JULYANE BATISTA CHAVES

CARACTERIZAÇÃO DOS CICLOS REPLICATIVOS NAS
CÉLULAS FOLICULARES E NUTRIDORAS NO OVÁRIO
DE *RHYNCHOSCIARA AMERICANA* E PERFIL DE
EXPRESSÃO DE CICLINAS A E B

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli

Versão Original

SÃO PAULO
2017

RESUMO

Chaves JB. Caracterização dos ciclos replicativos nas células foliculares e nutridoras no ovário de *Rhynchosciara americana* e perfil de expressão de ciclinas A e B. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O estudo do díptero *Rhynchosciara americana* forneceu informações importantes sobre a biologia cromossômica, por apresentar cromossomos politênicos e amplificação gênica em diferentes órgãos. Dentre os órgãos que apresentam especializações do ciclo celular, o ovário é um dos mais interessantes, possuindo características únicas, como o desenvolvimento sincrônico dos folículos ovarianos e o fato de apresentar uma única e gigante célula nutridora conectada ao ovócito através de um canal citoplasmático. Une em si: meiose no ovócito, célula nutridora com poliploidia seguido de politenia e células foliculares com mitose. Células poliplóides e politênicas possuem cópias extras de DNA genômico através de repetidos ciclos de fase S sem que ocorra a divisão celular, um processo denominado endoreplicação. Os ciclos celulares, são dirigidos pela oscilação da ativação de complexos ciclina/Cdk. Estudos mostraram que a ciclina A atua em células endoreplicativas em *Drosophila* e a ciclina B inibe ciclos endoreplicativos induzindo a divisão celular. Torna-se relevante investigar a associação dessas moléculas reguladoras do ciclo celular com os ciclos endoreplicativos que ocorrem na ovogênese de *R. americana*. Perfis de expressão das ciclinas A e B foram detectados nos ovários por RT-PCR ao longo do desenvolvimento. Ensaio de incorporação do nucleosídeo timidina mostraram elevada atividade proliferativa das células foliculares para formar o folículo e o fim da atividade endoreplicativa nas células nutridoras em pupas de 4 dias. Preparações de imunolocalização proteica em ovários na fase de pupa revelaram acúmulo de ciclina A no citoplasma das células nutridoras e dos ovócitos, e acúmulo de ciclina B no citoplasma e na vesícula germinal do ovócito, atuando nos mecanismos meióticos. O estudo de proteínas relacionadas ao ciclo celular nesse modelo é importante para um melhor entendimento dos ciclos celulares incomuns presentes em diferentes órgãos de insetos.

Palavras-chave: Ciclinas. Endoreplicação. Ovário. Célula nutridora. *Rhynchosciara americana*

ABSTRACT

Chaves JB. Characterization of replicative cycles in follicle and nurse cells in ovary of *Rhynchosciara americana* and expression profile of cyclins A and B. [Master thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Study of the diptera *Rhynchosciara americana* has provided important information about chromosome biology, for it displays polytene chromosomes and gene amplification in different organs. Among the organs that possess cell cycle specializations, the ovary is one of the most interesting ones, showing unique characteristics, such as the synchronous development of follicles and the presence of a single giant nurse cell connected to the oocyte through a cytoplasmic channel. This organ gathers: meiosis in the oocyte, nurse cell with polyploidy followed by polyteny, and follicle cells in mitosis. Polyploid and polytene cells have extra copies of genomic DNA obtained via sequential cycles of S phase not followed by cell division, a process called endoreplication. Cell cycles are driven by the oscillation in the activation of different cyclin/CDK complexes. Studies have shown that Cyclin A acts in endoreplicating cells in *Drosophila* and Cyclin B inhibits endoreplicative cycles, inducing cell division. Thus, it is relevant to investigate the association between these cell cycle-regulating proteins and the endoreplication cycles that occur during the oogenesis of *R. americana*. Expression profiles of cyclins A and B were evaluated in the ovary via RT-PCR throughout the development. Thymidine nucleoside incorporation assays showed high proliferative activity in follicle cells to build the follicle and the end of endoreplicative activity in nurse cells of 4-day-old pupae. Protein immunolocalization in ovary at the stage of pupa has shown accumulation of Cyclin A in the cytoplasm of nurse cells and oocytes, and accumulation of Cyclin B in the cytoplasm and germinal vesicle of the oocyte, acting on meiosis mechanisms. The study of proteins related to cell cycle in this model is important for a better understanding of uncommon cell cycle in different insect organ.

Keywords: Cyclins. Endoreplication. Ovary. Nurse cell. *Rhynchosciara americana*

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIPTEROS COMO UM MODELO

Os insetos constituem um excelente material para o estudo da fisiologia e genética, por possuírem grande diversidade durante seu desenvolvimento (Zhimulev et al., 2004).

Uma grande variedade de órgãos e linhagens celulares de insetos têm sido importantes modelos de pesquisa, a maioria dos quais representa espécies da ordem Lepidoptera e Diptera. Os órgãos de insetos utilizados com sucesso em estudos científicos incluem: ovário, embrião, glândula salivar, corpo gorduroso, disco imaginal, sistema endócrino e nervoso, epitélio intestinal e cuticular, e neonato (Lynn, 2001).

Entre os insetos, os dípteros têm sido mais estudados e forneceram informações importantes sobre processos biológicos, como a organização nuclear, biologia cromossômica, amplificação gênica e transcrição de genes amplificados, determinação do sexo, imunidade a insetos, manutenção de telômeros, ovogênese e desenvolvimento embrionário, remodelação de tecidos, morte celular programada e identificação de fatores que são necessários para estabilizar e manter células-tronco (Morrison, Spradling 2008; Brandão et al., 2014; Simon et al., 2016).

Em particular, a espécie *Rhynchosciara americana* apresenta peculiaridades que lhes renderam notoriedade, como o fato de apresentarem em diferentes tecidos cromossomos politênicos maiores do que os encontrados em outros dípteros, ter sido o primeiro organismo em que foi evidenciado o fenômeno de amplificação gênica em determinados períodos do desenvolvimento dando origem aos pufes de DNA, apresentar uma associação mais evidente entre a biologia morfológica e molecular, e apresentar desenvolvimento sincronizado entre indivíduos irmãos (Breuer, Pavan, 1955; Guevara, Basile, 1973; Machado-Santelli, Basile, 1975).

1.2 *RHYNCHOSCIARA AMERICANA*

R. americana pertence à família *Sciaridae* e foi descrita pela primeira vez em 1821, por Christian Wiedemann (Wiedemann, 1821¹ apud Breuer, 1969). Em 1951, Nonato e Pavan descreveram a mesma espécie como *Rhynchosciara angelae* (Nonato, Pavan, 1951). Somente em 1969, a classificação do gênero *Rhynchosciara* foi revisada por Martha Breuer e mostrou sinonímia entre as espécies *R. americana* e *R. angelae*, prevalecendo então a nomenclatura mais antiga dada por Wiedemann (Breuer, 1969).

1.3 CICLO DE VIDA

R. americana apresenta um ciclo de vida em torno de 70 dias e seu desenvolvimento holometábolo é sincrônico entre os indivíduos irmãos, desde a postura dos ovos, passando pela metamorfose na fase de pupa até a emergência dos adultos (Figura 1). E em cada grupo, todos os indivíduos irmãos estão no mesmo estágio do desenvolvimento e são todos do mesmo sexo (Pavan, Da Cunha, 1969).

A fêmea copula somente uma vez e faz uma única ovoposição de centenas de ovos, que após cerca de treze dias eclodem larvas simultaneamente.

O desenvolvimento larval ocupa grande parte da vida do inseto, sendo dividido em quatro estágios, e dos quatro estágios do ciclo de vida larval, o quarto (último estágio) é o mais longo, sendo subdividido em seis períodos, de acordo com modificações fisiológicas e comportamentais da larva (Terra et al., 1973).

No primeiro período, as larvas são pequenas e apresentam uma coloração clara. No segundo período, as crescem e adquirem uma coloração vermelha, devido ao aparecimento da pigmentação da hemolinfa - nesses dois primeiros períodos as larvas rastejam e se alimentam ativamente. No terceiro período, as larvas são menos ativas, elas param de se alimentar e começam a secretar proteínas do casulo comunal, formando uma tênue rede delicada que progressivamente torna-se mais compacta que recobre todos os indivíduos (razão pela qual também chamamos esse período de início de rede). No quarto período, nota-se modificação do casulo, que apresenta uma consistência mais firme, porém ainda maleável e as larvas estão quietas em posição curva - esse período é caracterizado pelo início da amplificação do pufe de DNA na região 2 do cromossomo B (pufe B2) da glândula salivar. Já no

¹ Wiedemann CRM. Diptera exótica, 1821.

quinto período, há a expansão máxima do pufe B e início da expansão do pufe de DNA na região 3 do cromossomo C (pufe C3) da glândula salivar. E no sexto período, há a expansão máxima do pufe C3, e as larvas estão individualizadas em celas na posição ereta no casulo comunal, que apresenta uma consistência rígida. Os períodos da construção do casulo comunal são bem definidos e também podem ser correlacionados com mudanças na morfologia das larvas (Pavan, Da Cunha, 1969; Terra et al., 1973).

No início da fase de pupa, os indivíduos permanecem imóveis no casulo e iniciam alterações morfológicas durante a metamorfose, tais como a histólise completa da glândula salivar e remodelação do corpo gorduroso através do processo de autofagia (Brandão et al., 2014). Após um período de 8 a 10 dias de metamorfose, as moscas emergem do casulo comunal sexualmente maduras, elas apresentam probóscide, um aparelho bucal sugador e se alimentam de soluções açucaradas. O seu tempo de vida dura em média, somente cinco dias.

Figura 1- Ciclo de vida da *R. americana*, da postura dos ovos até a fase de mosca. A fase larval é dividida em 4 estágios e o 4º estágio é subdividido em 6 períodos. No 1º e 2º período as larvas são errantes e se alimentam. O 3º período caracteriza-se pelo início de rede, quando se inicia a secreção do casulo. O 4º e 5º período são marcados pela presença dos pufes B2 e C3. E o 6º período as larvas estão individualizadas no casulo e tornam-se pupa. Em seguida, a pupa metamorfoseia em mosca adulta. Fonte: Neves, 2016.

1.4 CROMOSSOMOS POLITÊNICOS E GLÂNDULA SALIVAR

Os cromossomos politênicos foram descritos pela primeira vez por Balbiani em 1881 nas células de glândulas salivares de larvas de uma espécie de díptero, o *Chironomus plumosus*, como um cordão contínuo espiralado que preenchia o núcleo (Bauer, Beermann, 1952). Em 1993, grupos de pesquisadores, usando o método “squashing”, evidenciaram sua estrutura multifilamentosa, o que originou a denominação de cromossomos politênicos (Zhimulev et al., 2004).

Estudos de dípteros tiveram importante contribuição no desenvolvimento da citogenética, depois da publicação de trabalhos descrevendo os cromossomos politênicos das glândulas salivares de larvas de *Bibio*, *Chironomus*, *Drosophila* e *Rhynchosciara*. Esses cromossomos eram pelo menos 100 vezes maiores do que os cromossomos metafásicos e tornaram-se um dos mais importantes modelos para a investigação genética (Stormo, Fox, 2017).

Cromossomos politênicos são cromossomos longos e largos, permanecendo intimamente pareados com seu homólogo, com pouca ou nenhuma separação visível entre as cromátides e apresentam um padrão intercalado de bandas e interbandas específico para cada cromossomo da espécie (Lefevre, 1971).

São formados por meio de um processo chamado endociclo e ocorrem em células que sofrem replicações sucessivas do genoma, alternando as fases G e S do ciclo celular e suprimindo a divisão mitótica. As múltiplas cópias das cromátides permanecem unidas, formando assim os cromossomos politênicos, que se comportam como um só elemento (Calvi et al., 2013).

Em *R. americana* os cromossomos politênicos são encontrados em diferentes órgãos, como nas glândulas salivares, túbulos de Malpighi, intestino, vesícula seminal e ovários, e o padrão de bandejamento permanece igual em quase todos os tecidos permitindo estudos comparativos (Dreyfus et al., 1951; Pavan, Breuer, 1952; Guevara, Basile, 1973).

As glândulas salivares apresentam os cromossomos politênicos maiores, menos compactados e atingem o máximo tamanho durante o sexto período larval, permitindo uma análise mais aprofundada e por isso, foram mais amplamente estudados (Pavan, 1965). A dimensão dos cromossomos politênicos nesta espécie, proporciona condições extremamente favoráveis para uma análise morfológica e

citológica de qualidade, o que levou a descobertas importantes sobre ativação de genes (Fique, Pavan, 1957).

A glândula salivar de *R. americana* é um órgão de grandes proporções na larva, podendo atingir uma vez e meia o seu comprimento. Ela é ligada à parte inicial do tubo digestivo por ductos salivares e pode-se distinguir morfológica e citologicamente em três regiões: proximal ou S1, mediana ou S2 e a distal ou S3 (Figura 2), contendo respectivamente cerca de 50, 200 e 60 células (Dreyfus et al., 1951; Pavan, 1965). Essas regiões podem ser facilmente distintas uma das outras pela distribuição das células: em S1, as células são grandes e cubóides, e estão alinhadas paralelamente com um lúmen regular no centro da glândula; em S2 as células são menores e não estão alinhadas, e o lúmen é irregular; e S3 as células estão distribuídas alternadamente (Brandão et al., 2014).

Figura 2- Glândula salivar de *R. americana* corada com orceína acética. Notar as divisões da glândula em três secções, delimitadas pela organização das células.
Fonte: Machado-Santelli, 2011.

Nessas células pode-se observar além da politenização dos cromossomos, o processo de amplificação gênica, em que algumas bandas cromossômicas específicas são excessivamente replicadas. O momento em que as larvas começam a secretar o casulo coincide com o último ciclo de replicação, que corresponde à fase de grande atividade gênica na glândula salivar como pode ser observado pelo

aumento de determinadas bandas, originando os pufes de DNA nos seus cromossomos. (Breuer, Pavan, 1955; Guevara, Basile, 1973).

Além dos pufes de RNA, ou de expressão, que ocorrem normalmente em cromossomos politênicos, observa-se em *R. americana* os chamados pufes de DNA, em que há síntese localizada de DNA e transcrição dessas regiões genômicas. E pela primeira vez evidenciou-se que o conteúdo genômico de uma célula poderia ser modificada naturalmente em determinados períodos do desenvolvimento dessa espécie (Breuer, Pavan, 1955; Pavan, 1965).

Essa síntese extra de DNA pode ser interpretada como uma adaptação para a produção de mais genes no local onde uma abundante síntese de RNA é requerida (Pavan, Da Cunha, 1969).

Durante o período de construção do casulo notam-se amplificação e expansão dos pufes de DNA descritos em *R. americana*, os pufes da região 2 do cromossomo B (B2), da região 3 do cromossomo C (C3) e da região 8 do cromossomo (C8) e relacionam-se esses pufes a genes codificantes de peptídeos estruturais secretados para a construção do casulo comunal, importante para uma metamorfose bem-sucedida (Winter et al., 1977; Penalva et al., 1997; Santelli et al., 2004). Ver figura 3 e 4.

Stocker e Pavan (1974), descreveram que o hormônio ecdisona é responsável por alterações nos padrões de amplificação dos pufes A ocorrência da amplificação gênica que formam os pufes de DNA, coincide com as mudanças morfológicas no casulo comunal, alterando-o de uma tênue rede delicada a uma estrutura rígida. Essas alterações são reguladas de acordo com concentrações do hormônio ecdisona, portanto, são regulados ao longo do desenvolvimento (Stocker et al., 1984).

É interessante notar que o desenvolvimento dessa espécie é acompanhado por características morfológicas e citológicas, e a glândula salivar é usada como parâmetro para a confirmação dos eventos, usando a progressão e regressão dos pufes de DNA B2 e C3 que ocorrem em momentos específicos do desenvolvimento larval, como marcadores desse desenvolvimento (Machado-Santelli, Basile, 1978).

Figura 3 – Os 4 cromossomos politênicos de *R. americana* (A, B, C e X), com as suas respectivas secções. A diferenciação entre os cromossomos é feita analisando o padrão de bandeamento, características das extremidades e padrão de abertura dos pufes.
 Fonte: Stocker et al., 1993.

Figura 4 – Fotomicrografia dos 4 cromossomos politênicos de *R. americana* (A, B, C e X) corados com orceína acética. Notar a presença dos pufes de DNA. No cromossomo B a presença do pufe B2 e no cromossomo C, o pufe C3.
 Fonte: Chaves, 2017.

1.5 OVÁRIOS

Durante o desenvolvimento ovariano de *R. americana*, células germinativas primordiais diferenciam-se em células-tronco germinativas e após algumas divisões mitóticas tornam-se células germinativas (Rezende-Teixeira et al., 2012).

O último ciclo mitótico de células germinativas ocorre no início da vida larval dando origem a duas células com destinos diferentes, que se mantêm ligadas, mas se diferenciam: uma torna-se o ovócito I, que entra em meiose e permanece estacionado em prófase I, na subfase zigóteno, com quase nenhuma atividade transcricional; enquanto a outra irá se diferenciar em célula nutridora (Basile, 1979).

A célula nutridora sofre vários ciclos de poliploidização, em que há um aumento expressivo em seu volume, e após o término deste processo seus cromossomos sofrem o processo de politenia, passando a ser politênicos a partir do estágio de pupa intermediária (Figura 5). Durante este processo, o potencial transcricional da célula nutridora é aumentado e promove intensa síntese de ácidos nucleicos que contribuem para a homeostasia da célula (Casartelli, 1971; Basile, 1979).

Células foliculares primordiais inicialmente localizam-se na base de cada ovariolo, junto ao ovócito. Posteriormente, elas sofrem consecutivas mitoses e recobrem toda a superfície do conjunto “nutridora\ovócito”, formando o folículo (Basile, 1969).

Como o ovócito está praticamente inativo transcricionalmente, por estar parado em meiose, a célula nutridora assume funções, como síntese do vitelo, enriquecendo o citoplasma do ovócito com seu RNA mensageiro (Basile, 1979).

Existe comunicação entre elas, interligando estas duas células, através de um canal citoplasmático – *ring canal* - devendo contribuir para a transferência de material, entre célula nutridora e ovócito (Machado-Santelli, Santelli, 2000).

O tamanho do ovário aumenta rapidamente no estágio intermediário de pupa até o fim da pupação, e depois do aparecimento de cromossomos politênicos na célula nutridora. Neste estágio, o tamanho da célula nutridora aumenta pouquíssimo; a partir de então, pode-se verificar muitos grânulos de vitelo no citoplasma do ovócito. O ovário de uma mosca adulta ocupa aproximadamente 80% do volume de seu abdômen (Basile, 1969).

Figura 5 - Esquema da relação do tamanho entre células nutritora (NC) e ovócito (Oo) durante o desenvolvimento ovariano de *R. americana*. Os tamanhos são dados em micrômetros e correspondem ao valor médio da medição de 10 células durante cada fase (1 a 5). Notar o intenso crescimento do folículo após a fase de pupa intermediária, em que há o início da politenia nas células nutritoras (NC). Fonte: Basile, 1979.

Dentre os tecidos que apresentam especializações de ciclo celular, o ovário é um dos mais interessantes, pois reúne em si diferentes cenários: meiose no ovócito, célula nutritora com poliploidia e politenia; e células foliculares com mitose. Deste modo, um mesmo tecido apresenta todas as condições de ciclo celular comuns entre os sciarídeos, tornando-o um valioso objeto de estudo.

1.6 ENDOREPLICAÇÃO

O aumento da quantidade de DNA é uma estratégia usada durante o desenvolvimento tanto em plantas como em animais e bactérias. É obtido através de uma variação do ciclo celular - processo denominado endoreplicação, que resulta em células com cópias extras de DNA por meio de repetidos ciclos replicativos, resultando em poliploidia, politenia ou amplificação (Fox, Duronio, 2013).

Esse processo consiste em um desvio do ciclo celular canônico, com reinício da replicação do DNA mais de uma vez por ciclo celular. São períodos alternados de fase S (Síntese), durante a qual, a replicação do DNA acontece, e de fase G (*Gap*), quando as células estão metabolicamente ativas e se preparam para a próxima rodada de fase S, não completando ou até mesmo não iniciando a mitose, o que promove o acúmulo de DNA na célula (Edgar, Orr-Weaver, 2001).

As duas principais formas de endoreplicação foram descritas como endomitoses e endociclos. Células em endomitoses executam algumas características de mitoses, em que as células iniciam a mitose, promovendo a separação das cromátides-irmãs – gerando células poliplóides com alteração numérica cromossômica, em que o conteúdo genômico é múltiplo de N, mas as células não se dividem, seguido por subsequente reentrada na fase S. Células em endociclos não apresentam quaisquer características de mitose, mantendo as cromátides-irmãs firmemente pareadas – gerando células politênicas, em que o número de cópias do DNA aumenta sem aumentar o número de cromossomos propriamente (Calvi, 2013; Zielke et al., 2013). A figura 6 resume esses processos.

Figura 6- Ciclo celular e variações do ciclo celular. **(A)** O ciclo de divisão celular consiste em quatro fases distintas. O DNA é replicado durante a fase S e segregado para as células filhas durante a fase M. **(B)** A Endoreplicação pode ocorrer tanto por Endomitose, as células passam por G₁, S e G₂ com mitose parcial sem que ocorra citocinese, ou por Endociclo, em que ocorrem períodos alternados de fases G e S, sem que ocorra a divisão celular. Fonte: Adaptado de Fox, Duronio, 2013.

Além dos ciclos endoreplicativos, outra variante comum do ciclo celular ocorre em ciclos celulares embrionários, que são frequentemente muito rápidos e uma ou ambas as fases G podem ser ignoradas, ocorrendo períodos alternados de fase S e fase M (Edgar, Lehner, 1996).

Alguns tipos celulares de eucariotos promovem ciclos endoreplicativos em seu desenvolvimento normal, como por exemplo, nos mamíferos, os megacariócitos executam endomitoses, atingindo ploidia de até 128C, durante o processo de produção de plaquetas (Ravid et al., 2002). Os trofoblastos gigantes de mamíferos são encontrados na placenta, exploram seu tamanho para formar uma barreira entre os tecidos materno e embrionário, tornam-se altamente poliploides atingindo 512C e até 1000C *in vivo* (Barlow, Sherman, 1974; Lee et al., 2009). Em insetos, membros da ordem diptera, como a *Drosophila* e a *Rhynchosciara*, apresentam politenia na maioria dos tecidos, e poliploidia em alguns (Machado-Santelli, Santelli, 2000; Nordman e Orr-Weaver, 2012). E os níveis de ploidia de células diferenciadas de *Drosophila* variam de 16C para 1024C (Rodman, 1967). Graus variados de endociclos e endomitoses podem ocorrer no mesmo tecido, como por exemplo, é visto no ovário de *Rhynchosciara* (Basile, 1979).

Esses processos são frequentemente encontrados em células que são constitutivamente grandes ou altamente ativas metabolicamente, e proporcionam um suporte a funções celulares específicas, como uma maior eficiência na atividade dos genes (Edgar e Orr-Weaver, 2001; Fox, Duronio, 2013).

Entretanto, devido ao rígido controle de replicação e divisão celular, o processo de endoreplicação costuma estar relacionado a condições anormais de proliferação celular, contribuindo para instabilidade genômica, estresse oxidativo, contextos patológicos, abortos e oncogênese (Davoli, De Lange, 2011).

Com relação da regulação da endoreplicação, uma das características mais interessantes, é que as mesmas proteínas reguladoras que conduzem um típico ciclo de divisão celular, são usadas para gerar a progressão e manutenção dos ciclos endoreplicativos. Deste modo, ao menos dois eventos importantes devem ocorrer para converter um ciclo mitótico em um ciclo endoreplicativo: (1) a divisão celular deve ser suprimida; e (2) a atividade dos complexos ciclina/Cdk devem continuar a oscilar entre níveis baixos e altos, para o material genético ser reduplicado na ausência de divisão celular (Fox, Duronio, 2013).

1.7 CICLINAS

A progressão do ciclo celular pelas fases G_1 , S, G_2 e M está sob controle de um complexo ciclina/Cdk, que apresenta uma associação e ativação específica para cada fase do ciclo.

As Cdk's ou ciclina-dependente quinase são heterodímeros de uma família de proteínas serina/treonina quinases, que consistem de uma subunidade catalítica desse complexo. Essas quinases dependem da associação da subunidade reguladora, as ciclinas, necessária para sua atividade, como efetuar a fosforilação de diversos fatores que vão ativar mecanismos envolvidos com a progressão e manutenção do ciclo celular (Murray, 2004).

A expressão de Cdk's é constante, porém, a concentração de suas ciclinas regulatórias correspondentes oscilam durante o ciclo celular. O controle da entrada em diferentes fases do ciclo é determinado pelo acúmulo de complexos ciclina/Cdk respeitando a finalização das fases anteriores (Schafer, 1998).

No ciclo celular canônico, a sinalização em G_0 para início de G_1 está associada com a expressão das ciclinas D complexada com Cdk4 e a Cdk6. A entrada na fase S é determinada por ciclinaE/Cdk2, e progride sob o controle de complexos ciclina A/Cdk2, e a mitose é conduzida por Cdk1 e ciclinas mitóticas A e B (Murray, 2004).

A ativação dos complexos ciclinaD/Cdk4 e 6, promovem a transição de G_0 , e as células iniciam a fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb) promovendo o avanço do ciclo celular. Em G_1 tardio ocorre a ativação da Cdk2 pela ligação da ciclinas do tipo E. A ativação das Cdk's de G_1 inativa as proteínas Rb através da fosforilação, que por sua vez libera os fatores de transcrição E2F. Este promove a transcrição de genes que codificam proteínas que irão atuar na fase S, incluindo as ciclinas E e A. Posteriormente, a Cdk2 controla a entrada e progressão da fase S, em complexos com ciclina E e ciclina A, completando a fosforilação das proteínas Rb, e levando aumentos transcricionais de E2F. O desencadeamento e progressão da mitose depende das ciclinas A e B que ativam a Cdk1. O término da mitose requer a degradação das ciclinas mitóticas por APC/C (*Anaphase promoting complex/cyclosome*) via ubiquitinação e a ativação de proteínas Rb por fosfatases (Zielke et al., 2008; Song, Rape, 2011; Henley e Dick, 2012; Harashima et al., 2013).

As Cdk's estão sujeitas a um controle negativo por proteínas inibidoras (CKI, *cyclin-dependent kinase inhibitors*), que se ligam nos complexos ciclina/Cdk e bloqueiam a atividade catalítica. São divididas em duas classes principais: INK4 (*inhibitor of kinase 4*) e a CIP/KIP (*Cdk interacting protein/kinase inhibitory protein*). Os membros da família CIP/KIP não são seletivos e podem bloquear qualquer Cdk. Enquanto os membros do INK4 ligam-se apenas em Cdk4 e Cdk6 associadas com ciclinas do tipo D (Henley, Dick, 2012).

A progressão do ciclo celular é também controlada por *checkpoints* ou pontos de checagem distintos, com a função de impedir a progressão do ciclo celular sem que as etapas anteriores sejam concluídas adequadamente. Os principais *checkpoints* estão na entrada da fase S (G₁-S), na entrada da mitose (G₂-M), e o *checkpoint* mitótico que controla a progressão da anáfase (Tyson, 1999).

Os *checkpoints* são fundamentais para a manutenção da integridade das células, em particular do seu genoma, assegurando que o material genético tenha sido duplicado de maneira correta e não contenha erros. São constituídos por sensores moleculares que efetuam a ativação de moléculas, geralmente proteínas quinases ou fatores de transcrição que determinam o bloqueio da progressão do ciclo celular pelo desencadeamento de sinais inibidores à progressão do ciclo celular, até que estes estejam reparados.

O primeiro *checkpoint* G₁/S verifica condições favoráveis para a divisão, como o tamanho da célula, nutrientes suficientes, sinais moleculares positivos, como fatores de crescimento e a integridade do DNA, podendo entrar em um estado quiescente (G₀) até obter sinais positivos para iniciar o ciclo celular. Em G₂/M, é conferido o término do processo de replicação e a integridade do conteúdo de DNA, podendo inibir a entrada em mitose e promover um retorno à fase S para restauração do DNA. Se o dano for irreparável, a célula pode sofrer apoptose ou morte celular programada, assegurando que o DNA danificado não seja repassado para as células filhas. O *checkpoint* mitótico detecta se houve ligação correta do fuso mitótico aos cinetócoros dos cromossomos e alinhamento cromossômico na placa metafásica, podendo bloquear a mitose na transição entre metáfase e anáfase (Elledge, 1996).

Células com dano no DNA ou replicação incompleta são impedidas de iniciar a mitose, através da inativação da Cdk1 até o reparo ou o término da replicação. Caso os erros encontrados nos *checkpoints* sejam irreparáveis, as células não

progridem no ciclo, sendo destinadas para apoptose, evitando assim a propagação de lesões ou ainda de DNA incompletamente replicado às células filhas (Murray, 2004).

Entretanto em ciclos endoreplicativos, as células parecem resistir alguns desses mecanismos de controle do ciclo celular sem serem direcionadas para a apoptose. Existem mecanismos responsáveis para garantir que o genoma seja replicado uma vez por ciclo celular (Elledge, 1996). Porém, de algum modo pouco esclarecido, as células endoreplicativas simplificaram a maquinaria de regulação do ciclo celular, sugerindo que o *checkpoint* que regula o número de cópias apropriado na célula, esteja inativo em células endoreplicativas (Lilly, Spradling, 1996).

Além disso, células endoreplicativas, são incapazes de induzir a apoptose, devido a incapacidade de expressar genes apoptóticos, que normalmente seriam expressos em células mitóticas após um efeito genotóxico sobre o material genético, sugerindo que promotores de genes apoptóticos estariam silenciados nessas células (Mehrotra et al., 2008).

Os ciclos endoreplicativos também estão sob controle de complexos ciclinas/Cdks. Em *Drosophila*, ciclina E/Cdk2 é o principal complexo necessário para entrada na fase S e progressão dos ciclos endoreplicativos. Foi mostrado que a oscilação da atividade de ciclina E/Cdk2 gera ciclos replicativos sucessivos, e que em mutantes sem ciclina E a síntese de DNA é bloqueada e não há ciclos endoreplicativos (Knoblich et al., 1994; Follette et al., 1998; Sallé et al., 2012). Similarmente, a remoção específica de Cdk2, bloqueia os endociclos em glândulas salivares e ovários (Zielke et al., 2013).

Em células endoreplicativas de *Drosophila*, foi constatada a participação de ciclina E/Cdk2 na amplificação dos genes coriônicos (Lilly, Spradling, 1996). A superexpressão da ciclina E induziu a replicação do DNA em células endoreplicativas e aumentou a ploidia dos megacariócitos de camundongos (Britton, Edgar, 1998; Eliades et al., 2010). Esses dados mostram que ciclina E/Cdk2 é essencial em moscas e mamíferos para a execução das fases S em ciclos endoreplicativos.

Embora por muito tempo tenha sido dado um grande enfoque à participação da ciclina E, até sido considerada a ciclina mais relevante para a progressão da endoreplicação, pois os ciclos endoreplicativos são regulados primariamente por uma oscilação do complexo ciclina E/Cdk2, necessária para um correto licenciamento das origens de replicação (Lilly, Duronio, 2005), estudos mostram que a ciclina E não é a única ciclina atuando em células endoreplicativas.

Em *Drosophila*, a ciclina A forma complexo exclusivamente com Cdk1 e acreditava-se que esse complexo atuava exclusivamente na mitose (Knoblich et al., 1994). Entretanto, a expressão ectópica de ciclina A induz a transição G1/S em vários tipos de células (Sprenger et al., 1997), e sua superexpressão em discos imaginais de olhos induz fase S em fotorreceptores em diferenciação (Dong et al., 1997).

Sallé et al. (2012) demonstraram que embora a ciclina A não promova ciclos endoreplicativos, ela participa do controle da dinâmica da endoreplicação em células de linhagem de órgãos sensoriais e glândula salivar de *Drosophila*. Foi mostrado que a ciclina A é extremamente expressa e que seus níveis oscilam durante os ciclos endoreplicativos. Mais precisamente, a ciclina A acumula principalmente no citoplasma durante a fase S e está envolvida no controle do tempo da fase S, atuando na transição entre as fases S precoce e tardia, uma vez que a duração das fases S precoce e tardia é alterada quando há perda ou ganho de função de ciclina A, levando a uma redução na ploidia da célula, indicando que a ciclina A é necessária durante os ciclos replicativos para que as células atinjam ploidia final adequada. Por fim, foi demonstrado que a ciclina A pode regular o direcionamento da proteína ORC2, membro do complexo pré-RC, e assim modular a replicação da heterocromatina.

A progressão de ciclos endoreplicativos requer uma expressão dos principais reguladores do ciclo celular, como a ciclina E e ciclina A. Contudo a superexpressão da ciclina A pode desencadear a fase S, mesmo em um mutante sem ciclina E (Sprenger et al., 1997; Weiss et al., 1998).

Células podem inibir a mitose e desencadear a endoreplicação a partir de uma *downregulation* de ciclinas mitóticas, através da ativação do complexo APC/C, e da indução de inibidores de Cdks (CKIs) ao longo do ciclo (Lilly, Spradling, 1996; Zielke et al., 2008). A ciclina B inibe ciclos endoreplicativos promovendo a divisão celular. A eliminação do gene de ciclina B, é suficiente para que as células de leveduras sejam submetidas a sucessivas rodadas de replicação do DNA (Fisher, Nurse, 1995).

Estes dados, dentre outros, levantam o questionamento sobre a participação das ciclinas em certos tipos de células que executam normalmente variações no programa de replicação de DNA. Portanto, um foco importante surge em abordar a presença dos diferentes tipos de ciclinas, nos ciclos endoreplicativos que ocorrem durante o desenvolvimento ovariano, os quais geram poliploidia e politenia nas células nutridoras do ovário de *R. americana*.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A caracterização dos diferentes tipos celulares no ovário quanto a replicação de DNA, evidenciaram uma intensa atividade proliferativa das células foliculares para envolver cada ovócito com sua respectiva célula nutridora e formar o folículo, acompanhando seu crescimento durante o desenvolvimento, até a fase de pupa tardia. A atividade endoreplicativa nas células nutridoras, evidencia síntese de DNA associada a politenização cromossômica que ocorre como um processo grandemente sincrônico com início na fase de pupa intermediária e término na fase de pupa tardia.

Análises dos perfis de expressão dos RNAs mensageiros das ciclinas A e B não mostraram oscilações dos níveis dos transcritos, mas sim um aumento progressivo a partir do 4º período larval até o 5º dia de pupa. Portanto, não foi possível correlacionar a expressão das duas ciclinas com os ciclos replicativos das células foliculares e com os ciclos endoreplicativos das células nutridoras.

Dados de imunolocalização das ciclinas mostraram um perfil de localização proteica de ciclina A citoplasmática, sem evidência nuclear, enquanto a ciclina B é localizada preferencialmente em uma região denominada de vesícula germinal do ovócito, associada aos cromossomos meióticos.

As reconstruções tridimensionais foram relevantes para uma identificação com maior precisão das estruturas celulares e da localização proteica das ciclinas no ovário, compensando a complexidade de estudar o desenvolvimento desse órgão que possui três diferentes tipos celulares indissociáveis.

Conjuntamente, as metodologias aplicadas no presente estudo permitem afirmar que as ciclinas são sintetizadas e acumuladas progressivamente durante a ovogênese em *R. americana* e sugerem que as funções das ciclinas A e B estariam relacionadas a transcrição e controle do ciclo celular logo após a fecundação e durante a embriogênese.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Anan'ina TV, Kokhanenko AA, Stegniv VN. Cyst geometry in the egg chambers of *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) ovaries. *Protoplasma*. 2014;251:913-9.
- Barlow PW, Sherman MI. Cytological studies on the organization of DNA in giant trophoblast nuclei of the mouse and the rat. *Chromosoma*. 1974; 47:119–31.
- Basile R. Nucleic acid synthesis in nurse cells of *Rhynchosciara angelae* Nonato and Pavan, 1951. *Genetics*. 1969;61:261-273.
- Basile R. Aspects of ovary development in *Rhynchosciara*. *Revista Brasileira de Genetica II*. 1979; 2: 145-160.
- Basile R, Casartelli C, Benozzati ML. Desenvolvimento dos Testículos e Ovários de “*Rhynchosciara*”. *Ciência e Cultura*. 1975;27:151-158.
- Bauer H, Beermann W. Polytenia of giant chromosomes. 1952;4: 830-48.
- Bourouh M, Dhaliwal R, Rana K, Sinha S, Guo Z, Swan A. Distinct and overlapping requirements for cyclins A, B, and B3 in *Drosophila* female meiosis. *G3 Genes Genomes Genetics*. 2016;6:3711-24.
- Brandão AS, De Amaral JB, Rezende-Teixeira P, Hartfelder K, Sivieiro F, Machado-Santelli G. Cell death and tissue reorganization in *Rhynchosciara americana* (Sciaridae: Diptera) metamorphosis and their relation to molting hormone titers. *Arthropod Structure & Development*. 2014;43:511-22.
- Breuer ME. Revision of the *Rhynchosciara Rubsaamen* (Diptera, Sciaridae) in the Neotropical Region. *Arq Zool*. 1969;17:167-98.
- Breuer ME, Pavan C. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma*. 1955;7:371-86.
- Britton JS, Edgar BA. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development*. 1998;125:2149–158.
- Calvi BR. Making big cells: one size does not fit all. *Proceeding of National Academy of Sciences of the USA* 2013;110: 9621–2.
- Casartelli C. Alguns aspectos de diferenciação entre linhagem somática e germinativa determinados por mudanças no número e forma dos cromossomos. *Ciência e Cultura*. 1971;23:213-19.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Dalby B, Glover M. 3' non-translated sequences in *Drosophila* cyclin B transcripts direct posterior pole accumulation late in oogenesis and peri-nuclear association in syncytial embryos. *Development*. 1992;115:989-97

Davioli T, De Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and câncer. *Annual Review Cell and Developmental Biology*. 2011;27: 585-610.

Dong X, Zavitz KH, Thomas BJ, Lin M, Campbell S, Zipursky SL. Control of G1 in the developing *Drosophila* eye: *rca1* regulates Cyclin A. *Genes Development*. 1997; 11:94-105.

Dreyfus A, Nonato E, Breuer ME, Pavan C. Cromosomas politênicos em vários órgãos de *Rhynchosciara angelae* (Dipterae). *Revista Brasileira de Biologia*. 1951;11:439-50.

Edgar BA, Lehner CF. Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science*. 1996;274:1646-52.

Edgar BA, Orr-Weaver TL. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*. 2001;105: 297–306.

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*. 1996; 274: 1664-72.

Eliades A, Papadantonakis N, Ravid K. New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization. *Jornal Biological Chemistry*. 2010;285:18909-17.

Ficq A, Pavan C. Autoradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Nature*. 1957;180:983-84.

Fisher DL, Nurse P. A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G₁ cyclins. *The EMBO Journal*. 1996;15:850-60.

Follette, P.J. et al. (1998) Fluctuations in cyclin E levels are required for multiple rounds of endocycle S phase in *Drosophila*. *Current Biology*. 1998;8:235–238.

Fox DT, Duronio R J. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development*. 2013;140: 3-12.

Guevara M, Basile R. DNA and RNA puffs in *Rhynchosciara*. *Caryologia*. 1973; 26:275–95.

Gui L, Homer H. Hec1-dependent cyclin B2 stabilization regulates the G2-M transition and early prometaphase in mouse oocytes. *Dev. Cell*. 2013;25:43–54.

Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology*. 2013; 7: 345-56.

He L, Wang X, Montell DJ. