	7,215 ^{**}	25
S_2	1º estadio x Início de 4º estadio	13,069 ^{**}	37	10,387 ^{**}	37
	Início de 4º estadio x Pré-pupas	3,282 ^{**}	43	2,386 [*]	28
	1º estadio x Pré-pupas	10,965 ^{**}	27	5,483 ^{**}	24
S_3	1º estadio x Início de 4º estadio	12,413 ^{**}	39	15,842 ^{**}	40
	Início de 4º estadio x Pré-pupas	7,270 ^{**}	38	7,995 ^{**}	19
	1º estadio x Pré-pupas	12,814 ^{**}	29	10,621 ^{**}	19

** significativo ao nível de 1%

* significativo ao nível de 5%

5. DISCUSSÃO

5.1. Dados cariométricos

Como era esperado (SILVA, 1980, 1981), os tamanhos nucleares de S_2 e S_3 foram sensivelmente maiores que os de S_1 , nas glândulas salivares, ao longo do desenvolvimento de Brady-sia spatitergum. Exceto para os núcleos das três regiões no 1º estadio larval, os valores de área e volume nuclear não apresentaram aumentos acima daqueles promovidos pelo próprio fenômeno de endorreplacação ao longo do desenvolvimento, ou daqueles relacionados às diferentes áreas glandulares, comparadas entre si. No 1º estadio, especialmente, na região S_3 , é de se esperar que uma participação em proteínas nucleares não-histônicas (e/ou RNA) contribua para os valores aumentados dos tamanhos nucleares. É de surpreender, no entanto, que justamente no início de 4º estadio, em que o grau de politenização e a atividade de transcrição e de síntese proteica aparecem realçados, especialmente em S_2 e S_3 (SILVA, 1980, 1981; MELLO & CORDEIRO, 1985), um aumento extra no tamanho nuclear não tenha sido constatado. Isto, se se pensar em termos de que intensa atividade nuclear deva estar associada a aumento em conteúdo de RNA e proteínas nucleares não-histônicas (PALKOVITS & FISHER, 1968). Ao contrário, os valores de área e volume nucleares aparecem menores que os esperados, em comparação ao conteúdo de DNA determinado por SILVA (1981). Se for considerado que o conteúdo de DNA dos núcleos utilizados para estudo das proteínas nucleares não-histônicas no presente caso corresponda àquele detectado por SILVA (1981), pareceria estar ocorrendo retração nuclear em parte da população celular no início do 4º estadio larval e em núcleos das regiões S_1 e S_3 de pré-pupa. Em favor dessa hipó

pótese vale a pena ressaltar que em células NIH/3T3 transformadas por transfecção com oncogenes ras, parte da população nuclear, ao contrário do que se esperava, sofreu diminuição em tamanho, acompanhada de compactação de algumas áreas cromatínicas, justamente quando se instala a atividade tumorigênica (MELLO & RUSSO, 1986). No caso de B. spatitergum poderiam estar ocorrendo em regiões glandulares e fases do desenvolvimento específicas caracterizadas por intensa atividade de transcrição e síntese, fenômenos de compactação cromatínica de áreas não envolvidas diretamente nessa atividade e que se refletissem no tamanho nuclear.

Uma outra tentativa para explicar tal resultado talvez possa residir no fato de que a criação dessas moscas vinha sendo mantida ininterruptamente, desde 1978, quando foi utilizada por SILVA para estudos de conteúdo de DNA e citoquímica e que o permanente endocruzamento a que foi submetida esta população tenha reduzido os números de endorreplicações no 4º estadio larval e na pré-pupa, em comparação com aqueles obtidos por SILVA (1981).

O fato de que os valores de áreas e volumes decresceram relativamente em pré-pupas pode estar relacionado com a histólise glandular, que nos dípteros, e em especial nos sciarídeos, inicia-se nessa fase (ASHBURNER, 1967, 1969, 1970; MACGREGOR & MACKIE, 1967; KLOETZEL & LAUFER, 1969, 1970; HARROD & KASTRITSIS, 1972; LANE et alii, 1972; von GAUDECKER & SCHMALE, 1974; JURAND & PAVAN, 1975; SILVA, 1980; GIORGIO et alii, 1983).

Em Drosophila melanogaster foi demonstrado que o fenômeno de histólise, iniciado na fase de pré-pupa, ocorre

após a formação de um pufe específico, sendo acompanhado por redução do volume nuclear (LANE et alii, 1972), e que os cromossomos politênicos dessas glândulas salivares exibem uma alta atividade de síntese analisada através do aparecimento de vários pufes (von GAUDECKER & SCHMALE, 1974).

No sciarídeo Rhynchosciara angelae foi demonstrado que ao final do 4º estadio larval surgem vários pufes de DNA nos cromossomos politênicos da glândula salivar e que a regressão desses pufes coincide com o final de 4º estadio e início da série de eventos histolíticos que ocorrem na glândula, nas fases pré-pupal e pupal, no que diz respeito aos cromossomos politênicos, envolvendo inclusive o aparecimento de um número crescente de ligações ectópicas (SIMÕES et alii, 1976).

Por outro lado, há sugestão de que se a redução de tamanho nuclear é acompanhada por degradação de determinadas proteínas nucleares não-histônicas, não significa necessariamente que o conteúdo total destas proteínas apareça diminuído, uma vez que outras proteínas não histônicas poderiam estar sendo produzidas e transportadas para o núcleo. LAUFER et alii (1965) estudaram as glândulas salivares de Chironomus sugerindo que a destruição glandular é acompanhada por um aumento nos núcleos da atividade DNase.

