

EFEITO DO 2,3 DIHIDRO-1H IMIDAZO (1,2-b) PIRAZOL (IMPY)

SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS PUFES DE DNA DE

BRADYSIA HYGIDA

Wilker Ramos Ribeiro

Dissertação apresentada ao Departamento de Morfologia da Faculda de de Medicina de Ribeirão Preto para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Ribeirão Preto

1 9 7 5

Este trabalho é dedicado:

- a meus Pais

a quem devo minha vida

- a Irací, minha esposa

pelo apoio, compreensão e inexaurível paciência

- a meus filhos

Ana Paula

Wilker

Elisangela

## A g r a d e c i m e n t o s

- Ao Prof.Dr. Heni Sauaia,

por sua orientação e profundo amor  
ao trabalho.

- A Luís Alberto

por sua dedicação na cultura de  
larvas de Bradysia hygida.

## Í N D I C E

INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	6
1. Material biológico .....	6
2. Drogas .....	10
2.1. 2,3 di-hidro-1H-imidazo (1,2-b) pirazol (IMPY) .....	10
2.2. Hidroxiuréia (HU) .....	10
2.3. Precursores radioativos .....	10
3. Injeção nas larvas .....	11
4. Processamento citológico .....	12
4.1. Remoção das glândulas .....	12
4.2. Fixação e esmagamento .....	12
4.3. Preparação permanente .....	13
5. Critérios para a avaliação do grau de inibição .	14
6. Radiometria .....	15
6.1. Lavagem dos frascos de cintilação .....	16
7. Microscopia e Fotomicrografia .....	16
RESULTADOS .....	17
1. Efeito do IMPY sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA .....	17
2. Efeito do IMPY sobre a incorporação total de ti- midina, de uridina e de leucina .....	26
2.1. Efeito sobre a incorporação de timidina .	26
2.2. Efeito sobre a incorporação de uridina ..	29
2.3. Efeito sobre a incorporação de leucina ..	31
DISCUSSÃO	
1. Efeito do IMPY a longa prazo, sobre o desenvolvi- mento dos pufes de DNA .....	34
2. Efeito do IMPY a curto prazo sobre pufes de DNA.	37
3. Efeito do IMPY sobre o desenvolvimento dos pufes de RNA .....	39
4. Efeito do IMPY sobre os órgãos do adulto .....	39
5. Efeito do IMPY e da HU sobre a síntese global de DNA, RNA e de proteínas .....	40

SUMÁRIO .....	43
SUMMARY .....	45
CONCLUSÕES .....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
APÊNDICE .....	58

\* \* \*

## I N T R O D U Ç Ã O

Os pufes cromossômicos são modificações estruturais localizadas, que ocorrem em cromossomos politênicos. A expansão dos pufes não ocorre ao acaso. Obedece sempre a uma certa sequência, que é característica de espécie, tecido e estágio de desenvolvimento (POULSON e METZ, 1938; BEERMANN, 1952; PAVAN e BREUER, 1952; BREUER e PAVAN, 1955; PAVAN e DA CUNHA, 1969a; ASHBURNER, 1970 e ASHBURNER, 1972). Há indicação muito clara de que os pufes estejam sob controle hormonal (CLEVER e KARLSON, 1960; CLEVER, 1961; BECKER, 1962; BERENDES, 1967; CROUSE, 1968; AMABIS e CABRAL, 1970; AMABIS e SIMÕES, 1971; AMABIS, 1974; STOCKER e PAVAN, 1974).

São distinguíveis dois tipos de pufes: pufes de RNA de ocorrência geral e pufes de DNA, característicos dos sciarídeos. Os pufes de DNA são acompanhados de síntese desproporcionada de DNA e aparecem no quarto estágio larval, no período pré-pupal (POULSON e METZ, 1938; BREUER e PAVAN, 1955; FICQ e PAVAN, 1957; GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964; PAVAN e DA CUNHA, 1969a; ASHBURNER, 1970; SAUAIA, 1971; MENEHINI, ARMELIN, BALSAMO e LARA, 1971). Apresentam elevada atividade de incorporação de uridina (GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1968; PAVAN e DA CUNHA, 1969a; ALMEIDA E SAUAIA, comunicação pessoal) e, após sua regressão, a região cromossômica correspondente exibe compactação cromatínica distinguível do resto do cromossoma (BREUER e PAVAN, 1955; GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964; RUDKIN e CORLETTE, 1957; RASCH e RASCH, 1967; CROUSE e KEYL, 1968; SAUAIA, 1971; SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971). O conteúdo de DNA aí sintetizado durante a pução não deve exceder 10 a 12% do total de DNA do núcleo em Sciara coprophila (RASCH,

1970); em B. hygida, determinações bioquímicas tendem a concordar com essa afirmativa (PAÇÓ-LARSON, comunicação pessoal). Este DNA parece ser estável nestes sítios cromossômicos (RASCH e PETIT, 1967; RASCH e RASCH, 1967; CROUSE, 1968) embora haja em certos casos, emissão de DNA de cromossomos politênicos (WHITTEN, 1965; PAVAN e DA CUNHA, 1969a, 1969b; DA CUNHA, PAVAN, MORGANTE e GARRIDO, 1969). O método de hibridização "in situ" mostrou que o DNA desses pufes não contém quantidades detectáveis de cistrons para RNA ribossômico (PARDUE, GERBI, EGKhardt e GALL, 1970; GERBI, 1971). A mesma afirmativa é válida para os anéis de Balbiani em quironomídeos (LAMBERT, WIESLANDER, DANHOLT, EÇYHAZ e RINGBORG, 1972; LAMBERT, 1973).

A hipótese de que os pufes sejam manifestações de atividade gênica (BEERMANN, 1952; BREUER e PAVAN, 1952) é reforçada por diversas investigações: 1) estudos autorradiográficos indicam os pufes como locais de intensa síntese de RNA (PELLING, 1959, 1964; GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964, 1968); 2) análise química e hibridização molecular "in situ" sugerem que pelo menos uma parte do RNA produzido nos pufes seja RNA mensageiro (EDSTROM e BEERMANN, 1962; STEVENS e SWIFT, 1966; LAMBERT, 1973; 3) os estudos com híbridos de Chironomus tentans e Chironomus pallidivittatus indicam que produtos específicos produzidos na glândula salivar de C. pallidivittatus estariam sob o controle de um ou alguns pufes peculiares a essa espécie, (BEERMANN, 1961; GROSSBACH, 1969); 4) estudo eletroforético das proteínas da glândula salivar de Drosophila melanogaster, associado à indução de pufes por choque de temperatura, relaciona a produção de algumas das subunidades de proteínas com certos pufes específicos (TISSIERES, MITCHELL e TRACY, 1974).

É importante que se desenvolva meios reprodutíveis e compreenda o mecanismo com que atuam esses meios, para controle experimental das atividades de certos gens ou até mesmo de gens específicos, localizados em sítios cromossômicos que exibem pufes. O progresso dessa instrumentação de controle da expansão e regressão de pufes cromossômicos pode nos aproximar da realidade de suas funções e significado.

São vários os sistemas empregados para induzir pufes: choque de temperatura, injeção de ecdisona e substâncias análogas, transplante de glândula salivar (ASHBURNER, 1970; BERENDES, 1972, 1973; AMABIS, 1974; STOCKER e PAVAN, 1974). Em sciarídeos, os pufes de DNA são também indutíveis pela injeção de ecdisona e seus análogos (CROUSE, 1968; GABRUSEWYCZ-GARCIA e MARGLES, 1969; STOCKER e PAVAN, 1974). Recentemente, GRAESSMANN, GRAESSMANN e LARA (1974) induziram pufes de DNA em Rhynchosciara angelae, com RNA extraído de células de glândula salivar de larvas na idade de máxima expansão dos pufes de DNA. Esse RNA injetado no citoplasma de células da glândula salivar de larvas mais jovens induziu a formação de pufes de DNA, que normalmente não ocorre nessa idade.

A possibilidade de suprimir o desenvolvimento dos pufes de DNA pelo fornecimento de cortisona ao alimento das larvas, sem prejudicar a síntese global de DNA e o desenvolvimento normal da larva (GOODMANN, GOILD e RICHART, 1967) não foi confirmada (CROUSE, 1968; RASCH e LEWIS, 1968). A introdução da hidroxuréia (HU) por SAUAIA, LAICINE e ALVES (1971), para o controle experimental seletivo dos pufes de DNA, adicionou novo instrumento para a investigação do significado desses pufes. A HU, cuja ação é conhecida em outros sistemas (YOUNG e HODAS, 1964; GALE,



1964; ROSENKRANZ e LEVY, 1965), inibe fortemente o desenvolvimento dos pufes de DNA de B. hygida. Administrada durante um tempo crítico do quarto estágio larval, impede o aparecimento dos pufes de DNA sem parecer prejudicar o programa normal dos pufes de RNA e sem impedir a metamorfose.

É indispensável que esses estudos não dependam de um só inibidor. Um agente químico é sempre suspeito de efeitos colaterais àquele para o qual é utilizado. Se agentes químicos têm de ser usados, é importante contar com vários deles, capazes de produzir o mesmo efeito desejado.

O objetivo da presente dissertação é estudar o efeito do 2,3 dihidro-1-H-imidazo (1,2-b) pirazol (IMPY), (Fig. 1) sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA de B. hygida.

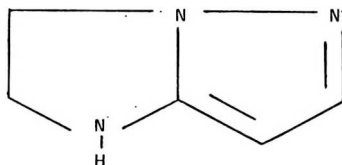


Fig. 1 - Estrutura do 2,3 dihidro-1-H-imidazo (1,2-b) pirazol (IMPY).

Sua ação sobre a síntese de DNA, de RNA e de proteínas foi estudada por ENNIS, MOLLER, WANG e SELAWRY, (1971) em células L de ratos, células HeLa cultivadas "in vitro" e células de tumor ascítico cultivadas em ratos. A incorporação de timidina, uridina e leucina marcadas, medida por radiometria, mostrou que o IMPY inibe somente a síntese de DNA e não interfere com a de RNA e de proteínas. Em procariontes (Escherichia coli e Bacillus subtilis), entretanto, a ação inibidora não ultrapassou a 20%.

Além disso, o IMPY parece oferecer a possibilidade de ter sua ação revertida pela administração de uma única droga, a desoxiguanosina, ou reforçada também pela associação a uma única droga, a desoxicitidina (ENNIS, MOLLER, WANG e SELAWRY, 1971). Em cultura de células HeLa, o IMPY foi utilizado como excelente sin cronizador do ciclo celular (BEER, KAJIWARA e MUELLER, 1974).

O presente trabalho, em B. hyqida, demonstra que o IMPY administrado em um tempo crítico do quarto estágio larval, a exemplo da HU, (SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971), inibe fortemente os pufes de DNA sem parecer perturbar o programa de formação dos pufes de RNA. Demonstra também, através de radiometria por cinti lação em líquido, que o IMPY e a HU deprimem a incorporação de timidina a menos de 5%, afetam moderadamente a incorporação de uridina e, possivelmente não afetam a incorporação de leucina. As imagos, oriundas de larvas tratadas com o IMPY durante o tempo crítico apresentam diversas anomalias semelhantes à produzidas por HU (SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971).

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Material biológico:

O ciclo de B. hygida dura cerca de 36 dias a 20°C. As larvas nascem no 5º dia depois da postura e passam por 3 mudas antes de atingirem o 4º estágio, que começa no 12º dia. O tamanho máximo das larvas é de 10 a 12 mm de comprimento por 1 mm de diâmetro. As manchas oculares (Fig. 2A) aparecem no dorso, logo atrás da capsula da cabeça no 6º ou 7º dia do 4º estágio. Estas manchas, que são os primórdios dos olhos do adulto, prestam-se para a determinação aproximada da idade larval em sciarídeos (GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964). Foram nomeadas m1, m2, m3, ... m8 segundo o aspecto que tomam durante o desenvolvimento (SAUAIA, 1971). De m1 a m3 passam cerca de 2 dias e a larva m3 leva de 16 a 24 horas para atingir o padrão m7. De m7 à muda pré-pupal vão aproximadamente 22 a 26 horas (Tabela I).

A larva possui um par de glândulas salivares, constituídas de cerca de 200 células; há mais de 6 tipos celulares, que formam diferentes regiões linearmente dispostas (Fig. 2B). A região anterior (S1) é formada de cerca de 40 células dispostas em duas fileiras opostas em torno do ducto. Para o estudo morfológico utilizou-se apenas esta região.

Os cromossomas politênicos de B. hygida, em número de quatro, são nomeados A, B, C e X. Na figura 3, estão assinalados os segmentos em que foi arbitrariamente dividida a imagem do cromossoma para fins de mapeamento (SAUAIA, 1971), bem como as regiões cromossômicas englobadas pelos principais pufes de DNA no máximo de expansão. Os pufes cromossômicos são aqui nomeados se-

gundo o segmento cromossômico em que ocorrem.

Os primórdios dos grandes pufes de DNA começam a aparecer em m3-m4. Os pufes C4, C5 e C7 abrem-se plenamente em m7, o pufe B10 aparece quando estes últimos começam a regridir, finalmente, os pufes A1, A14, B3, C6 e X4 aparecem 8 a 15 horas depois de m7. O período de 18 a 22 horas antes de m7, compreendido na idade m3, foi chamado "tempo crítico", porque neste tempo a injeção de hidroxauréia (HU) nas larvas tem efeito inibidor máximo sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA (SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971).

#### TABELA I

Duração aproximada dos padrões de manchas oculares durante o período do quarto estágio larvar de E. hygida. (SAUAIA, 1971).

Padrão de manchas oculares	Idade da larva; duração em horas.
m3-m4	24 a 16 horas antes de m7
m5	8 a 5 horas antes de m7
m6	1 hora antes de m7
m7	26 a 22 horas antes da muda pré-pupal
m7 <sup>+</sup>	2 horas após o início de m7
m8 I*	2 a 4 horas após o início de m7
m8 II	4 a 8 horas após m7
m8 III	8 a 12 horas após m7
m8 IV	12 a 15 horas após m7

\* A partir de m8 I, usam-se para determinação aproximada da idade, características morfológicas dos cromossomas politênicos observados em esmagamento.

FIGURA 2

A - Padrão de manchas oculares em diferentes fases do desenvolvimento larval. X20 (Fotomicrografia gentilmente cedida por H.Sauaia).

B - Par de glândulas salivares de larva fêmea na idade correspondente ao padrão m3 de manchas oculares:

D - ducto

1 - ístmo

2 - região S1 (região anterior ou proximal)

3 - colo

4 - região S2 (região granulosa)

5 e 6 - região S3 (respectivamente região pós granulosa e mucosa)

Fig 2

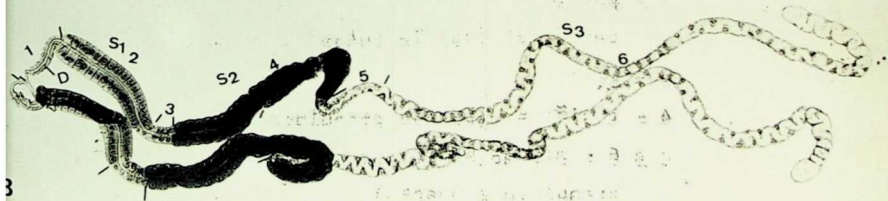
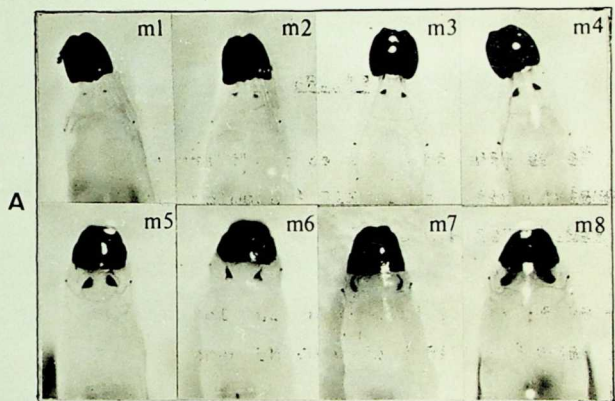
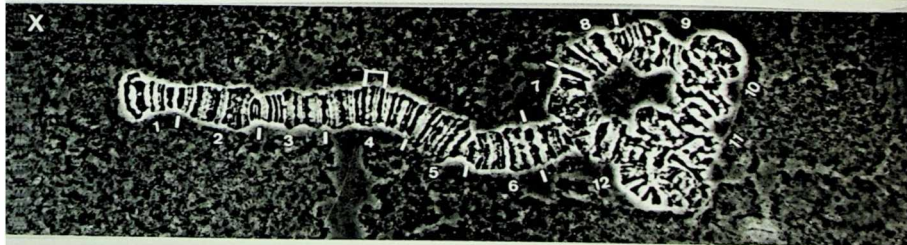
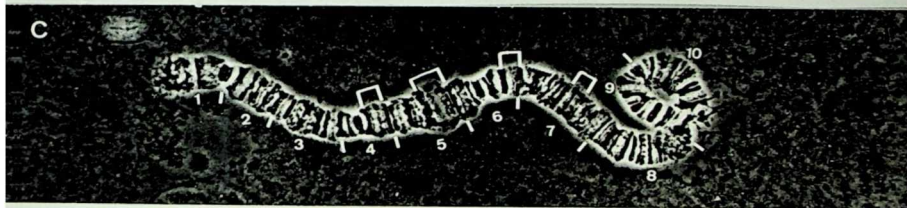
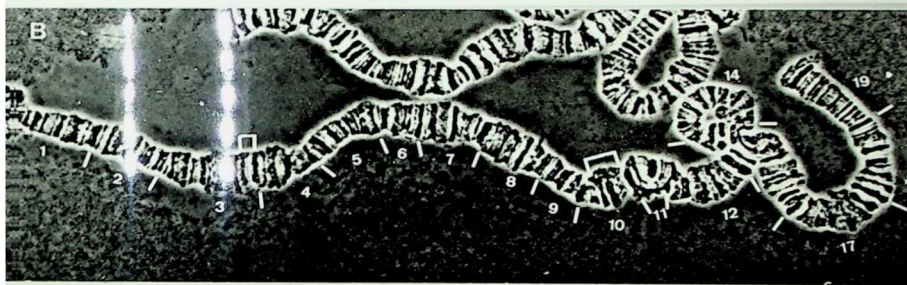
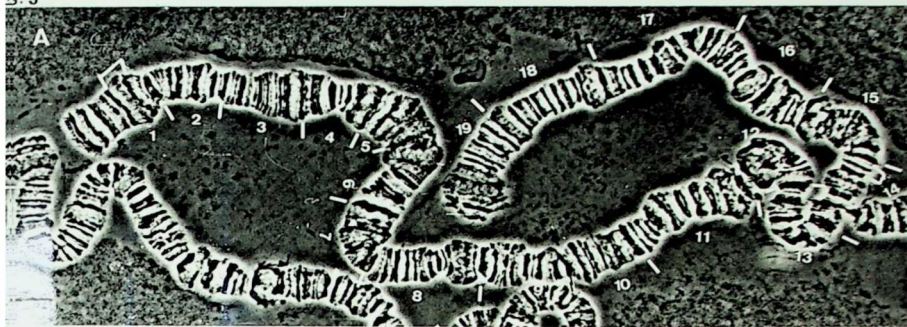


FIGURA 3

Cromossomas politênicos de larvas com padrão m3 de manchas oculares. Os colchetes delimitam as regiões englobadas pelos pufes de DNA no máximo de expansão. X700.

Fotomicrografias feitas com objetiva planapocromática 40x, de imersão. (Gentilmente cedidas por M. A.R.Alves).





## 2. Drogas

### 2.1. - 2,3 di-hidro-1H-imidazo (1,2-b) pirazol (IMPY)

Utilizou-se a droga em solução aquosa. Para a escolha da concentração foram injetados vários grupos de larvas (20 larvas para cada grupo) na idade m3, 1 microlitro de solução com concentrações diferentes, tendo-se um mesmo número de larvas, recebido injeção de 1 microlitro de água como controle. A solução 0,3M resultou uma sobrevivência de 80% das larvas.

A solução é incolor, mas a permanência por 30 dias na geladeira resulta em ligeiro amarelamento. Não se conhece muito sobre o comportamento químico dessa droga. Procurou-se fazer sempre volumes pequenos, não mais que 1 ml e não utilizar solução com mais de 10 dias de estocagem.

As amostras do composto (CIBA 21,381-Ba) foram gentilmente cedidas pela Ciba-Geigy de Basileia, Suíça.

### 2.2. - Hidroxiuréia (HU)

A concentração da solução utilizada foi de 0,2M (SAUAIÁ, LAICINE E ALVES, 1971).

### 2.3. - Precursos radioativos (The Radiochemical Center Amers- ham England)

Timidina-metil- $H^3$  (Thd- $H^3$ ), 17,4 Ci/mmol, 1mCi/ml.

Uridina-5- $H^3$  (Urd- $H^3$ ) 20,1 Ci/mmol, 1mCi/ml, diluída com água destilada (1:3).

Leucina-4,5-H<sup>3</sup> (leu-H<sup>3</sup>) · 46 Ci/mmol, 1mCi/ml, diluída com água destilada (1:6).

3. Injeção nas larvas (SAUAIA, 1971; SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971).

Foi feita utilizando-se de uma agulha de vidro com ponta de diâmetro externo menor que 30 micra, conectada a um tubo de polietileno que na outra extremidade recebe uma agulha hipodérmica ajustada a uma microseringa de 50 ou 100 microlitros. O êmbolo é empurrado com um micrômetro montado em um suporte especial, o que permite o controle da quantidade de solução injetada. Uma volta do tambor do micrômetro dá um passo de 0,5 mm, o que corresponde a ejeção de aproximadamente 1 microlitro com a seringa de 100 microlitros.

A larva é depositada sobre um papel de filtro umedecido com água colocado no estereomicroscópio. A agulha é introduzida não mais que 2 milímetros na larva, entre o 10º ou 11º anel da região posterior. Uma vez girado o tambor do micrômetro, espera-se 1 minuto, antes de retirar a agulha da larva, para permitir que o volume da solução desejado seja injetado totalmente e se misture com a hemolinfa. Retira-se a agulha delicadamente e coloca-se a larva no recipiente (formas de plástico para formar gelo) contendo terra umedecida e um pouco de comida, a rama de batata. Em todos os experimentos o volume da injeção em cada larva foi de 1 microlitro.

#### 4. Processamento citológico (SAUAIA, 1971)

##### 4.1. - Remoção das glândulas

As glândulas salivares são removidas dissecando-se a larva com duas pinças (do tipo usada por relojoeiros), uma da ponta fina e a outra de ponta romba. Com esta, segura-se a extremidade posterior da larva e com a outra a região logo atrás da cabeça. Faz-se ligeira tração, que resulta no rompimento da parede do corpo ao nível da pinça fina. Imediatamente, as glândulas salivares são colocadas em uma cubeta contendo ácido perclórico a 7% (quando se destinam a estudo morfológico) ou ácido tricloroacético a 10% (quando para radiometria). As glândulas salivares ao serem submersas na solução fixadora são agitadas de um lado para outro, ainda prêsas pela pinça, para permitir desenrolamento das glândulas e facilitar a remoção posterior do corpo gorduroso que as acompanha.

##### 4.2. Fixação e esmagamento

Depois de 2 a 4 horas de fixação no ácido perclórico a 7%, à temperatura ambiente, a região anterior da glândula (S1) é removida e imersa em uma gota de ácido acético a 50% sobre uma lâmina de microscópio. Troca-se a gota de ácido acético 2 a 3 vêzes. Com luz refletida ao estereomicroscópio, o citoplasma das células parece transparente e os núcleos brilhantes. Em seguida coloca-se uma lamínula sobre o material, tendo-se o cuidado de não permitir a formação de bolhas de ar. Com um estilete resistente ou com a ponta fina de uma pinça, dão-se algumas delica-

das cutucadas sobre a lamínula. Entre duas folhas de papel de filtro, faz-se ligeira pressão sobre a lamínula o que permite completar o espalhamento dos cromossomas. Selam-se os bordos da lamínula com uma mistura de vaselina e parafina e a preparação pode ser examinada e também fotografada em microscópio de contraste de fase. A lâmina e lamínula devem estar sem ranhuras, rigorosamente limpas e desengorduradas.

#### 4.3. - Preparação permanente

Uma vez examinada e fotografada a preparação, a lâmina pode ser preparada e montada permanente para análise posterior. A lamínula é removida pela técnica do nitrogênio líquido: introduz lentamente no bujão de nitrogênio, um cilindro de metal de 50 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro, adaptado a uma rolha de borracha numa das extremidades, de modo que a rolha não se ajuste na boca do bujão, ficando suspensa por duas metades de uma outra rolha menor, que ficam presas uma de cada lado, de tal maneira que os vapores escapam livremente. Assim, dentro de 5 a 10 minutos, dependendo da quantidade de nitrogênio existente no bujão, a base exposta do cilindro atinge temperatura inferior à do congelamento do etanol a 90%; esta base serve de superfície de congelamento para a lâmina. A lâmina com a lamínula para cima é colocada sobre a extremidade exposta do cilindro. Faz-se uma ligeira pressão na lâmina sobre a superfície gelada. Após um minuto e meio, com auxílio de uma lâmina de barbear retira-se a lamínula e a lâmina com a preparação, é submersa em uma mistura previamente gelada de alcool a 70%, formol 40% e ácido acético glacial na proporção de 85:10:5 (alfac).

Transcorridas 48 horas ou mais de fixação dentro da geladeira, as lâminas passam por uma bateria de álcool com concentrações decrescentes 80, 70, 50% e água, com permanência de 3 minutos em cada um. Em seguida são coradas com uma solução de azul de metileno a 0,5% por 10 minutos e lavadas em água corrente para retirar o excesso do corante. A desidratação é feita dando-se 2 banhos de álcool butílico terciário, 2 minutos em cada, 3 banhos de xilol, 5 minutos em cada e montadas então em bálsamo do Canadá.

##### 5. Crítérios para a avaliação do grau de inibição

Estabeleceram-se, para classificar o grau de inibição dos pufes de DNA, as seguintes categorias: a) normais ou não inibidos; b) fracamente ou medianamente inibidos; c) fortemente inibidos ou supressos (Fig. 4). Para realizar a classificação, as lâminas permanentes tiveram suas etiquetas cobertas e foram misturadas entre sí, de modo que, durante seu exame era desconhecida sua procedência. A uniformidade do grau de inibição em cada lâmina, era tal, que para esse critério de classificação foi somente necessário classificar lâminas e não cromossomas da mesma preparação. As lâminas para as quais seria adequada uma categoria intermediária foram incluídas na de menor grau de inibição. O estabelecimento destas três categorias foi baseado nos pufes C4 e C5. Critério semelhante foi aplicado à observação dos pufes de DNA do segundo grupo.

## 6. Radiometria (ALMEIDA, 1973)

Para o processamento radiométrico, utilizou-se a técnica de medida de incorporação de precursores radioativos em glândulas salivares de B. hygida, padronizada nesse laboratório. As glândulas salivares uma vez removidas, como já descrito, são depositadas em cubetas que contêm solução fixadora de ácido tricloroacético a 10%, previamente gelada. As cubetas são mantidas em banho de gelo. Após a fixação de 30 a 40 minutos, as glândulas são transferidas para recipientes (tipo vidros de penicilina), que contêm etanol a 70%; as glândulas permanecem no álcool até o dia seguinte ou mais tempo. Para assegurar completa remoção do material radioativo não incorporado, troca-se o álcool 2 a 3 vezes durante esse período. A remoção do corpo gorduroso das glândulas é feita durante a fixação no ácido tricloroacético, ou posteriormente, após o tratamento com o álcool. Uma vez retirado todo o corpo gorduroso, a glândula é transferida para o frasco de cintilação vazio com auxílio de estilete. O frasco deve estar inclinado cerca de 45º graus. Após a secagem do material, que se dá dentro de poucos minutos, acrescentam-se 10 microlitros de água e 100 microlitros de solubilizador orgânico NCS (Nuclear Chicago Solubilizer). Depois de 1 hora, ou mais, acrescentam-se 10 ml de solução de 0,6% de PPD (Difeniloxazol) em tolueno. Não é necessário que o tolueno usado na solução cintiladora seja de "grau de cintilação"; o tolueno 8325 da Merck é adequado. A medida da radioatividade foi feita em um espectrômetro de cintilação em líquido (Beckman LS-150) gentilmente cedido pelo Professor R.H. Migliorini. Para a contagem era utilizada a janela do trítio, dentro de um erro 2, sigma de 5%.

### 6.1. - Lavagem dos frascos de cintilação

A recuperação dos frascos de cintilação é feita da seguinte maneira: desprezada a solução cintiladora cuidadosamente no ralo da pia, com a torneira toda aberta, os frascos são enxaguados e emergidos em uma grande quantidade de água, dentro de uma bacia de plástico, que contém detergente (do tipo doméstico). Depois de 3 dias ou mais, os frascos são enxaguados várias vezes em água corrente e tratados com solução sulfocrômica por 12 a 24 horas. Removida a sulfocrômica com cerca de 10 banhos de água de torneira, 3 ou mais banhos de água filtrada e 1 de água destilada, os frascos são levados para a estufa para secagem.

Para verificar a eficiência do método de recuperação dos frascos, comparamos as leituras do "background" de 22 frascos recuperados várias vezes e 22 frascos novos. As médias, ao lado dos erros padrões foram respectivamente  $22,1 \pm 0,24$  e  $21,4 \pm 0,16$ .

### 7. Microscopia e Fotomicrografia

As observações das preparações à fresco foram feitas em microscópio de contraste de fase. As fotomicrografias foram tomadas em fotomicroscópio Zeiss, com objetivas de fase Neofluar e filtro verde (546 nm). A película utilizada foi a Panatomic-X 35 mm da Kodak e a revelação desta foi feita em Microdol-X também da Kodak. Para as ampliações utilizou-se papel Kodabromide (Kodak) e na maior parte papel F4. Na reprodução das montagens fotográficas foi usada película Neopan SSS da Fuji e copiados também em Kodabromide.

## R E S U L T A D O S

### 1. Efeito do IMPY sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA

Em uma primeira etapa, foi realizada uma série de experimentos de caráter morfológico com a finalidade de se conhecer a ação do IMPY sobre os pufes de DNA. Em cada experimento, 15 a 20 larvas em diferentes idades do quarto estágio (antes de m7) receberam injeção de um microlitro de solução de IMPY 0,3M e outras tantas, injeção de um microlitro de água (grupo controle). Ao atingir a idade m7 cada larva foi dissecada e suas glândulas salivares processadas para estudo citológico. O tempo transcorrido da injeção à idade m7 foi registrado.

As larvas que receberam injeção do inibidor entre 6 a 16 horas ou entre 28 a 32 horas antes de m7 deram preparações em que os pufes de DNA eram fraca ou medianamente inibidos (Fig. 4b, c). As larvas injetadas entre 16 e 28 horas antes de m7 deram preparações em que os pufes foram fortemente inibidos ou virtualmente supressos (Fig. 4d e Tabela II).

Para saber se o IMPY quando administrado no tempo crítico, também inibe os pufes de DNA que se expandem mais tarde no desenvolvimento larval (entre 8 e 15 horas depois de m7), foi realizada uma segunda série de experimentos morfológicos: em cada experimento 20 a 25 larvas em idade m3 receberam injeção de IMPY e um mesmo número de larvas, injeção de água. As larvas que atingiram o padrão m7 entre 16 e 25 horas depois da injeção foram selecionadas. Decorrido diversos tempos (3, 6, 8, 10, 12 e 15 horas), as glândulas salivares foram processadas para estudo citológico. Os pufes de DNA que normalmente estão abertos nas lar-



FIGURA 4

Graus de inibição dos pufes de DNA do cromossoma C correspondente à idade m7, produzida pela injeção de 1 microlitro de solução de IMPY 0,3M.

- a - de larva controle
  - b - pufes de DNA fracamente inibidos
  - c - pufes de DNA medianamente inibidos
  - d - pufes fortemente inibidos ou supressos
- X 700

FIG. 4

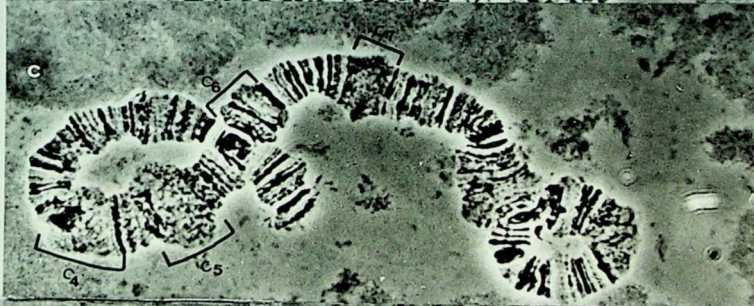


TABELA II

Efeito do IMPY sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA C4 e C5 segundo a duração do intervalo entre a injeção e o tempo de abertura desses pufes. A segunda coluna dá o número de experimentos que contribuíram para o número de larvas especificado na 3ª coluna. Observações à parte mostraram que as lâminas controle eram semelhantes entre si, qualquer que fosse o tempo de injeção da água.

Tempo transcorrido entre a injeção de IMPY e a idade m7	Número de experimentos	Nº de larvas	Grau de inibição		
			Não inibidos	Fraca ou medianamente inibidos	Fortemente inibidos ou supressos
6 a 16 horas	6	12	3	9	-
17 a 28 horas	8	32	3	3	26
29 a 33 horas	4	5	3	2	-
Controle	15	33	30	3	-

vas controle (C6, B3, B10, A1, A14 e X4) foram fortemente inibidos nas larvas tratadas (Fig. 5c, d; 6; 7). Além disso, os locais de expansão dos pufes de DNA do primeiro grupo (C4, C5 e C7) não mostraram acúmulo de cromatina que normalmente aparece depois da máxima expansão (Fig. 5d).

Quanto aos pufes de RNA, o IMPY administrado nesses períodos parece não afetar o seu programa normal de expansão e de regressão (Figs. 5c, d; 6).

Larvas tratadas com IMPY, durante o tempo crítico prosseguem seu desenvolvimento e produzem imagos ao mesmo tempo que as controles, 8 a 9 dias depois de m7. São entretanto anormais: abdômem, patas, asas, antenas apresentam defeitos diversos em na tureza e gravidade (Fig. 9). Algumas moscas não chegavam a libertar-se do casulo dada a grave anomalia de abdômem (Fig. 9d). Essas malformações são semelhantes às observadas com HU (SAUAIÁ, LAICINE e ALVES, 1971).

Foram feitas outras observações, agora quanto ao efeito a curto termo, do IMPY sobre pufes de DNA do primeiro grupo: quando o inibidor é administrado pouco antes da expansão máxima dos pufes de DNA na idade m7 (2 a 4 horas), há um efeito estimulativo sobre o pufe C7. Normalmente esse pufe está na sua máxima expansão cerca de 1 hora antes de m7 e praticamente fechado na idade m7. Nas larvas tratadas com IMPY, mantém-se aberto e mostra-se claramente maior do que nas larvas controle na máxima expansão (Fig. 8c). Além disso, o pufe C5, nas mesmas preparações apresenta-se fechado. Outro efeito estimulativo do IMPY é também observado sobre o pufe de RNA na região 1 do cromossoma B (B1).

Esse efeito seletivo não é observado com a HU quando esta é administrada nesse mesmo período (Fig. 8b).

FIGURA 5

- a - Cromossoma C de larva na idade m7
  - b - de larva em m7, injetada com IMPY 20 horas antes.
  - c - de larva 12 horas depois de m7
  - d - de larva 12 horas depois de m7, injetadas com IMPY no tempo crítico (cerca de 20 horas antes de m7).
- Pufes de RNA (flexas) são indistinguíveis entre larvas controles e experimentais.

X 700

FIG. 5

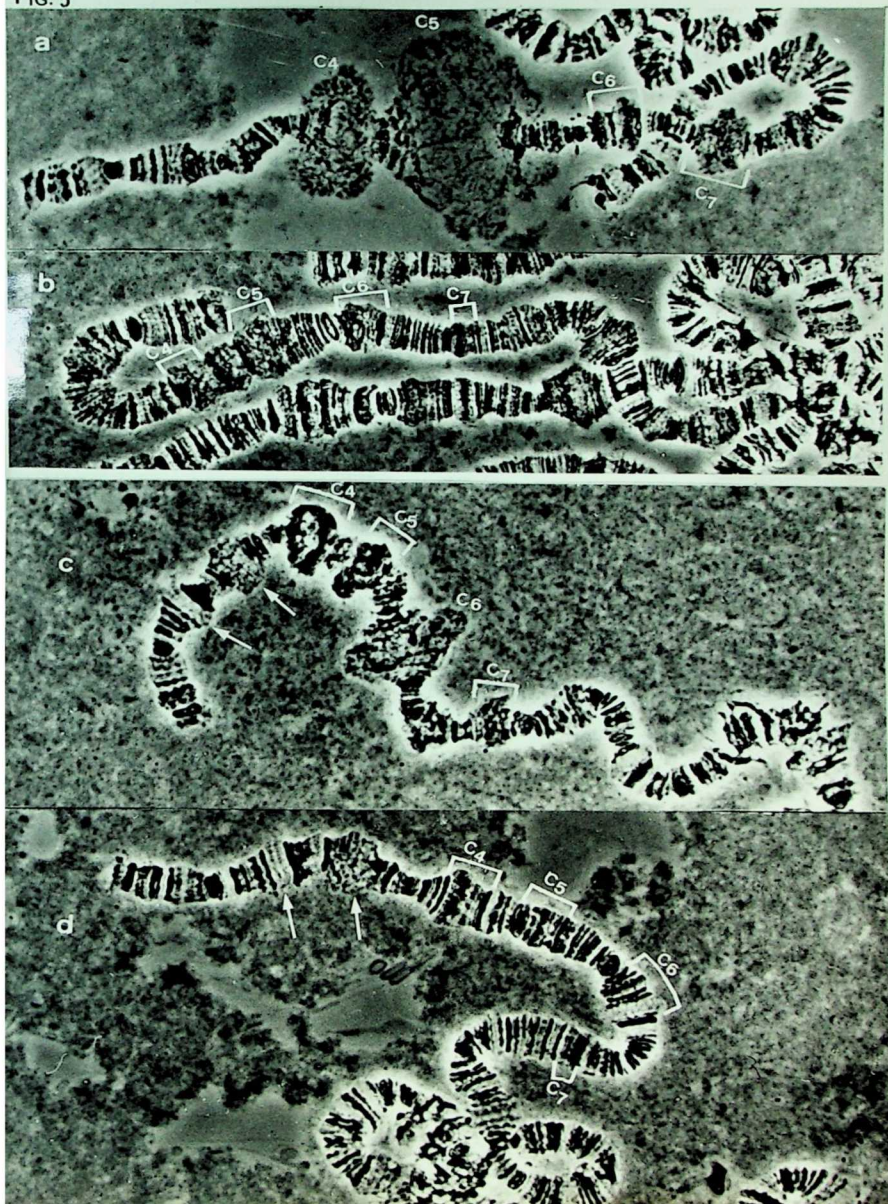


FIGURA 6

- a - Cromossoma B de larva na idade m7
- b - de larva em m7, tratada com IMPY 20 horas antes
- c - de larva 12 horas depois de m7
- d - de larva 12 horas depois de m7, tratada com IMPY no tempo crítico (cêrca de 20 horas antes de m7).

Os pufes de RNA (flexas) estão presentes tanto nas larvas controle como experimentais.

X 700

FIG. 6

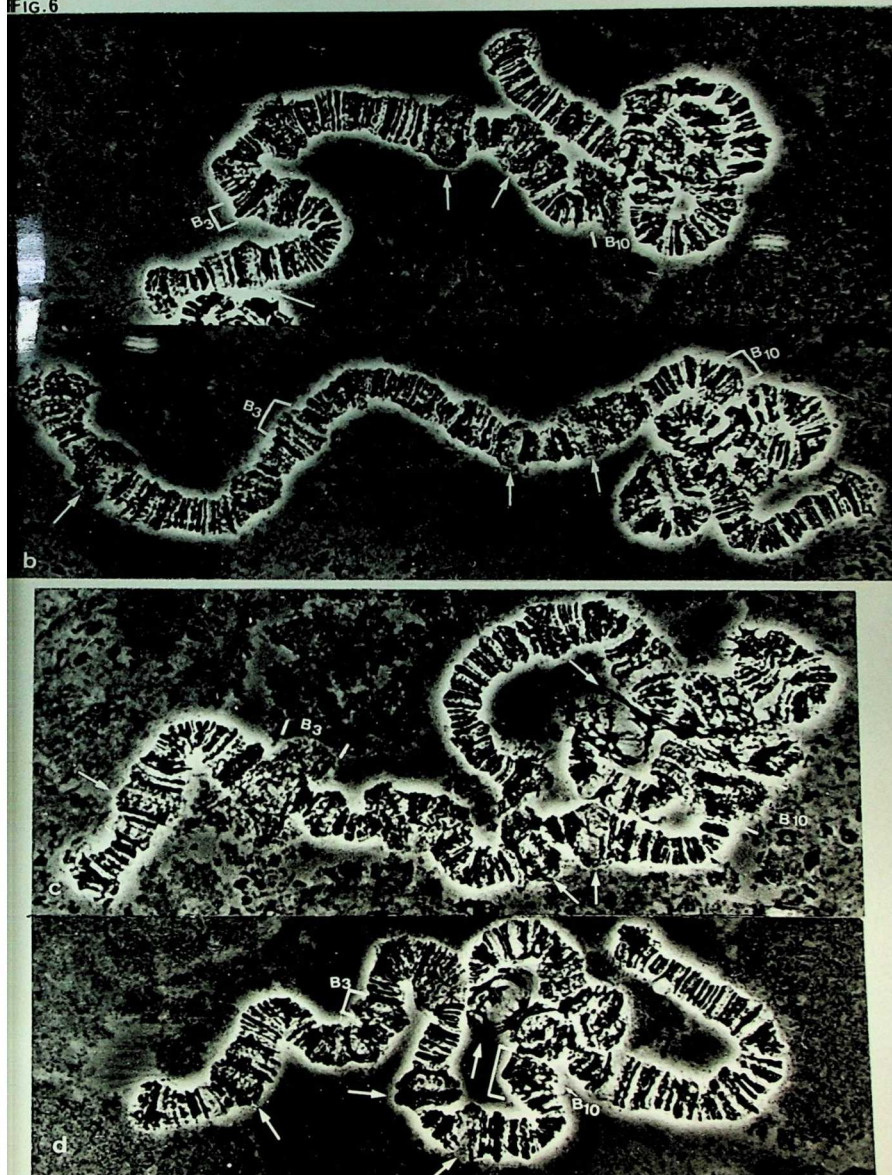




FIGURA 7

- a - Cromossoma X de larva 12 horas depois de m7
- b - Cromossoma X de larva 12 horas depois de m7, tra  
tada com IMPY no tempo crítico (cerca de 20 ho-  
ras antes de m7).
- c - Cromossoma A de larva 12 horas depois de m7
- d - Cromossoma A de larva 12 horas depois de m7, tra  
tada com IMPY no tempo crítico (20 horas antes  
de m7).

X 700

Fig 7

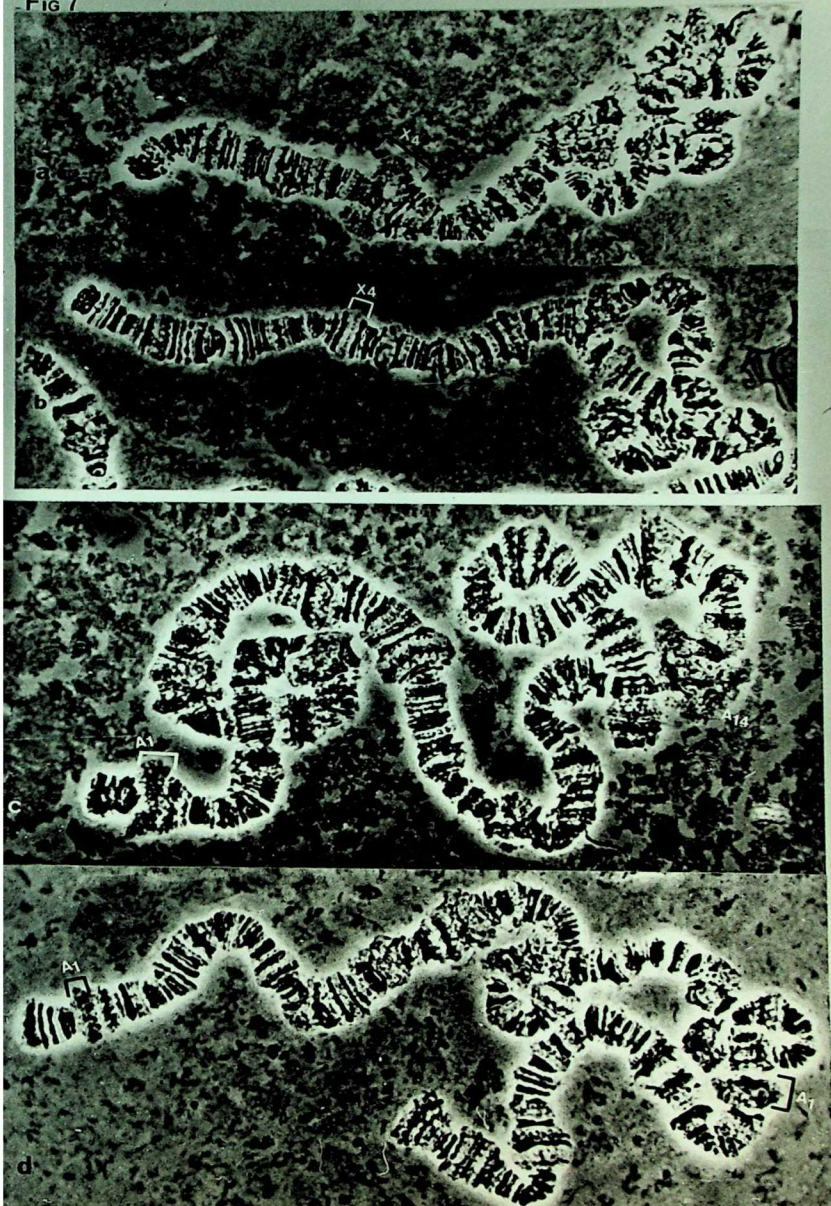


FIGURA 8

Cromossoma C de larvas na idade m7, tratada 2 horas antes:

- a - de larva que recebeu injeção de água
- b - de larva que recebeu injeção de HU
- c - de larva que recebeu injeção de IMPY

O C7 nas larvas tratadas com IMPY mostrou-se estimulado em quase todos os experimentos, apresentando-se maior do que nas larvas tratadas com HU ou com água. A inibição seletiva do C5 foi também clara em todas as larvas e experimentos.

X 700

FIG. 8

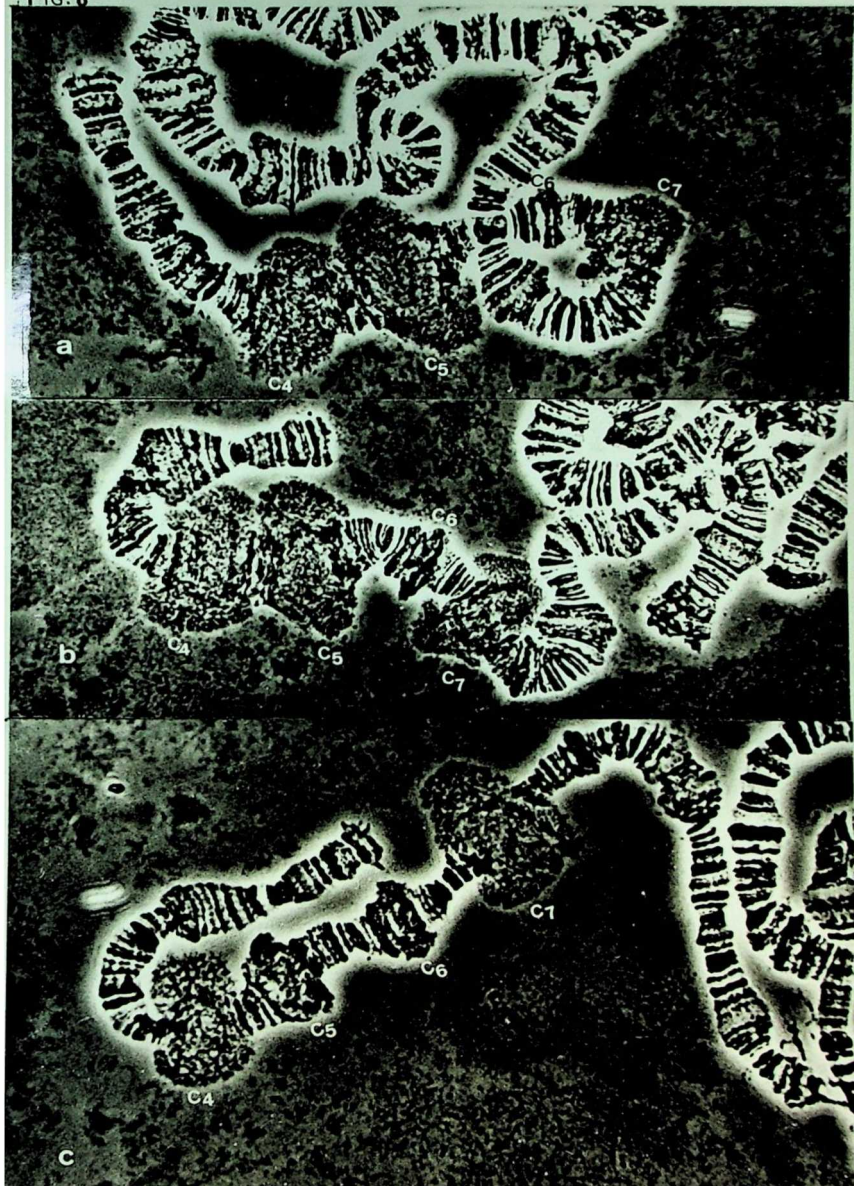


FIGURA 9

- A - Fêmea normal de B. hygida  
B, C e D - Fêmeas com diversos graus de anomalias  
resultantes de larvas tratadas com IMPY 16 a  
25 horas antes de m7.  
X 10

FIG. 9

A



B



C



D



## 2. Efeito do IMPY sobre a incorporação total de timidina, de uridina e de leucina.

Para estudar o efeito do IMPY sobre a síntese global de DNA, de RNA e de proteínas na glândula salivar, foram escolhidas larvas na idade m3, período em que o IMPY produz forte inibição do desenvolvimento dos pufes de DNA. Para efeito de comparação, foi incluído nos experimentos igual número de larvas tratadas com HU, inibidor de ação seletiva e reversível de síntese de DNA (GALE, 1964; YOUNG e HODAS, 1964; ROSENKRANZ e LEVY, 1965), cujo efeito nesse sistema biológico já é conhecido (SAUAIA, 1971; SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971).

### 2.1. - Efeito sobre a incorporação de timidina

Para cada experimento, um grupo de 6 a 10 larvas recebeu injeção de IMPY, um segundo grupo, injeção de HU e um terceiro grupo injeção de água (grupo controle); transcorrido certo tempo (15 minutos, 2, 7, 21, 28 ou 37 horas) as larvas receberam injeção de 1 microlitro de timidina tritiada. Depois de 2 horas de incorporação as larvas foram dissecadas e as glândulas removidas para processamento radiométrico.

Tanto o IMPY como a HU reduz a síntese de DNA à níveis abaixo de 10% (Tabela III e Fig.10A). Esse nível é mantido desde o período de 15 minutos-2 horas até pelo menos 23 horas depois da injeção do inibidor. A menor incorporação é observada com 7-9 horas depois da injeção do inibidor: a média é de aproximadamente 3,0% para o IMPY e para a HU em relação ao controle. Com 30 horas há recuperação total da síntese, observando-se com a HU

TABELA III

Efeito do IMPY e da HU sobre a incorporação de timidina- $H^3$  na glândula salivar de *B. hygida*. As larvas receberam a injeção do inibidor em idade m<sup>3</sup> e o precursor vários tempos depois: 15 minutos, 2, 7, 21, 28 e 37 horas; O tempo de incorporação foi sempre de 2 horas. Cada dado é a média dos resultados de um experimento, acompanhado do erro padrão. Os números colocados entre parênteses, à direita, são os de larvas injetadas. Os números entre parênteses, abaixo da média representam a porcentagem em relação ao controle (Ver Figura 10A).

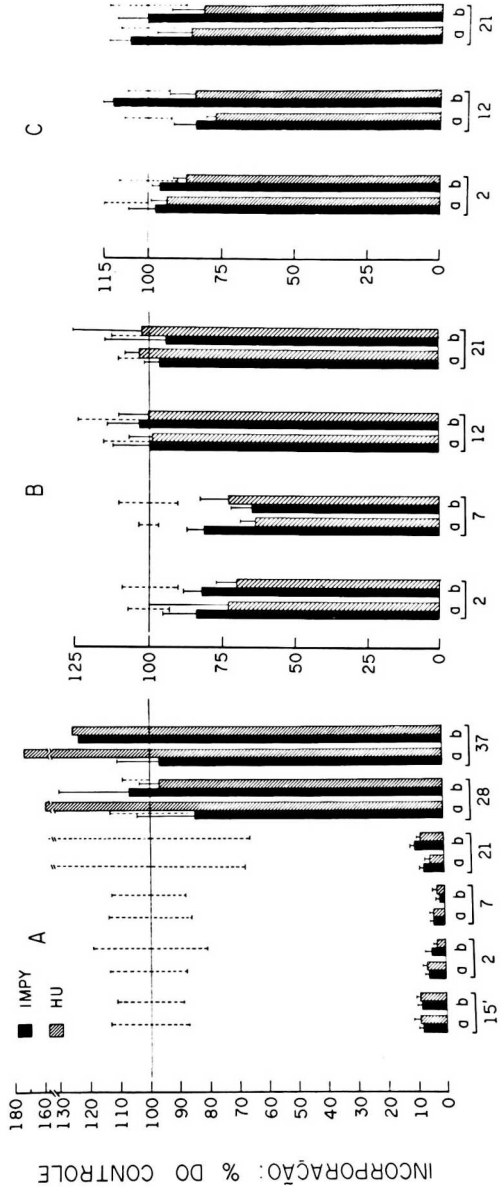
Tempo após a injeção	Ex-peri-mento	Natureza da injeção		
		Água c.p.m	IMPY c.p.m	HU c.p.m
15 min.	a	27.856 $\pm$ 3.691(5)	2.312 $\pm$ 303(7) (8,3%)	2.592 $\pm$ 409(7) (9,3%)
	b	39.075 $\pm$ 4.280(6)	3.213 $\pm$ 290(7) (8,2%)	3.776 $\pm$ 296(6) (9,7%)
2 horas	a	19.650 $\pm$ 510(8)	1.102 $\pm$ 65(5) (5,6%)	1.196 $\pm$ 208(4) (6,0%)
	b	18.628 $\pm$ 3.618(5)	1.022 $\pm$ 605(6) (5,5%)	562 $\pm$ 105(6) (3,0%)
7 horas	a	16.002 $\pm$ 2.169(4)	578 $\pm$ 45(5) (3,6%)	565 $\pm$ 77(6) (3,5%)
	b	20.187 $\pm$ 2.431(4)	373 $\pm$ 67(4) (1,8%)	507 $\pm$ 74(4) (2,5%)
21 horas	a	11.656 $\pm$ 3.727(4)	795 $\pm$ 74(8) (6,8%)	639 $\pm$ 73(6) (5,5%)
	b	9.151 $\pm$ 3.090(4)	955 $\pm$ 168(7) (10,4%)	699 $\pm$ 93(7) (7,6%)
28 horas	a	799 $\pm$ 109(7)	539 $\pm$ 120(7) (85,0%)	1.289 $\pm$ 408(6) (161%)
	b	1.218 $\pm$ 51(5)	1.303 $\pm$ 301(7) (107,0%)	1.190 $\pm$ 153(4) (97,0%)
37 horas	a	648 $\pm$ 116(4)	624 $\pm$ 96(8) (96,3%)	1.136 $\pm$ 117(6) (175,3%)
	b	947 $\pm$ 154(4)	1.170 $\pm$ 133(6) (124,0%)	1.198 $\pm$ 79(7) (126,6%)



FIGURA 10

Efeito do IMPY e da HU sobre a incorporação global de timidina, de uridina e de leucina tritiadas, na glândula salivar de B. hygida. Os gráficos A, B e C representam, respectivamente, os resultados das tabelas III, V e VI. Os segmentos verticais correspondem ao erro padrão da média e o traço horizontal à altura do número 100 representa a incorporação do controle. Cada letra abaixo das colunas representa um experimento. Outros detalhes, na legenda das tabelas.

- A - timidina
- B - uridina
- C - leucina



HORAS APÓS A INJEÇÃO DO INIBIDOR

uma incorporação bem superior à do controle, 161% e 175%, respectivamente para um dos experimentos de 28 e 37 horas depois da injeção do inibidor (Tabela 1 do Apêndice). A análise de variância (LISON, 1958) mostrou diferença significativa entre as médias de água e HU (P menor que 0,05). Resultados semelhantes foram relatados com esse sistema (SAUAIÁ, LAICINE e ALVES, 1971) e com um outro (SUSS e MAURER, 1968).

Um experimento adicional foi realizado para verificar, se em idades avançadas os níveis de incorporação naturalmente baixos, são também sensíveis aos inibidores: nove larvas, na idade m7, receberam injeção de IMPY, nove, injeção de HU e nove de água. Dezesete horas depois, as glândulas salivares foram processadas para radiometria. Nessa idade, a incorporação de timidina nas larvas tratadas com o IMPY reduziu à 28,7% e com a HU à 21,8%, em relação às larvas controle (Tabela IV).

As tabelas fornecidas no Apêndice apresentam leituras de incorporação por par de glândulas de modo que os resultados poderão ser comparados dentro de um mesmo experimento ou entre experimentos diferentes.

## 2.2. - Efeito sobre a incorporação de uridina

Para cada experimento, um grupo de 6 a 10 larvas recebeu injeção de IMPY, um segundo grupo, injeção de HU e um terceiro grupo injeção de água; transcorrido certo tempo (2, 7, 12 ou 21 horas) as larvas receberam injeção de 1 microlitro de uridina tritiada. Depois de 2 horas de incorporação as larvas foram dissecadas e as glândulas removidas para processamento radiométrico

TABELA IV

Efeito do IMPY e da HU sobre a incorporação de timidina- $H^3$  na glândula salivar de *B. hygida*. O inibidor foi administrado em larvas na idade m<sup>7</sup> e o precursor 17 horas depois. Outras especificações como na legenda da Tabela III.

Tempo após a injeção	Natureza da injeção		
	Água c.p.m	IMPY c.p.m	HU c.p.m
17 horas	1.518±199(9)	435±18(6) (28,7%)	331±18(9) (21,8%)

A incorporação de uridina tritiada na glândula salivar das larvas tratadas tanto com a HU como com o IMPY chega a ser reduzida a perto de 60% 7-9 horas depois do tratamento com o inibidor. Quatorze horas depois, a incorporação de uridina já apresenta níveis iguais aos das larvas controle (Tabela V e Figura 10B). Vinte e três horas depois da injeção dos inibidores, feita em m<sup>3</sup>, o nível de incorporação é normal. A análise de variância (LISON, 1958) para o experimento "a" de 2 horas não indica diferença significativa entre as médias das 3 amostras. Para o experimento "b" de 2 horas e para os dois experimentos de 7 horas, a análise de variância indica diferença significativa (P menor do que 0,05) entre as 3 amostras. O teste de Tukey, modificação de Hartley (SNEDECOR & COCHRAN, 1972) indica diferença entre as médias de "água e IMPY", "água e HU" mas não indica diferença entre "IMPY e HU" (Ver Tabela 3 do Apêndice).

### 2.3. - Efeito sobre a incorporação de leucina

Para cada experimento, um grupo de 6 a 10 larvas recebeu injeção de IMPY, um segundo grupo injeção de HU e um terceiro grupo injeção de água; transcorridas 2, 12 ou 21 horas, as larvas receberam injeção de 1 microlitro de leucina tritiada. Depois de 2 horas de incorporação as larvas foram dissecadas e as glândulas removidas para processamento radiométrico.

O menor nível de incorporação (77% do controle) foi observado em larvas tratadas com HU 12-14 horas depois da injeção do inibidor (Tabela VI e Figura 10C). Embora o nível de incorporação tenha sido menor nas larvas tratadas com HU, a análise de variância não demonstrou diferença significativa entre as 3 amostras (P maior do que 0,05); isso é verdadeiro também quando a análise foi feita sobre o conjunto de dados dos experimentos relativos aos tempos de 12 e 21 horas. (Ver Tabela 4 do A pêndice).

TABELA V

Efeito do IMPY e da HU sobre a incorporação de uridina- $H^3$  na glândula salivar de B. hygida. As larvas receberam a injeção do inibidor em idade  $m^3$  e o precursor vários tempos depois: 2, 7, 12 e 21 horas; o tempo de incorporação foi sempre de 2 horas. Cada dado é a média dos resultados de um experimento, acompanhado do erro padrão. Os números colocados entre parênteses, à direita, são os de larvas injetadas. Os números entre parênteses abaixo da média representam a porcentagem em relação ao controle (Ver figura 10B).

Tempo após a injeção	Experi-mento	Natureza da injeção		
		Água c.p.m	IMPY c.p.m	HU c.p.m
2 horas	a	5.408 $\pm$ 373(8)	4.547 $\pm$ 58(8) (84,0%)	3.930 $\pm$ 1.488(7) (72,6%)
	b*	3.843 $\pm$ 287(6)	3.142 $\pm$ 250(6) (82,0%)	2.677 $\pm$ 268(6) (70,0%)
7 horas	a*	7.409 $\pm$ 238(7)	6.044 $\pm$ 443(5) (81,4%)	4.774 $\pm$ 368(8) (64,0%)
	b*	4.581 $\pm$ 455(5)	2.941 $\pm$ 324(5) (65,1%)	3.313 $\pm$ 395(7) (73,3%)
12 horas	a	2.949 $\pm$ 452(5)	2.921 $\pm$ 374(7) (99,5%)	2.915 $\pm$ 220(6) (98,8%)
	b	3.454 $\pm$ 816(6)	3.540 $\pm$ 399(6) (102,7%)	3.441 $\pm$ 360(6) (99,7%)
21 horas	a	4.157 $\pm$ 317(8)	4.010 $\pm$ 206(8) (96,4%)	4.294 $\pm$ 181(8) (103,3%)
	b	1.882 $\pm$ 228(6)	1.773 $\pm$ 395(6) (94,2%)	1.923 $\pm$ 428(5) (102,1%)

\* Difere significativamente das duas outras médias do mesmo experimento (P menor que 0,05).

TABELA VI

Efeito do IMPY e da HU sobre a incorporação de leucina- $H^3$  na glândula salivar de *B. hygida*. Os inibidores foram administrados em larvas em idade  $m^3$  e o precursor, 2, 12 e 21 horas depois; o tempo de incorporação foi sempre de 2 horas. Cada dado é a média do resultado de um experimento, acompanhada do erro padrão. Os números colocados entre parênteses, à direita, são os de larvas injetadas. Os números entre parênteses, abaixo da média representam a porcentagem em relação ao controle (Ver Fig. 10C).

Tempo após a injeção	Ex-peri-mento	Natureza da injeção		
		Água c.p.m	IMPY c.p.m	HU c.p.m
2 horas	a	21.394 $\pm$ 3.498(5)	20.978 $\pm$ 2.051(5) (98,0%)	20.257 $\pm$ 914(7) (94,7%)
	b	12.579 $\pm$ 1.147(5)	12.059 $\pm$ 332(5) (95,9%)	10.970 $\pm$ 709(5) (87,0%)
12 horas	a	7.292 $\pm$ 598(6)	6.148 $\pm$ 526(6) (84,3%)	5.624 $\pm$ 216(5) (77,0%)
	b	8.783 $\pm$ 652(7)	9.870 $\pm$ 961(6) (112,0%)	7.411 $\pm$ 713(7) (84,0%)
21 horas	a	7.029 $\pm$ 556(7)	7.509 $\pm$ 447(7) (106,8%)	5.984 $\pm$ 845(3) (85,0%)
	b	9.013 $\pm$ 1.195(7)	9.080 $\pm$ 966(7) (100,7%)	7.380 $\pm$ 948(6) (81,8%)

## D I S C U S S Ã O

O estudo de agentes que permitem controlar ou modificar o desenvolvimento dos pufes cromossômicos tem dois centros principais de interesse: o de conseguir meios de ação seletiva utilizáveis no estudo da função desses pufes e o de caracterizar eventos moleculares importantes na sua gênese e funcionamento. O presente trabalho situa-se no primeiro.

O conjunto de informações, até agora obtido a respeito da ação de inibidores de síntese de DNA sobre os pufes de DNA, indica que importa distinguir dois efeitos: obtido por inibição da síntese de DNA durante todo o tempo de desenvolvimento daqueles pufes e o que resulta da inibição de síntese de DNA durante somente uma parte adiantada do seu desenvolvimento. No primeiro caso, o efeito no pufe é de inibição forte ou supressão; no segundo, o efeito varia segundo o inibidor e, até mesmo, segundo o pufe considerado.

### 1. Efeito do IMPY a longo prazo, sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA.

A expansão dos pufes de DNA é acompanhada e, na maioria dos casos, precedida, de síntese desproporcionada de DNA nos sítios cromossômicos que os formam (FICQ e PAVAN, 1957; RUDKIN e CORLETTE, 1957; GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964; RASCH e RASCH, 1967; CROUSE e KEYL, 1968; SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971). Trabalhos autorradiográficos com pufes "heterozigotos" (PERONDINI e DESSEN, 1969) mostram também relação entre o tamanho dos pufes de DNA e a intensidade de síntese de DNA que neles ocorre. Os resultados



obtidos com HU (SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971) e com IMPY, aqui relatados, indicam que a síntese de DNA é condição para que os pufes de DNA se desenvolvam. Mostram, além disso, que o tamanho dos pufes de DNA depende da duração que se permite à síntese de DNA durante o tempo de formação daqueles pufes, o que sugere claramente uma dependência do tamanho dos pufes de DNA da quantidade de DNA que contenham. Quando administrado entre 16 e 6 horas antes de m7, ou entre 28 e cerca de 33 horas antes de m7, o IMPY resulta em B. hygida na formação de pufes de DNA pequenos: (Fig. 4, 5, 6 e 7); no primeiro caso, quantidade suficiente de DNA adicional foi permitida antes da injeção e, no segundo caso, o efeito do inibidor terá sido superado em tempo para que o mesmo resultado ocorra. Injeções feitas entre 16 e 28 horas antes de m7, resultam em virtual supressão dos pufes de DNA porque seus efeitos prevalecem durante tempo adequado para minimizar a quantidade de DNA adicional feita. Os mesmos resultados (Figs.5,6,7) são obtidos para os pufes de DNA que se abrem cerca de 10 horas mais tarde no desenvolvimento (C6, B3, A1, A14 e X4). Nesse caso, mesmo que haja superação do efeito do inibidor antes do tempo de abertura dos pufes, a síntese de DNA adicional seria ainda tão limitada em duração que os pufes permaneceriam virtualmente supressos. Outra explicação possível e que pode ser também válida para o efeito da injeção entre 28 e 33 horas, sobre os pufes de DNA que se abrem mais cedo, é que os sítios cromossômicos mencionados deixem de estar determinados a fazerem DNA adicional se a inibição da síntese de DNA, presente desde o tempo de formação dos primórdios dos pufes, dure mais que certo tempo. Estudo autorradiográfico, paralelo ao radiométrico, nas mesmas larvas, poderia ser útil para verificar essas alternativas.

A injeção de 2 microlitros de HU 0,5M em Rhynchosciara angelae, feita no início ou durante o máximo de expansão do pufe 2B afeta somente de modo parcial esse pufe e o 3C (MACHADO-SANTELLI, 1973). Nesses experimentos, a inibição da síntese de DNA é máxima cerca de 9 horas depois da injeção do inibidor e 27 horas depois da injeção, a síntese de DNA está recuperada. Do início ao máximo de expansão do pufe 2B (que não forma primórdio) decorrem 2 dias e ao menos três dias se passam entre o aparecimento do primórdio do pufe 3C e sua máxima abertura. A inibição da síntese de DNA, portanto, prevaleceu nesses experimentos durante pequena parte do tempo de duração da síntese de DNA adicional nesses pufes. Não seria, pois, de esperar-se que fosse obtida inibição muito forte ou supressão dos mesmos.

O fato de, em nossos experimentos, 20% das larvas tratadas no tempo crítico mostrarem pufes parcialmente inibidos, ou semelhantes aos dos controles (Tabela II e Fig. 4), é inteiramente atribuível à técnica de injeção: nem todas as larvas retêm o volume recebido e não há plena segurança de que as mesmas doses sejam sempre aplicadas a todas as larvas, embora a instrumentação usada seja, do ponto de vista volumétrico, de alta precisão. Esta deve ser também, pelo menos em parte, a explicação da heterogeneidade dos dados radiométricos (ver as tabelas do Apêndice).

Os limites do tempo crítico devem resultar da interação de uma condição fisiológica e de uma situação operacional. A primeira corresponde à formação dos primórdios dos pufes de DNA e a segunda é dada pela eficiência e durabilidade do tratamento inibidor. Qualquer que sejam essas últimas, os pufes de DNA não deixarão ser supressos se a injeção foi feita depois de ocorrido

certo tempo de formação dos primórdios. O limite à esquerda do tempo crítico deverá, entretanto, variar segundo as condições do experimento. Assim, dose mais alta ou maior durabilidade do efeito do inibidor deverá dilatar o limite à esquerda do tempo crítico. É desse modo que interpretamos o fato de dose de IMPY 0,3M suprimir pufes de DNA mesmo quando a injeção é feita 28 horas antes de m7, o que não ocorre geralmente com a injeção de mesmo volume de HU 0,2M, para a qual o limite à esquerda é de cerca de 24 horas. Para ambos os tratamentos, os limites à direita coincidem.

## 2. Efeito do IMPY a curto prazo sobre pufes de DNA.

Quando administrado entre 2 a 4 horas antes de m7, portanto, pouco antes da máxima abertura dos pufes C5 e C7 o IMPY exerce pelo menos os seguintes efeitos: enquanto nas larvas controle, o pufe C7 está regredido ou em regressão, nas larvas tratadas apresenta-se aberto e, por vêzes, até mesmo maior que o usual; parte do pufe C5 apresenta-se aberto e parte com claros sinais de regressão, enquanto os controles o mostram em plena abertura (Fig. 8). O aspecto heterogêneo do pufe C5, visível no material controle, torna-se mais patente nas larvas tratadas com IMPY. Isso mostra que pufes diferentes podem responder diferentemente ao tratamento a curto termo com a mesma droga. A HU, injetada no mesmo período, não produz esses efeitos: os pufes de DNA parecem indistinguíveis dos controles, o que confirma observações anteriores (SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971). Experimentos radiométricos adicionais, em que medimos a incorporação de timidina tritiada nos intervalos de 2 a 4 horas e de 7 a 9 horas de-

pois da injeção de inibidor, feita aproximadamente entre 5 e 8 horas antes de m7, mostram que incorporação de timidina estava reduzida a menos de 3% dos controles, tanto com HU quanto com IMPY. Observações citológicas feitas separadamente em larvas tratadas do mesmo modo mostram pufes de DNA abertos. Isso sugere que pufes de DNA podem vir abrir-se e a se manterem abertos em condições de intensa inibição da síntese global de DNA. Nos experimentos mencionados anteriormente, MACHADO-SANTELLI (1971) obtém clara regressão do pufe 2B quando injeção de HU é feita no tempo de sua máxima abertura; encontra ainda, reabertura desse pufe ao fim do tempo em que a síntese de DNA se vai recuperando. Quando a HU é dada antes da máxima abertura dos pufes 2B e 3C de Rhynchosciara, os gráficos de MACHADO-SANTELLI indicam que esses pufes continuam a abrir-se, apesar de inibição considerável de síntese, no caso do pufe 2B, ou de intensa inibição da mesma, no caso do pufe 3C. Uma interpretação plausível para a mencionada regressão do pufe 2B é que se deve a que o DNA feito durante ou logo após o máximo de abertura desse pufe seja indispensável a que permaneça aberto; ao superar-se o efeito do inibidor, ao menos parte desse DNA necessário seria ainda feito e o pufe tornar-se-ia a abrir. As observações de MACHADO-SANTELLI de que os pufes 2B e 3C, tratados com HU bem antes de sua máxima expansão, continuam a abrir-se, juntamente com as informações obtidas com B. hygida, sugerem que o processo, em si, da síntese do DNA não seja condição universal necessária para que os pufes de DNA se abram ou se mantenham abertos. Faltam entretanto outros experimentos autorradiográficos indispensáveis para o estudo desta questão.

### 3. Efeito do IMPY sobre o desenvolvimento dos pufes de RNA.

As observações dos efeitos da HU sobre cromossomas politênicos (SAUAIÁ, LAICINE e ALVES, 1971; MACHADO-SANTELLI, 1973) indicam que esse inibidor não parece produzir alterações claras sobre o padrão de pufes de RNA. Nossas observações com o IMPY concordam com essa indicação no que diz respeito ao efeito do nosso inibidor a longo prazo ou seja, 16 horas ou mais depois de sua administração, (Figs. 5 c e d; 6). Em preparações citológicas de larvas em m7, tratadas com IMPY 2 a 4 horas antes, observa-se, entretanto, que o pufe de RNA do segmento B1 parece estar consideravelmente aumentado em tamanho. É muito desejável que esses possíveis efeitos sejam objeto de estudos quantitativos, morfométricos e autorradiográficos.

### 4. Efeito do IMPY sobre os órgãos do adulto

A explicação mais plausível para a ocorrência de anomalias nos adultos oriundos de larvas tratadas com IMPY (Fig. 9) ou HU durante o tempo crítico em que esses inibidores, administrados naquele período, perturbam o desenvolvimento dos tecidos que darão origem aos órgãos da mosca. É improvável que haja relação causal entre pufes de DNA e correto desenvolvimento daqueles órgãos. A função dos pufes deve ser procurada na própria glândula salivar. A HU administrada durante o desenvolvimento do bicho da sêda produz também anomalias de órgãos no adulto, e essas anomalias são mais evidentes nos órgãos relacionados mais ativamente com síntese de DNA durante o tratamento (SWINDLEHURST, BERRY

e FIRSHEIN, 1971).

5. Efeito do IMPY e da HU sobre a síntese global de DNA, RNA e de proteínas.

A intensidade desses processos foi estimada pela incorporação de precursores radioativos apropriados. Importa, todavia, ter em mente que uma alteração de nível de incorporação pode ser devida não somente a inibição de síntese, mas, também, a modificação na tomada do precursor pelas células da glândula salivar. Na ausência de verificação dessa variável, as inferências feitas a respeito de processo biossintético a partir de contagens obtidas de material insolúvel em ácido devem ser consideradas provisórias, embora plausíveis.

Os efeitos do IMPY e da HU sobre a incorporação de timidina são semelhantes. Administrados em m3, ambos a inibem drasticamente por mais de 21 horas. Trinta horas depois da injeção, os níveis de incorporação nas glândulas tratadas apresentam-se iguais ou superiores aos dos controles (Tabela III e Fig. 10A). Nessa idade, a síntese de DNA na glândula salivar já é relativamente baixa. Apesar disso, é clara a indicação de que de fato houve recuperação, pois, o nível de radioatividade nas glândulas tratadas é numericamente superior ao obtido em tempos mais próximos ao da injeção do inibidor; além disso, larvas tratadas em m7 e examinadas 19 horas depois (Tabela IV) incorporam somente 30% do que é incorporada pelos controles; ao contrário, as larvas examinadas na mesma idade, mas tratadas 39 horas antes, tem níveis de incorporação semelhantes aos dos controles ou superiores.

Em alguns experimentos mais do que em outros, os níveis

de incorporação no material tratado e examinado 30 a 39 horas de de pois do tratamento são notavelmente mais altos que os de material controle (Tabelas III e I do Apêndice). Uma explicação possível para isso é que as larvas sujeitas ao tratamento atrasam, mesmo que levemente, o seu desenvolvimento e se apresentam ao pre cursor em condições de maior capacidade de síntese. Outra possibilidade é que haja de fato incorporação aumentada nas glândulas que tenham superado a ação do inibidor. Rebotes desse tipo foram relatados no mesmo material, em larvas mais jovens (SAUAIÁ, LAICINE e ALVES, 1971) e em outros materiais (SUSS e MAURER, 1968; MACHADO-SANTELLI, 1973). Tais efeitos podem ser devidos a sincro nização de eventos de síntese, que resultaria apenas em aumento global de síntese em dado momento, ou podem ser reais exacerbações de incorporação nos cromossomos de modo geral ou em sítios particulares. As observações de MACHADO-SANTELLI sugerem que seja esta pelo menos em parte a explicação do efeito. A investigação desse problema em nosso material deve preferir larvas mais jovens do que aquelas que nos interessavam, tais que a diminuição natural do ritmo de síntese não se superponha superação da ação do inibidor.

A incorporação de uridina é levemente afetada por ambos os inibidores durante pelo menos 9 horas depois da injeção (Tabela V e Figura 10B). No que toca à incorporação de leucina, a aná lise de variância não mostra diferença significativa entre os ní veis de incorporação nos três grupos de larvas, mas, é clara a tendência dos dados no sentido de indicar que a HU deprime levemente o processo por longo tempo e que o IMPY não tem esse efeito. Uma diminuição da incorporação de leucina e de uridina tri tiadas pode ser devida, não somente a modificações na tomada des

ses precursores, mas também, a efeitos indiretos resultantes da inibição da síntese de DNA. Concluimos, pois, que o efeito desses inibidores, é, se não específico, pelo menos fortemente preferencial com relação à síntese de DNA.

6. O presente trabalho confirma os resultados obtidos anteriormente com HU (SAUAIA, 1971; SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971) e adiciona novo instrumento a um sistema que convida a indagar sobre as funções dos pufes de DNA com base na possibilidade de inibir seletivamente o desenvolvimento desses pufes. A virtude desse sistema está em permitir a comparação com glândulas controles de glândulas em que o desenvolvimento dos pufes de DNA tenha sido inibido por meios que, ao que tudo indica, não perturbam o programa de desenvolvimento de outros pufes cromossômicos. As possíveis correlações -ou sua ausência- entre pufes de DNA e produtos ou processos definíveis na glândula salivar terão, nesse sistema, maior verossimilhança do que as conseguidas por simples demonstração de coincidência no tempo entre desenvolvimento de pufes de DNA e produtos ou processos celulares. As limitações do sistema estão em que o efeito é conseguido por meio de drogas e através de inibição geral de síntese de DNA. O emprego de uma droga pode ter efeitos outros além do desejado. Nossos agentes que tem o mesmo efeito desejado e que podem não ter os mesmos possíveis efeitos colaterais são úteis para verificar uma correlação sugerida pelo emprego de outra droga. Também serão úteis, agentes capazes de inibir a atividade dos pufes de DNA e que não inibam de modo igualmente drástico a síntese global de DNA, como é o caso da 5-bromodeoxiuridina (ALMEIDA e SAUAIA, não publicado).



S U M Á R I O

Foi estudado o efeito do composto 2,3 dihidro-1H-imidazo (1,2-b) pirazol (CIBA 21,381-BA, IMPY), inibidor seletivo e reversível da síntese de DNA, sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA de B. hygida. Administrado (solução 0,3 M, um microlitro larva) 16 a 28 horas antes da abertura dos primeiros pufes de DNA (idade, m7) o IMPY produz forte inibição ou virtual supressão do desenvolvimento de todos esses pufes. O programa de formação de pufes de RNA parece continuar inalterado. Se o IMPY é administrado antes ou depois do intervalo crítico, os pufes de DNA formam-se, menores. Ensaio através de radiometria por cintilação em líquido mostram que tanto o IMPY como a hidroxauréia (HU) inibem fortemente a incorporação de timidina tritiada na glândula salivar por mais de 21 horas, diminuem moderadamente a incorporação de uridina e não parecem diminuir significativamente a incorporação de leucina. Entretanto, no que diz respeito à incorporação de leucina, os resultados sugerem claramente uma tendência da HU deprimir mais o processo do que o IMPY. O efeito do IMPY, como o da HU sobre a incorporação de timidina é reversível. Demonstrase, pois, novamente que inibição drástica da síntese de DNA durante o tempo em que se desenvolve os pufes de DNA resulta em virtual supressão dos mesmos. Os pufes de DNA não se fazem apenas acompanhar de síntese de DNA adicional; seu desenvolvimento, ao contrário do que ocorre com os pufes de RNA, depende de que tal síntese ocorra. Permitida síntese suficiente, os pufes de DNA formam-se, mesmo que menores. A injeção de IMPY ou de HU em tempo próximo ao da abertura dos pufes de DNA não lhes impede a abertura e não lhes acarreta o fechamento, indicação de que o

processo de síntese de DNA não é condição universal para que os pufes de DNA, uma vez formados se mantenham abertos. Não obstante essa observação geral, o IMPY pode afetar de modo diferente pufes diferentes.

As moscas resultantes de larvas tratadas com IMPY no tempo crítico também mostram anomalias diversas em natureza e gravidade. Inibição global intensa da síntese de DNA em um tempo crítico deve perturbar diretamente o desenvolvimento dos tecidos que formarão os órgãos do adulto.

S U M M A R Y

This is a study on the effect of the compound 2,3 dihydro-1H-imidazo (1,2 b-) pyrazol (Ciba 21,381-BA, IMPY) a selective and reversible inhibitor of DNA synthesis on the development of DNA puffs in Bradysia hygida. Administered (0,3M solution, 1ul/larva) 16 to 28 hs before the opening of the first DNA puffs (age m7) IMPY results in strong inhibition or virtual suppression of the development all the puffs of this kind. The program of RNA puff formation seems continue unaltered. If IMPY is administered before or after the critical interval, DNA puffs are formed, smaller. Radiometry by means of liquid scintillation counting shows that both IMPY and hydroxyurea (HU) strongly inhibit thymidine-H<sup>3</sup> incorporation for a period longer than 21 hs. They depress slightly uridine-5-H<sup>3</sup> incorporation and do not seem to inhibit that of leucine-H<sup>3</sup> to a significant extent. Concerning the latter, however, the results clearly suggest a tendency of HU towards depressing the process more than IMPY. The effect of the drugs on thymidine incorporation is reversible. The results demonstrate again that drastic inhibition of DNA synthesis during the a proper time in development causes virtual suppression of DNA puffs. These are not only accompanied by extra DNA synthesis; their development, differently from what happens with RNA puffs, depends on it. If enough DNA synthesis is allowed to occur, the DNA puffs are formed, although smaller. Injection of HU and IMPY at a time close to that of DNA puff expansion does not inhibit expansion and does not cause compaction. This indicates that the process of DNA synthesis is not a general condition for the puffs, once open, to remain open. Nonwithstadding this

general observation, IMPY may affect differently different puffs.

The flies which result from larvae treated by IMPY at the critical time also show abnormalities, several in nature and severity. Extensive inhibition of DNA synthesis at a critical time should affect directly the development of the tissues that will form the organs of the adult.

C O N C L U S Õ E S

1. Administrado durante um período crítico do 4º estágio de B.hygida, o IMPY provoca forte inibição ou virtual supressão do desenvolvimento de todos os pufes de DNA. É durante esse período que deve iniciar-se a síntese de DNA adicional desses pufes.
2. O programa de formação de pufes de RNA não parece alterar-se com o tratamento. O efeito é seletivo para pufes de DNA.
3. Administrado fora do intervalo crítico, o IMPY resulta em pufes de DNA menores. A explicação mais simples desse fato é que, nessas condições, a síntese de DNA não é inibida durante todo o tempo em que ocorre síntese de DNA adicional; desde que se forme quantidade suficiente de DNA adicional, os pufes de DNA se formam, mesmo que menores.
4. O efeito do IMPY sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA são semelhantes aos da HU (SAUAIÁ, LAICINE e ALVES, 1971), quando se trata de injeção feita durante o tempo crítico. Administrado em idade mais próxima da de máxima abertura dos primeiros pufes de DNA, o IMPY pode afetar diferentemente pufes diferentes.
5. A administração do IMPY ou de HU em tempo próximo ao da abertura de pufes ou durante essa abertura, não provoca seu fechamento; a síntese de DNA não é, pois, condição universal para que os pufes de DNA abertos ou por abrir-se, se mantenham abertos ou venham a abrir-se.
6. O IMPY e a HU deprimem a incorporação de timidina tritiada na glândula salivar a menos de 10% durante mais de 21

horas e diminuem a incorporação de uridina tritiada a cerca de 80% pelo menos durante 9 horas. Quanto a incorporação de leucina, os efeitos parecem diferir: o IMPY parece não afetar o processo, enquanto a HU parece deprimi-lo a cerca de 80% durante pelo menos 21 horas.

7. As moscas resultantes de larvas tratadas com IMPY durante o tempo crítico apresentam, como as tratadas com HU (SAUAIA, LAICINE e ALVES, 1971) anomalias diversas em natureza e gravidade. Interpretamos esse efeito como devido à perturbação pelos inibidores do desenvolvimento dos tecidos larvais que entram na formação dos órgãos dos adultos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ALMEIDA, J.C. (1973) - Medida da incorporação de precursores radioativos em glândulas salivares de Bradysia hydida. Aplicação a células individuais. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP).
- AMABIS, J.M. (1974) - Induction of DNA synthesis in Rhynchosciara angelae salivary gland. Cell. differentiation, 3: 199.
- AMABIS, J.M. and CABRAL, D. (1970) - RNA and DNA puffs in polytene chromosomes of Rhynchosciara: inhibition by extirpation of prothorax. Science, 169: 692.
- AMABIS, J.M. and SIMÕES, L.C.G. (1971) - Puff induction and regression in Rhynchosciara angelae by the method of salivary gland implantation. Genética, 42: 404.
- ASHBURNER, M. (1970) - Function and structure of polytene chromosomes during insect development. Adv. Insect Physiol. 7: 2.
- ASHBURNER, M. (1972) - Puffing patterns in Drosophila Melanogaster and related species. in: Developmental Studies on Giant Chromosomes edited by Beermann, W. Springer-Verlag New York.

- BECKER, H.J. (1962) - Die puffs der speicheldrüsenchromosomen von Drosophila melanogaster. II. Die Auslösung der Puffbildung, ihre Spezifität und ihre Beziehung zur Funktion der Ringdrüse. Chromosoma, 13: 341.
- BEERMANN, W. (1952) - Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikation der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans. Chromosoma, 5: 139.
- BEERMANN, W. (1961) - Ein Balbiani Ring als Locus einer Speicheldrüsenmutation. Chromosoma, 12: 1.
- BEER, C.T.; KAJIWARA, K. and MUELLER, G.C. (1974) - Synchronization of HeLa cells with 2,3-dihydro-1-H-imidazo (1,2-b) pyrazole. Bioch. Pharmacol., 23: 1115.
- BERENDES, H.D. (1967) - The hormone ecdysone as effector of specific changes in the pattern of gene activities of Drosophila hydei. Chromosoma, 22: 274.
- BERENDES, H.D. (1972) - The control of puffing in Drosophila hydei. In: "Developmental Studies on Giant Chromosomes" edited by Beermann, W. Springer-Verlag New York.
- BERENDES, H.D. (1973) - Synthetic activity of polytene chromosomes. Int. Rev. of Cytol., 35: 61.



- BREUER, M.E. e PAVAN, C. (1952) - Gens na diferenciação. *Ciência e Cultura*, 3(4): 115.
- BREUER, M.E. and PAVAN, C. (1955) - Behaviour of polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae at different stages of development. *Chromosoma*, 7: 371.
- CLEVER, U. (1961) - Genaktivitäten in den riensenchromosomen von Chironomus tentans und ihre beziehungen zur entwicklung. I. Genaktivierungen durch ecdyson. *Chromosoma*, 12: 607.
- CLEVER, U. and KARLSON, P. (1960) - Induktion von puff-veränderungen in den speicheldrusenchromosomen von Chironomus tentans durch ecdyson. *Expl. Cell. Res.* 20: 623.
- CROUSE, H.V. (1968) - The role ecdysone in DNA-puff formation and DNA synthesis in the polytene chromosomes of Sciara coprophila. *Proc. Natn. Acad. Sci.* 61: 971.
- CROUSE, H.V. and KEYL, H.G. (1968) - Extra replications in the "DNA-puffs" of Sciara coprophila. *Chromosoma*, 25: 357.
- DA CUNHA, A.B.; PAVAN, C.; MORGANTE, J.S. and GARRIDO, M.C. (1969) - Studies on cytology and differentiation in *Sciariidae*. II. DNA redundancy in salivary gland cells of Hibociara fragilis (Diptera, *Sciariidae*). *Proc. Symp. Nuclear Physiology and Differentiation*. Belo Horizonte, Genetics, 61, Suppl. 1: 335.

- EDSTRON, J.E. and BEERMAN, W. (1962) - The base composition of nucleic acids in chromosomes, puffs, nucleoli and cytoplasm of Chironomus salivary gland cells. J. Cell Biol. 14: 371.
- ENNIS, H.L.; MOLLER, L.; WANG, J.J. and SELAWRY, D.S. (1971) - 2,3 dihydro-1H-imidazo (1,2-b) pyrazole. A new inhibitor of deoxyribonucleic acid synthesis. Bioch. Pharmacol., 20: 2639.
- FICQ, A. and PAVAN, C. (1957) - Autoradiography of polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae at different stages of development. Nature, Lond. 180: 983.
- GABRUSEWYCZ-GARCIA, N. (1964) - Cytological and autoradiographic studies in Sciara coprophila salivary chromosomes. Chromosoma, 15: 312.
- GABRUSEWYCZ-GARCIA, N. (1968) - RNA metabolism of polytene chromosomes of Sciara coprophila. J. Cell. Biol. 39: 49A.
- GABRUSEWYCZ-GARCIA, N. and MARGLES, S. (1969) - Induction of DNA puffs by edysterone. J. Cell. Biol. 43: 41A.
- GALE, G.R. (1964) - Effect of hydroxyurea on the incorporation of thymidine into Ehrlich Ascites tumour cells. Biochem. Pharmacol. 13: 1377.

- GERBI, S.A. (1971) - Localization and characterization of the ri bosomal RNA cistrons in Sciara coprophila. J. Mol. Biol. 58: 499.
- GOODMAN, R.M.; GOILD, J. and RICHART, R.M. (1967) - Larval development in Sciara coprophila without the formation of chromosomal puffs. Proc. Nat. Acad. Sci. 58: 553.
- GRAESMANN, A.; GRAESSMANN, M. and LARA, F.J.S. (1974) - Involvement of RNA in the process of puff induction in polytene chromosomes. in: Molecular Cytogenetics. Edited by B.A. Hamkalo and J. Papaconstantinou.
- GROSBACH, U. (1969) - Chromosome-aktivität und biochemische zell-differenzierung in der speicheldrüse von Camptochironomus. Chromosoma, 28: 136.
- LAICINE, E.M. (1972) - Efeito da inibição da síntese do DNA na glândula salivar de Bradysia hygida. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Tese de Doutorado.
- LAMBERT, B. (1973) - Tracing of RNA from a puff in the polytene chromosome to the cytoplasm in Chironomus tentans salivary gland cells. Nature, 242: 51.
- LAMBERT, B.; WIESLANDER, L.; DANHOLT, B.; EGYHAZI, E. and RINGBORG, U. (1972) - In situ demonstration of DNA hybridizing with chromosomal and nuclear sap RNA in Chironomus tentans. J. Cell. Biol. 53: 407.

- LISON, L. (1958) - Statistique appliquée a la biologie experimentale. Gauthier-Villars Editeur-Imprinaeur-Libraire. Paris.
- MACHADO SANTELLI, G.M. (1973) - Aspectos da fisiologia de cromosomos politênicos de glândula salivar de Rhynchosciara angelae, no do 4º estágio larval. Tese de Doutorado. Inst. de Biociências da Universidade de São Paulo.
- MENECHINI, R.; ARMELIN, H.A.; BALSÁMO, J. and LARA, F.J.S. (1971) - Indication of gene amplification in Rhynchosciara by RNA-DNA hybridization. J. Cell. Biol. 49: 913.
- PARDUE, M.L.; GERBI, S.A.; ECKHHARDT, R. and GALL, J.G. (1970) - Cytological localization of DNA complementary to robosomal RNA in polytene chromosomal of diptera. Chromosoma, 29: 268.
- PAVAN, C. and BREUER, M.E. (1952) - Polytene chromosomes in different tissues of Rhynchosciara angelae. J. Hered. 43: 150.
- PAVAN, C. and DA CUNHA, A.B. (1969a) - Chromosomal activities in Rhynchosciara and other Sciaridae. A. Rev. Genetics, 3: 425.
- PAVAN, C. and DA CUNHA, A.B. (1969b) - Gene amplification in otogeny and phylogeny of animals. Proc. Symp. Nuclear 289. Physiol and Differentiation. Belo Horizonte. Genetics 61, Suppl. 1, 335.

- PELLING, C. (1959) - Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of uridine labeled with tritium. *Nature, Lond.* 184: 655.
- PELLING, C. (1964) - Ribonucleinsäure-synthese der riensenchromosomen. Autoradiographische untersuchungen an Chironomus tentans. *Chromosoma*, 15: 71.
- PERONDINI, A.L.P. and DESSEN, E.M. (1969) - Heterozygous puffs in Sciara ocellaris. Proc. Symp. Nuclear Physiology and Differentiation. Belo Horizonte. Genetics, 61. Suppl. 1: 251.
- POULSON, D. and METZ, C.W. (1938) - Studies on the structure of nucleolus forming regions and related structures in the giant salivary gland chromosomes of Diptera. *J. Morph.* 63: 363.
- RASCH, E.M. (1970) - Two-wavelength cytophotometry of Sciara salivary gland chromosomes. in: Introduction to Quantitative Cytochemistry-II Ed. Wied and Bahr. Acad. Press.
- RASH, E.M. and RASH, R.W. (1967) - Extra desoxyribonucleic acid synthesis at specific sites of Sciara salivary gland chromosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 15: 793.
- RASH, E.M. and PETIT, B.J. (1967) - Nucleoprotein metabolism in salivary gland chromosomes of Sciara during pupation. *J. Cell. Biol.* 35: 110.

- RASH, E.M. and LEWIS, A.L. (1968) - Effects of cortisone, gibberellic acid and starvation on puffing patterns in polytene chromosomes of Sciara. J. Histochem. Cytochem. 16: 508.
- ROSENKRANZ, H.S. and LEVY, S.A. (1965) - Hydroxyurea a specific inhibitor of DNA synthesis. Biochim. Biophys. Acta 95: 181.
- RUDKIN, G.T. and CORLETTE, S.L. (1957) - Disproportionate synthesis of DNA in a polytene chromosome region. Proc. Natn. Acad. Sci. 43: 964.
- SAUAIA, H. (1971) - Cromossomas politênicos de Bradysia hygida. Inibição do desenvolvimento dos pufes de DNA pela hidroxiluréia. Tese de Doutorado. Fac. Med. Ribeirão Preto.
- SAUAIA, H.; LAICINE, E.M. and ALVES, M.A.R. (1971) - Hydroxyurea inhibition of DNA puff development in the salivary gland chromosomes of Bradysia hygida. Chromosoma, 34: 129.
- SNEDOCOR, G.W. and COCHRAN, W.G. (1972) - Statistical methods. Sixth edition. The Iowa State College Press, Ames, Iowa.
- STEVENS, B.J. and SWIFT, H. (1966) - RNA transport from the nucleus to cytoplasm in Chironomus salivary glands. J. Cell. Biol. 31: 55.

- STOCKER, A.J. and PAVAN, C. (1974) - The influence of ecdysterone on gene amplification, DNA synthesis and puff formation in the salivary gland chromosomes of Rhynchosciara hollaenderi. Chromosoma, 45: 295.
- SUSS, R. and MAURER, H.R. (1968) - Reduced binding of carcinogenic hydrocarbons to DNA of mouse skin during inhibition of DNA synthesis. Nature, 217: 752.
- SWINDLEHURST, M.; BERRY, S.J. and FIRSHEIN, W. (1971) - The biosynthesis of DNA by insects. III. Ribonucleotide reductase activity and the effect of hydroxyurea during the adult development of the cecropia silkworm. Biochim. Biophys. Acta, 228: 313.
- TISSIERES, A.; MITCHELL, H.K. and TRACY, U.M. (1974) - Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. 84: 389.
- WHITTEN, J.M. (1965) - Differential desoxyribonucleic acid replication in the giant foot-pad cells of Sarcophaga bullata. Nature, 208: 1019.
- YOUNG, C.W. and HODAS, G. (1964) - Hydroxyurea: inhibitory effect on DNA metabolism. Science, 146: 1172.

A P Ê N D I C E



TABELA 1

Efeito do IMPY e da HU sobre a incorporação de timidina tritiada na glândula salivar de B. hvidta. As larvas receberam a injeção do inibidor na idade m3 e o precursor vários tempos depois: 15 minutos, 2,7,21, 28 e 37 horas. O tempo de incorporação foi sempre de 2 horas. Cada dado representa a leitura por par de glândulas e a média dos resultados está acompanhada do erro padrão. Os números colocados entre parênteses, abaixo da média, corresponde à percentagem em relação ao controle.

Tempo após injeção & Ex-perimento	Natureza da injeção		Tempo após injeção & Ex-perimento		Natureza da injeção	
	Água c.p.m	IMPY c.p.m	Água c.p.m	IMPY c.p.m	Água c.p.m	IMPY c.p.m
15 min	41.100	3.526	46.200	2.637	4.971	2.971
	23.000	2.314	37.000	2.461	4.181	2.077
	25.914	1.671	48.095	1.020	3.180	4.181
	29.500	1.104	23.071	1.534	2.918	3.221
	19.766	4.107	48.025	3.366	2.643	3.461
	1.847	1.690		2.715		
médias	27.856±3.691	2.312±303 (8,3%)	39.075±4.280	3.213±290 (8,2%)	3.776±299 (9,7%)	2.971
2 horas	30.000	1.241	28.000	1.089	60	22
	27.333	1.233	27.325	1.007	22	22
	24.205	1.091	20.527	1.230	93	93
	19.378	1.059	18.630	1.630	68	68
	17.320	885	11.495	1.003	40	40
	16.940	861	9.194	914	20	20
	11.453					
	10.543					
médias	19.650±2.510	1.102±65 (5,6%)	18.628±3.618	1.022±60 (5,5%)	565±110 (3,0%)	47
7 horas	10.500	707	27.016	365	60	60
	20.987	521	20.325	413	50	50
	15.490	559	16.780	523	50	50
	17.030	408	16.630	202	30	30
		468				
	673					
médias	16.002±2.169	578±47 (3,6%)	20.107±2.431	377±67 (1,8%)	5.072±70 (2,5%)	50
		565±77 (3,5%)				

Continuação da Tabela 1

Tempo após a injeção	Ex- peri- mento	Maturação da Injeção		Tempo após a injeção	Ex- peri- mento	Maturação da Injeção	
		Água c.p.m	INPY c.p.m			Água c.p.m	INPY c.p.m
21 horas	a	14.750	902	8.390	b	1.250	881
		5.400	920	463		773	773
		20.750	430	17.610		1.112	1.112
		5.650	853	7.833		678	678
	médias	11.650±3.727	795±74 (6,8%)	2.772	médias	955±169 (10,4%)	699±93 (7,6%)
28 horas	a	734	408	1.339	b	2.771	1.642
		1.378	728	1.335		704	964
		537	817	1.068		544	964
		663	360	1.380		1.380	1.123
	médias	799±109	539±120 (85,0%)	1.174	médias	1.303±301 (107,0%)	1.190±153 (97,0%)
37 horas	a	990	312	641	b	1.778	820
		589	503	946		1.265	1.510
		519	549	1.370		945	1.400
		492	837	830		939	1.357
	médias	648±116	624±96 (96,3%)	947±154	médias	1.170±133 (124,0%)	1.198±79 (126,6%)

TABELA 2

Efeito do IMPY e da HU sobre a incorporação de timidina tritiada na glândula salivar de B. hygida. As larvas receberam a injeção do inibidor na idade m7 e o precursor 17 horas depois. O tempo de incorporação foi de 2 horas. Cada dado representa a leitura por par de glândulas e a média dos resultados está acompanhada do erro padrão. Os números colocados entre parênteses, abaixo da média, corresponde a porcentagem em relação ao controle.

Experimento	Água c.p.m	IMPY c.p.n	HU c.p.m
	1.689	-	483
	738	474	347
	752	351	275
	1.429	428	286
1	2.376	471	342
	2.178	448	291
	1.915	440	324
	1.610	-	323
	980	-	-
	-	-	316
Médias:	1.518 <sup>±</sup> 199	435 <sup>±</sup> 18 (28,7%)	331 <sup>±</sup> 18 (21,88%)

Efeito do IMPY e da HU sobre a incorporação de uridina tritiada na gîndula salivær de B. byæidæ. As lêes receberam a injeção do inibidor na idade m3 e o precursor vários tempos depois: 2, 7, 12 e 21 horas. O tempo de incorporação foi sempre de 2 horas. Cada dado representa a leitura por par de gîndulas e a média dos resultados está acompanhada do erro padrão. Os números colocados entre parênteses, abaixo da média, corresponde à porcentagem em relação ao controle.

Tempo após a injeção	Ex-perimento	Natureza da injeção		Tempo após a injeção	Ex-perimento	Natureza da injeção			
		Agua c.p.m	IMPY c.p.m			Agua c.p.m	IMPY c.p.m		
2 horas	médias	3.821	8.325	2 horas	b	4.571	3.921	3.509	3.509
		7.377	3.532			3.101	2.710	4.866	
		4.500	5.232			5.800	3.808	3.757	
		5.951	3.508			4.510	3.508	3.604	
		5.009	4.410			3.149	2.669	3.973	
		5.710	3.098			4.331	3.472	3.000	
		5.361	3.521			3.800	2.871	2.811	
		5.524	4.047			3.393		2.677±68	
		5.408±373	4.547±580			3.644±207		(76,0%)	
			(84,0%)					(77,3%)	
7 horas	médias	6.965	7.016	7 horas	b	4.570	2.744	2.052	2.052
		7.289	4.550			3.374	3.578	4.866	
		7.100	6.700			3.648	2.746	3.757	
		8.584	6.023			5.274	2.436	3.604	
		6.668	6.026			5.090	3.690	3.973	
		7.631	4.454					2.000	
		7.628	3.011					2.811	
		7.400±238	6.044±443			4.587±455		2.841±324	
			(81,4%)					(68,1%)	
								(77,3%)	
12 horas	médias	2.751	3.018	12 horas	b	2.955	2.405	2.753	2.753
		4.359	2.135			7.042	3.593	4.077	
		1.728	4.588			1.070	3.247	2.739	
		3.478	2.047			2.270	4.487	4.205	
		2.427	2.490			4.454	2.663	2.725	
			2.110			2.101	4.840	3.436	
			3.935						
			2.233						
		2.920±374	6.044±443			3.453±016		3.441±360	
			(81,4%)					(96,5%)	
				(96,5%)					
21 horas	médias	5.310	3.713	21 horas	b	2.744	1.557	3.457	3.457
		3.052	3.732			2.206	3.372	1.959	
		5.218	3.398			1.777	2.351	1.744	
		3.216	3.597			7.057	961	1.913	
		4.839	4.045			1.450	1.696	1.584	
		4.014	4.998			1.618	904		
		4.121	3.802						
		4.047	4.121						
		3.436	4.602						
		4.164	5.246						
4.650	4.594								
2.948±452	2.914±220	1.882±228		1.773±395					
	(99,0%)			(94,7%)					
				(102,1%)					
4.157±317	4.010±206								
	(96,4%)								

Efeito do IMPY e da HU sobre a incorporação de leucina tritiada na glândula salivar de *B. hyrida*. As lares receberam a injeção do inibidor na idade m3 e o precursor <sup>3</sup>H vários tempos depois: 2, 12 e 21 horas. O tempo de incorporação foi sempre de 2 horas. Cada dado representa a leitura por par de glândulas e o dia dos resultados está acompanhado do erro padrão. Os números colocados entre parênteses, abaixo de cada dia, correspondem à porcentagem em relação ao controle.

Tempo após a injeção	Ex- perimento	Natureza da injeção		HU C.P.M.	Tempo após a injeção	Ex- perimento	Natureza da injeção		IMPY C.P.M.	HU C.P.M.
		Aqua C.P.M.	IMPY C.P.M.				Aqua C.P.M.	IMPY C.P.M.		
2 horas	•	21.394±3.498 (98,0%)	20.970±2.051 (98,0%)	23.642	b	12.100	12.579±1.147	12.050±332 (93,5%)	11.921	12.214
				17.670					10.342	9.686
				21.920					12.707	11.360
				19.468					16.860	12.751
				34.710					18.428	12.530
12 horas	•	21.394±3.498 (98,0%)	20.257±914 (94,7%)	5.796	b	7.445	9.588	9.070±261 (112,0%)	11.117	11.146
				6.444					9.594	5.955
				6.296					7.914	6.780
				4.960					10.840	8.500
				5.490					6.330	6.690
21 horas	•	7.292±598 (84,3%)	6.148±526 (84,3%)	5.624±216 (77,0%)	módimo	8.783±652	9.070±261 (112,0%)	9.070±261 (112,0%)	10.568	7.411±213 (84,6%)
				5.306					10.568	9.133
				7.445					8.315	7.139
				6.356					10.800	4.223
				8.145					9.238	8.905
21 horas	•	7.029±556 (106,0%)	7.509±447 (106,0%)	5.984±845 (85,0%)	módimo	9.012±1.195	9.080±266 (100,7%)	9.080±266 (100,7%)	12.769	7.380±348 (81,6%)
				8.200					11.013	5.121
				8.568					5.181	8.568
				6.357					11.013	10.820
				6.408					4.912	12.769