5.2. Proteínas nucleares não-histônicas remanescentes após extração com NaCl 3M

Após o tratamento extrativo com NaCl 3M, em todas as regiões glandulares, desde o 1º estadio larval até a fase de pré-pupa, foram detectadas proteínas nucleares não-histônicas reativas ao "naphthol yellow S" e portadoras de resí-

duos de lisina e de grupamentos hidrofóbicos. No que se refere aos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não-histônicas, estes foram sempre menores em S_1 , comparados aos de S_2 e S_3 , o que era de se esperar, da mesma forma que para os dados cariométricos (item 5.1.).

Em relação ao tipo de proteínas nucleares não-histônicas extraídas e remanescentes após tratamento com NaCl 3M, os trabalhos encontrados na literatura geralmente apresentam dados para cromatina isolada. No caso do presente trabalho, tal técnica experimental não pôde ser realizada, uma vez que havia pouca disponibilidade de material em mesma fase para extrações e principalmente considerando-se a necessidade de se correlacionar os núcleos com as respectivas regiões glandulares. Uma vez que as proteínas nucleares não-histônicas se encontravam no interior dos núcleos, sua remoção pode ter sido dificultada, se se considerasse o mesmo procedimento extrativo, porém para cromatina isolada.

Tem sido demonstrado por vários autores que grupos básicos das proteínas nucleares ficam bloqueados por moléculas de DNA em tal extensão que, antes da coloração com "naphthol yellow S", faz-se necessária a remoção do DNA (DEITCH, 1955, 1966; GAUB, 1976a; TAS et alii, 1980; MITCHELL et alii, 1981). Os grupos básicos mencionados pelos autores são derivados não só das histonas, removidas pelo NaCl, mas também das proteínas não-histônicas, e a remoção de DNA tem sido feita rotineiramente pelo uso do TCA (ALFERT & GESCHWIND, 1953; DEITCH, 1955; GAUB et alii, 1975; TAS et alii, 1980; FREDERIKS et alii, 1980; NOVELLO, 1983). No entanto, apesar de haver registro na literatura de que ocorre um aumento dos valores "na

phthol yellow S" - proteínas nucleares não-histônicas, após tratamento por TCA (DEITCH, 1955; GAUB et alii, 1975; FREDE-RIKS et alii, 1980; TAS et alii, 1980; MITCHELL et alii, 1981), isto só foi verificado para a região S_3 de pré-pupas. Curiosamente ocorreu o inverso no caso da região S_1 de larvas de 1º estadio e de pré-pupas, região S_2 de 1º e de início de 4º estadio, e região S_2 de pré-pupas excluindo-se os pontos desgarrados que aparecem no diagrama referente ao tratamento por TCA. Nos outros casos não houve efeito significativo, promovido pela remoção de DNA, nos valores "naphthol yellow S" - proteínas nucleares não-histônicas remanescentes após extração com NaCl 3M.

Acredita-se que as regiões para as quais os valores diminuíram contenham proteínas nucleares não-histônicas passíveis de solubilização em TCA a 5%. Sabe-se que muitas proteínas nucleares não-histônicas estão intimamente ligadas ao DNA e consequentemente podem ser extraídas junto com este (COWDEN & CURTIS, 1973). O fato das proteínas HMG, por exemplo, apresentarem como uma de suas características a solubilidade em TCA a 2% (GOODWIN et alii, 1973) favorece a hipótese proposta, embora saiba-se da literatura, que as proteínas HMG sejam extraíveis da cromatina isolada com NaCl 0,035M. No entanto, é possível que parte delas permaneça após NaCl 3M, em se tratando de extrações feitas em núcleos intactos.

Quanto àquelas proteínas que permaneceram nos núcleos após extração por TCA, devem apresentar grande estabilidade físico-química, variando em conteúdo e ocorrência quando se consideram as diferentes regiões e as diferentes fases do desenvolvimento. Diferenças na estabilidade físico-química

dessas proteínas nucleares não-histônicas poderão ser futuramente demonstradas matematicamente pelo cálculo do valor de uma razão, à semelhança da que foi realizada por MELLO & CORDEIRO (1985) para histonas não removíveis por soluções ácidas e salinas. Mesmo sem este cálculo, no entanto, é possível pela simples análise das médias verificar-se que a remoção de proteínas pelo TCA foi variável, conforme se considerem as três regiões e ao longo do desenvolvimento. Dentre as proteínas que permaneceram após extração por TCA, devem encontrar-se principalmente as dos "scaffolds" cromossômicos e as de matriz, em especial da lâmina que sabidamente são muito resistentes às extrações em geral (LEWIS et alii, 1984). Além disso é preciso considerar a natureza dinâmica das proteínas num órgão como a glândula salivar, a qual apresenta grande diversidade fisiológica em suas regiões e também em função do desenvolvimento (SILVA, 1980), o que justificaria a presença de proteínas nucleares não-histônicas em algumas regiões, muito diferentes das encontradas nas outras.

Um outro aspecto a ser considerado é que o aumento de proteínas nucleares não-histônicas, detectadas após tratamento com TCA, ocorreu justamente na região S₃ de pré-pupas, local em que se inicia a histólise (SILVA, 1980) e que certamente está sofrendo alterações em seus complexos nucleoproteicos.

Há ainda a possibilidade de que as variações na quantidade de "naphthol yellow S" captado sejam também influenciadas por mudanças conformacionais nas proteínas, o que permitiria por exemplo maior exposição de sítios de ligação às moléculas de corante, como em S₃ de pré-pupa. Por outro la

do, a remoção de proteínas nucleares ligadas ao DNA, quando se usa TCA, poderia ser facilitada pelo tratamento com NaCl 3M e também em alguns casos pelo processo de fixação em formol. A ação extrativa do formol, ao invés da fixação de certas proteínas nucleares, é conhecida em núcleos de espermatozoides de touro (ALFERT, 1956) e em fibroblastos de camundongo em cultura (GAUB et alii, 1975), principalmente se estiver envolvido tratamento com TCA (ALFERT, 1956).

Deve-se lembrar também que os grupos básicos das histonas são bloqueados não apenas pelo DNA, mas também por proteínas não-histônicas ligadas àqueles componentes (TAS et alii, 1980). Assim, seguindo-se o mesmo raciocínio, a remoção das histonas permitiria também a liberação de grupos básicos das proteínas não-histônicas para se ligarem ao "naphthol yellow S".

No cômputo das proteínas nucleares não-histônicas remanescentes nos núcleos das glândulas salivares de Bradysia spatitergum, após extração com NaCl 3M, deve-se considerar não somente aquelas diretamente ligadas à cromatina e aos "scaffolds" cromossômicos (HADLACZKY et alii, 1981; EARNSHAW & LAEMMLI, 1983), mas também as da matriz nuclear, principalmente as de caráter estrutural, por serem estas da mesma forma muito resistentes à extração por soluções salinas (COMINGS & OKADA, 1976; GRUENBAUM et alii, 1984). Por outro lado, sabe-se que alguns tipos de proteínas nucleares não-histônicas de caráter regulatório poderiam se comportar como residuais frente ao tratamento extrativo (GATES & BEKHOR, 1979).

Portanto, pode-se admitir que dentre as proteínas nucleares não-histônicas analisadas nestre trabalho, não só devem encontrar-se as do tipo estrutural, provavelmente em maior número, mas também proteínas reguladoras de expressão gênica. As variações dos conteúdos, devido à maior ou menor suscetibilidade de extração, sofrem influência dos tipos e quantidades de proteínas presentes, e do tipo de interação com o DNA ou com o complexo DNA-histonas, de acordo com a atividade fisiológica de cada região e em cada fase do desenvolvimento. Relacionado a isto, chamam a atenção, ainda, as variações em conteúdo de proteínas nas amostras.

O presente trabalho teve um caráter exploratório que permitiu vislumbrar a necessidade de informações adicionais a serem obtidas com outra metodologia, possivelmente imunocitoquímica e eletroforese, a fim de se identificar e isolar os tipos de proteínas nucleares não-histônicas por região glandular e época de desenvolvimento do inseto. Este material certamente se prestará a investigações futuras nesse campo.

6. CONCLUSÕES

1. Os métodos cariométricos de determinação de área e volume nuclear não permitiram detectar em glândulas salivares de Bradysia spatitergum indícios de aumentos em proteínas nucleares não-histônicas relacionados a uma intensa atividade transcritora e/ou de síntese proteica.
2. O decréscimo nos valores de áreas e volumes nucleares nas glândulas salivares de pré-pupas possivelmente encontra-se relacionado ao fenômeno de histólise.
3. Há quantidades consideráveis de proteínas nucleares não-histônicas, reativas ao "naphthol yellow S" a pH 2,7 remanescentes após extração de histonas e de alguns tipos de proteínas nucleares não-histônicas, por NaCl 3M, nas três regiões glandulares ao longo do desenvolvimento pós-embriológico. No geral, as proteínas nucleares não-histônicas remanescentes são portadoras de resíduos de lisina e de grupos hidrofóbicos. As variações de conteúdo, nas amostras ou entre elas, devem estar relacionadas aos diferentes tipos e quantidades de proteínas presentes nos núcleos de cada região em cada fase do desenvolvimento. Entre esses tipos se encontram não só proteínas estruturais mas possivelmente proteínas de caráter regulatório.
4. As proteínas nucleares não-histônicas, remanescentes após tratamento com NaCl 3M, comportam-se diferentemente frente ao tratamento extrativo pelo TCA, quando se consideram as diferentes regiões glandulares e a fase do desenvolvimento.

Se se considerar a possibilidade de que proteínas nucleares não-histônicas resistentes à extração com NaCl 3M, porém sensíveis à extração com TCA se tratem de HMG, então estas proteínas aparecem predominantemente em núcleos das regiões S_1 de 1º estadio e de pré-pupas, e S_2 de 1º e de início de 4º estadio. As proteínas que resistem à extração por TCA de vem apresentar grande estabilidade físico-química, incluindo-se entre elas principalmente as dos "scaffolds" cromossômicos e as da matriz nuclear.

7. RESUMO

Núcleos das três regiões das glândulas salivares larvais do sciarideo Bradysia spatitergum, em três fases do desenvolvimento pós-embrionário, foram analisadas por métodos cariométricos e citoquímicos.

Os resultados indicaram que os métodos cariométricos de determinação de áreas e volumes nucleares não permitiram detectar aumentos em proteínas nucleares não-histônicas relacionados à atividade fisiológica característica de cada região glandular, ao longo do desenvolvimento. Por outro lado, houve diminuição nos tamanhos nucleares em pré-pupas, o que provavelmente encontra-se relacionado ao fenômeno de histólise glandular.

Dados obtidos por citofotometria de varredura em preparados corados com "naphthol yellow S" a pH 2,7, indicaram que quantidades consideráveis de proteínas nucleares não-histônicas permanecem após tratamento por NaCl 3M nas três regiões das glândulas, nas três fases do desenvolvimento, proteínas estas portadoras de resíduos de lisina e de grupos hidrofóbicos.

As variações no conteúdo de proteínas nucleares não histônicas remanescentes ao tratamento com NaCl 3M, nas amostras ou entre elas, e o fato de se comportarem diferentemente frente ao tratamento por TCA, devem estar relacionados aos tipos e quantidades de proteínas estruturais e/ou reguladoras presentes nos núcleos, bem como ao tipo de sua interação com o DNA ou com complexos DNA-histonas, de acordo com a atividade fisiológica de cada região, em cada fa

8. ABSTRACT

Nuclei of the three salivary gland regions of the sciariid Bradysia spatitergum, under three phases of the post-embryonary development were analyzed by karyometric and cytochemical methods.

The results indicated that the karyometric methods for determination of the nuclear areas and volumes did not allow the detection of increases in nuclear non-histone proteins in relation to physiological activity of each glandular region during development. On the other hand, there was a decrease in nuclear size in pre-pupal stages, which probably is related to glandular histolytic process.

Data obtained after scanning cytophotometry of preparations stained with naphthol yellow S at pH 2,7, indicated that significant amounts of non-histone nuclear proteins remained in S_1 , S_2 and S_3 glandular regions in the three developmental phases, after 3M NaCl treatment. These proteins contained lysine residues and hydrophobic groups.

The variation of non-histone nuclear protein content which remains after 3M NaCl treatment occurring in or between the samples and the fact that they behaved differently to TCA treatment, must be related to the different types and quantities of structural and/or regulatory proteins present in the nucleus. The type of interaction with the DNA or with DNA-histone complexes, as a function of the physiological activity in each glandular region under different developmental phase may also be involved.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, H.D.; ROHRSCHEIDER, L.R. & EISENMAN, R.N. Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. Cell, 29: 427-39, 1982.
- AGUTTER, P.S. & BIRCHAL, K. Functional differences between mammalian nuclear protein matrices and pore-lamina complex laminae. Expl. Cell Res., 124: 453-60, 1979.
- ALEXANDROVA, E.A., MAREKOV, L.N. & BELTCHEV, B.G. Involvement of protein HMG 1 in DNA replication. FEBS Lett., 178(1): 153-6, 1984.
- ALFAGEME, C.D.R.; RUDKIN, G.T. & COHEN, L.H. Isolation properties and cellular distribution of D1, a chromosomal protein of Drosophila. Chromosoma, 78: 1-31, 1980.
- ALFERT, M. Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon. J. Biophys. biochem. Cytol., 2(2): 109-18, 1956.
- _____ & GESCHWIND, I.I. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 39(10): 991-9, 1953.
- _____; BERN, H.A. & KAHN, K.H. Hormonal influence on nuclear synthesis. IV. Karyometric and microspectrophotometric studies on rat thyroid nuclei in different functional states. Acta anat., 23: 185-205, 1955.

AMABIS, D.C. & SIMÕES, L.C.G. Hormônios e atividade gênica.

In: AMABIS, J.M., MORGANTE, J.S. & SIMÕES, L.C.G. Textos de Genética. Ação gênica, 1: 133-143, 1981.

ASHBURNER, M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of Drosophila melanogaster. Chromosoma, 21: 398-428, 1967.

_____. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila. IV. Variability of puffing patterns. Chromosoma, 27: 156-77, 1969.

_____. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. Adv. Insect Physiol., 7: 1-95, 1970.

_____, CHIHARA, C., MELTZER, P. & RICHARDS, G. The temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., 38: 655-62, 1974.

_____ & RICHARDS, G. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. III. Consequences of ecdysone withdrawal. Devl. Biol., 54: 241-55, 1976.

BARRET, T.; MARYANKA, D.; HAMLYN, P.H. & GOULD, H.J. Nonhistone proteins control gene expression in reconstituted chromatin. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 71(12): 5057-61, 1974.

- BEREZNEY, R. & COFFEY, D.S. Identification of a nuclear protein matrix. Biochem. biophys. Res. Commun., 60(4): 1410-9, 1974.
- _____ & _____. Nuclear matrix: isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. J. Cell Biol., 73: 616-37, 1977.
- BERDYSHEV, G.D. & ZHELABOVSKAYA, S.M. Composition, template properties and thermostability of liver chromatin from rats of various age at deproteinization by NaCl solutions. Exp. Gerontol., 7: 321-30, 1972.
- BICKEL, P.J. & DOKSUM, K.A. Mathematical Statistics. Basic ideas and selected topics. San Francisco, Holden-Day, 1977, 492 p.
- BIDNEY, D.L. & REECK, G.R. Analysis of the effectiveness of sodium chloride in dissociating non-histone chromatin proteins of cultured hepatoma cells. Biochim. biophys. Acta, 521: 753-61, 1978.
- BONNER, J.; DAHMUS, M.E.; FAMBROUGH, D.; HUANG, R.C.; MARUSHIGE, K. & TUAN, D.Y.H. The biology of isolated chromatin. Science, 159: 47-56, 1968.
- BREDDERMAN, P.J. & FOOTE, R.H. Alteration of cell volume in bull spermatozoa by factors known to affect active cation transport. Expl. Cell. Res., 66: 190-6, 1971.

BROCKLEHURST, J.R.; FREEDMAN, R.B.; HANCOCK, D.J. & RADDA, G.K. Membrane studies with polarity-dependent and excimer-forming fluorescent probes. Biochem. J., 116: 721-31, 1970.

BUTLER, A.P.; HARRINGTON, R. & OLINS; D.E. Salt-dependent interconversion of inner histone oligomers. Nucl. Acids Res., 6(4): 1509-20, 1979.

CIEJEK, E.; NORDSTROM, J.; TSAI, J.L. & O'MALLEY, B. Ribonucleic acid precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix. Biochemistry, 21: 4945-53, 1982.

COMINGS, D.E. Compartmentalization of nuclear and chromatin proteins. In: Bush, H., editor. The cell nucleus, IV, Acad. Press, p. 345-71, 1978.

_____ & HARRIS, D.C. Nuclear proteins. II. Similarity of non-histone proteins in nuclear sap and chromatin, and essential absence of contractile proteins from mouse liver nuclei. J. Cell. Biol., 70: 440-52, 1976a.

_____ & _____. Nuclear proteins. I. Eletroforetic comparison of mouse nucleoli, heterochromatin, euchromatin and contractile proteins. Expl. Cell Res., 96: 161-79, 1976b.

_____ & OKADA, T.A. Nuclear proteins. III. The fibrillar nature of the nuclear matrix. Expl. Cell Res., 103: 341-60, 1976.

- COWDEN, R.R. & CURTIS, S. K. Fluorescence studies of chromosomes: quantitative applications of fluorescein mercuric acetate. In: THAER, A. A. & SERNETZ, M., editor. Fluorescence techniques in cell biology. Spring-Verlag, N.Y.. p.135-49, 1973.
- DEITCH, A.D. Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye naphthol yellow S, by tissue sections and by purified proteins. Lab. Invest., 4: 324-51, 1955.
- _____. Cytochemistry of proteins. In. _____. Introduction to quantitative cytochemistry. Acad. Press, N.Y., 1, p. 451-68, 1966.
- DIJKWEL, D.; MULLENDERS, L. & WANKA, F. Analysis of the attachment of replicating DNA to a nuclear matrix in mammalian interphase nuclei. Nucl. Acids Res., 6: 219-30, 1979.
- DONNER, P., GREISER-WILKE, I. & MOELLING, K. Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. Nature, 296: 262-6, 1982.
- DWYER, N. & BLOBEL, G. A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction rat liver nuclei. J. Cell Biol., 70: 581-91, 1976.
- EARNSHAW, W.C. & LAEMMLI, U. Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. J. Cell Biol., 96: 84-93, 1983.

ELGIN, S.C.R. & BONNER, J. Partial fractionation and chemical characterization of the major nonhistone chromosomal proteins. Biochemistry, 11(5): 772-81, 1972.

_____; SERUNIAN, L.A. & SILVER, L.M. Distribution patterns of Drosophila nonhistone chromosomal proteins. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., 42(2): 839-50, 1977.

_____ & WEINTRAUB, H. Chromosomal proteins and chromatin structure. A. Rev. Biochem., 44: 725-74, 1975.

ELY, S.; D'ARCY, A. & JOST, E. Interaction of antibodies against nuclear envelope - associated proteins from rat liver nuclei with rodent and human cells. Expl. Cell Res., 116: 325-31, 1978.

EZRAILSON, E.G., OLSON, M.O.J., GUETZOW, K.A. & BUSH, H. Phosphorilation of non-histone chromatin proteins in normal and regenerating rat liver, Novikoff hepatoma an rat heart. FEBS Lett., 62(1): 69-73, 1976.

FREDERIKS, W.M., SLOB, A. & SCHRÖDER, H. Histochemical determination of histone and non-histone protein content in rat liver nuclei. Histochemistry, 68: 49-53, 1980.

GATES, D.M. & BEKHOR, I. DNA sequence selection by tightlybound non-histone chromosomal proteins. Nucl. Acids Res., 6(4): 1617-30, 1979.

GAUB, J. Feulgen-naphthol yellow S cytophotometry of liver cells. The effect of formaldehyde induced shrinkage on nuclear naphthol yellow S binding. Histochemistry, 49: 293-301, 1976a.

_____. Diurnal variations in indogenous RNA polimerase activity and amounts of nuclear non-histone protein, DNA and cytoplasmic protein in rat liver. Histochemistry, 49: 113-21, 1976b.

_____. Cytophotometric determination of nuclear non-histone protein in the pre-replicative phase of rat liver regeneration. Expl. Cell Res., 114: 167-74, 1978.

_____; AUER, G. & ZETTERBERG, A. Quantitative cytochemical aspects of a combined Feulgen-Naphthol Yellow S staining procedure for the simultaneous determination of nuclear and cytoplasmic proteins and DNA in mammalian cells. Expl. Cell Res., 92: 323-32, 1975.

GAUDECKER, B. von & SCHMALE, E.M. Substrate-histochemical investigations and ultrahistochemical demonstrations of acid phosphatase in larval and prepupal salivary glands of Drosophila melanogaster. Cell Tissue Res., 155: 75-89, 1974.

GELFANT, S. & CLEMMONS, J.J. The influence of strogen on nuclear volumes and chemical composition. J. Cell. Comp. Physiol., 46: 529-40, 1955.

GERACE, L & BLOBEL, G. Nuclear lamina and the structural organization of the nuclear envelope. Cold. Spring. Harb. Symp. quant. Biol., 46: 967-78, 1981.

_____; BLUM, A. & BLOBEL, G. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. J. Cell Biol., 79: 546-66, 1978.

_____; COMEAU, C. & BENSON, M. Organization on modulation of nuclear lamina structure. J. Cell Sci. (suppl.), 1: 137-60, 1984.

GILMOUR, R.S. & PAUL, J. Tissue-specific transcription of the globin gene in isolated chromatin. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 70(12): 3440-2, 1973.

GIORGIO, S., RECCO-PIMENTEL, S.M.; MELLO, M.L.S. & AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Dados citoenzimológicos preliminares para as glândulas salivares de Bradysia spatitergum. Resumos do VIII Simpósio Anual da ACIESP, São Paulo, SP, p. 22, 1983.

GOODWIN, G.H. The presence of high mobility group non-histone chromatin proteins in isolated nucleosomes. FEBS Lett., 73(1): 85-8, 1977.

_____; SANDERS, C.S. & JOHNS, E.W. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic aminoacids. Eur. J. Biochem., 38: 14-9, 1973.

- GOSLINE, J.M.; YEW, F.F. & WEIS-FOGH, T. Reversible structural changes in a hydrofobic protein, elastin, as indicated by fluorescence probe analysis. Biopolymers, 14: 1811-26, 1975.
- GRUENBAUM, Y.; HOCHSTRASSER, M.; MATHOG, D.; SAUMWEBER, H.; AGARD, D.A. & SEDAT, J.W. Spatial organization of the Drosophila nucleus: a three-dimensional cytogenetic study. J. Cell Sci., Suppl., 1: 223-34, 1984.
- HADLACZKY, G.; SUMNER, A.T. & KOSS, A. Protein depleted chromosomes..II. Experiments concerning the reality of chromosome scaffolds. Chromosoma, 81: 557-67, 1981.
- HANCOCK, R. & BOULIKAS, T. Functional organization in the nucleus. Int. Rev. Cytol., 79: 165-214, 1982.
- HARDY, D.E. New hawaiian sciaridae (Diptera). Proc. Hawaiian Entomol. Soc., 16(1): 72-90, 1956.
- HARROD, M.J.E. & KASTRITSIS, C.D. Developmental studies in Drosophila. II. Ultrastructural analysis of the salivary glands of Drosophila pseudoobscura during some stages of developmental. J. Ultrastruct. Res., 38: 482-99, 1972.
- HILL, R.J.; MAUNDRELL, K. & CALLAN, H.G. Non-histone proteins of the oocyte nucleus of the newt. J. Cell Sci., 15: 145-61, 1974.
- JACKSON, D.A.; MCCREADY, S.J. & COOK, P.K. RNA is synthesized at the nuclear cage. Nature, 292: 552-5, 1981.
- JOHNSON, J.D.; DOUVAS, A.S. & BONNER, J. Chromosomal proteins. Int. Rev. Cytol. (suppl.), 4: 273-361, 1974.

JURAND, A. & PAVAN, C. Ultrastructural aspects of hystolytic process in the salivary gland cells during metamorphic stages in Rhynchosciara hollaenderi (Diptera, Sciaridae). Cell Differ., 4: 219-36, 1975.

KAUFMAN, S.H.; COFFEY, D.S. & SHAPER, J.H. Consideration in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear-envelope, and pore complex lamina. Expl. Cell Res., 132: 105-23, 1981.

KLEINSMITH, L.S. & STEIN, G.S. Activation of histone gene transcription by non-histone chromosomal phosphoproteins. Science, 194(4263): 428-31, 1976.

KLOETZEL, J.A. & LAUFER, H. A fine-structural analysis of larval salivary gland function in Chironomus thummi (Diptera). J. Ultrastruc. Res., 29: 15-36, 1969.

_____ & _____. Developmental changes in fine structure associated with secretion in larval salivary glands of Chironomus. Expl. Cell Res., 60: 327-37, 1970.

KROHNE, G.; DEBAUVALLE, M. & FRANKE, W. Cell type-specific differences in protein composition of nuclear pore complex-lamina in oocytes and erythrocytes of Xenopus laevis. J. molec. Biol., 151: 121-41, 1981.

_____; _____ & SCHEER, U. The major polypeptides of the nuclear pore complex. Expl. Cell Res., 116: 85-102, 1978a.

_____; _____; ELY, S. & D'ARC, A. JOST, E. Localization of a nuclear envelope associated protein by indirect immunofluorescence microscopy using antibodies against a

- major polypeptide from rat liver fractions enriched in nuclear envelope-associated material. Cytobiologie, 18: 22-38, 1978b.
- LAND, H.; PARADA, L.F. & WEINBERG, R.A. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science, 222: 771-8, 1983.
- LANE, N.J.; CARTER, Y.R. & ASHBURNER, M. Puff and salivary gland function: the fine structure of the larval and prepupal salivary glands of Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux. Arch. Entw. Mech. Org., 169: 216-38, 1972.
- LAUFER, H.; NAKASE, Y. & WANDERBERG, U. Development studies on the dipteran salivary gland. DNase activity in Chironomus thumi. J. Cell Biol., 25: 97-102, 1965.
- LEWIS, C.D. & LAEMMLI, U. Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. Cell, 29: 171-81, 1982.
- _____, LEBROWSKI, J.S.; DALY, A.K. & LAEMMLI, U.K. Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures. J. Cell Sci., (suppl), 1: 103-22, 1984.
- LONG, B.H. & OCHS, R.L. Nuclear matrix, hnRNA, and sn RNA in friend erythroleukemia nuclei depleted chromatin by low ionic strength EDTA. Biol. Cell, 48: 89-98, 1983.
- MACGREGOR, H.C. & MACKIE, J.B. Fine structure of the cytoplasm in salivary glands of Simulium. J. Cell Sci., 2: 137-44, 1967.
- MARTINEZ-SALES, V. & BAGUENA, J. Changes in non-histone proteins during mouse liver regeneration. Cell Mol. Biol., 27(2/3): 223-49, 1981.

MELLO, M.L.S. & CORDEIRO, J.A. Changes in fast green-histone amounts with NaCl and HCl treatments in the salivary glands of Bradysia spatitergum. Cell Mol. Biol., 31(1): 17-25, 1985.

_____ & RAYMUNDO, H.H. Nuclear fusion in the malpighian tubes of a blood-sucking hemipteran. Cytologia, 45: 203-9, 1980.

_____ & RUSSO, J. Nuclear changes induced in NIH/3T3 cells by transfection and tumorigenesis. Subm. ã public., 1986.

_____ & VIDAL, B.C. Noções fundamentais de cariometria. In: _____. Práticas de Biologia Celular, Edit. Edgard Blücher/FUNCAMP, São Paulo, p. 35-36, 1980.

_____ & ZANARDI, V.A. Variation of the nuclear areas of bull spermatozoa subjected to Feulgen's reaction. The nucleus, 19: 1-4, 1976a.

_____ & _____. Dados cariométricos em espermatozóides de touro: influência de diferentes fixadores e tempos de hidrólise. Cienc. Cult., 28(5): 551-4, 1976b.

MITCHELL, J.P., VAN DER PLOEG, M. & VAN DUIJN, P. Combined staining procedures for cytophotometry of protein and DNA: Feulgen-Naphthol Yellow S and Dinitrofluorobenzene-Feulgen. J. Histochem. Cytochem., 73: 211-23, 1981.

MOORE, B.R. & FREE, S.J. Protein modification and its biological role. Int. J. Biochem., 17(3): 283-9, 1985.

- MORALES, M.M.; BLAT, C. & HAREL, L. Changes in the phosphorylation of non-histone chromosomal proteins in relationship to DNA and RNA synthesis in BHK₂₁C₁₃ cells. Expl. Cell Res., 86: 111-9, 1974.
- NOVELLO, A.F. Nuclear residual material resembling the nuclear protein matrix in cytological preparations. Cell Mol. Biol., 29(6): 497-500, 1983.
- PALKOVITS, M. & FISCHER, J. Karyometric investigations. Budapest: Akad. Kiadó, 1968.
- PARK, W.; JANSING, R.; STEIN, J. & STEIN, G. Activation of histone gene transcription in quiescent WI-38 cells or mouse liver by a non-histone chromosomal protein fraction from HeLa S₃ cells. Biochemistry, 16(16): 3713-21, 1977.
- PAUL, J.; GILMOUR, R.S.; AFFARA, H.; BIRNIE, G.; HARRISON, P.; HELL, A.; HUMPHRIES, S.; WINDARS, J. & YOUNG, B. The globin gene: structure and expression. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., 38: 885-90, 1974.
- PAULSON, J.R. & LAEMMLI, U.K. The structure of histone-depleted chromosomes. Cell, 12: 817-28, 1977.
- PETERSON, J.L. & McCONKEY, E.H. Non-histone chromosomal proteins from HeLa cells. A survey by high resolution, two-dimensional electroforesis. J. Biol. Chem., 251(2): 548-54, 1976.

- PIENTA, K.Y. & COFFEY, D.S. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. J. Cell Sci., (suppl.), 1: 123-35, 1984.
- PORCELLT, F. Recherche sui limiti di quantitatività della reazione di Feulgen. IV. Massa secca e intensità di risposta alla reazione del materiale nucleare su strisci variamente fissati. Ann. Histochem., 18: 77-86, 1972.
- RANEK, L. Cytophotometric studies of the DNA, nucleic acid and protein content of human liver cell nuclei. Acta Cytol., 20: 151-7, 1976.
- RENSING, L. & HARDELAND, R. Effects of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate on membrane potential, nuclear volume, and puff size in Drosophila salivary gland in vitro. Expl. Cell Res., 73: 311-8, 1972.
- ROBINSON, S.I., NELKIN, B.D. & VOLGELSTEIN, B. The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells. Cell, 28: 99-106, 1982.
- ROSSELET, A. & RUCH, F. Cytofluorometric determination of lysine with dansyl-chloride. J. Histochem. Cytochem., 16: 459-66, 1968.
- SCHREIBER, G. A multiplicação independente de alguns constituintes nucleares. Ulteriores aspectos do problema. Cienc. Cult., 16(2): 249-51, 1964.

_____, AMORIN, F.M.O.; CAVENAGHI, T.M.; FALLIERI, A.; GERKEN, S.E.; MELUCCI, N.; SANT'ANA, Y.X. & SCHREIBER, M.R.
Significance of the ratio "DNA/nuclear size" in the differentiation of tissues. Genetics (suppl.), 61(1): 161-70, 1969.

SEVALJEVIĆ, L.; PETROVIĆ, M.; POZNANOVIĆ, G. & KONSTANTINOVIĆ, M.
On the similarity between the nuclear network and chromatin non-histone proteins of sea urchin embryos.
Cell Mol. Biol., 27(2/3): 147-57, 1981.

SILVA, M.J.L. Estudo citoquímico e citofísico do desenvolvimento pós-embrionário das glândulas salivares de Bradysia spatitergum (Hardy, 1956). Tese de Mestrado, IB, UNICAMP, Campinas, 82p, 1977.

_____. Estudo morfológico e citoquímico das glândulas salivares de Bradysia spatitergum (Hardy)(Diptera, Sciaridae)
Revta. bras. Biol., 40: 447-61, 1980.

_____. Feulge-DNA duplication degrees in the salivary glands of Bradysia spatitergum (Diptera, Sciaridae).
Cytologia, 46: 225-32, 1981.

SIMÕES, L.C.G.; MARTHO, G.R. & BONI, J.A. Morphological changes in polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae during prepupal and pupal stages. Cienc. Cult., 28(11): 1344-8, 1976.

- SHELTON, K.; HIGGINS, L.; COCHRAN, D.; RUFFOLO, D. & EGLE, P.
Nuclear lamins of erythrocyte and liver. J. biol. Chem.,
255: 10978-83, 1980.
- SMART, J.E. Ph.D. Thesis, California Inst. of Technol.,
Pasadena, California, 1974. Apud, Johnson, J.D. et alii.
Chromosomal proteins. Int. Rev. Cytol., Suppl. 4: 273-61,
1974.
- SMERDON, M.J. & ISENBERG, I. Interactions between the
subfractions of calf thymus H₁ and non-histone chromosomal
proteins HMG 1 and HMG 2. Biochemistry, 15(19): 4242-7,
1976.
- SMITH, J.A. & STOCKEN, L.A. The characterization of the non-
histone protein isolated from histone F₁ preparations.
Biochem. J., 131(4): 859-61, 1973.
- SPELSBERG, T.C.; STEGGLES, A.W.; CHYTIL, F. & O'MALLEY, B.W.
Progesterone-binding components of chick oviduct.
V. Exchange of progesterone-binding capacity from target
to nontarget tissue chromatin. J. biol. Chem., 247(5):
1368-74, 1972.
- STEFFAN, W.A. Redescription of Bradysia spatitergum (Hardy)
and new records from Panamá and Brazil (Diptera:Sciaridae).
Pacific Insects, 10(3/4): 515-9, 1968.
- STEIN, G.S.; SPELSBERG, T.C. & KLEINSMITH, L.J. Non-histone
chromosomal proteins and gene regulation. Non-histone
chromosomal proteins may participate in the specific
regulation of gene transcription in eucaryotes. Science,
183: 817-24, 1974.

- _____ ; PARK, W.; THRALL, C.; MANS, R. & STEIN, S.
Regulation of cell cycle stage-specific transcription of histone genes from chromatin by non-histone chromosomal proteins. Nature, 257: 764-7, 1975.
- STICK, R. & HAUSEN, D. Immunological analysis of nuclear lamina proteins. Chromosoma, 80: 219-36, 1980.
- _____ & KROHNE, G. Immunological localization of the major architectural protein associated with the nuclear envelope of the Xenopus laevis oocyte. Expl. Cell Res., 138(2): 319-30, 1982.
- STRYER, L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non polar binding sites. J. Mol. Biol., 13: 482-95, 1965.
- SWIFT, H. Nuclear physiology and differentiation: a general summary. Genetics (suppl.), 61(1): 442-61, 1969.
- TAS, J.; van der PLOEG, M.; MITCHELL, J.P. & COHN, N.S.
Protein staining methods in quantitative cytochemistry. J. Microsc., 119: 295-311, 1980.
- TSAI, S.Y.; TSAI, M-J.; HARRIS, S.E. & O'MALLEY, B.W.
Effects of estrogen on gene expression in the chick oviduct. Control of ovalbumin gene expression by non-histone proteins. J. Biol. Chem., 251(20): 6475-8 , 1976.

- TUKEY, J.W. Exploratory data analysis. Reading, Addison-Weslwy, 1977, 507p.
- VIDAL, B.C. The use of the fluorescent probe 8-anilino-naphthalene sulfate (ANS) for collagen and elastin histochemistry. J. Histochem. Cytochem., 26(3): 196-201, 1978.
- _____. Aorta elasticae and tendon collagen reactivity to 8-anilino-1-naphthalene sulphate (ANS) and dansylchloride. Cell Mol. Biol., 26: 538-8, 1980.
- _____. Variation in dry mass concentrations and proteins contents in DNA puffs. Caryologia, 30(1): 69-76, 1977.
- VOGELSTEIN, B.; COSSEY, D.S. & PARDOLL, D.M. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. Cell, 22: 79-85, 1980.
- ZWEIDLER, A. & COHEN, L.H. Large scale isolation and fractionation of organs of Drosophila melanogaster larvae. J. Cell Biol., 51: 240-8, 1971.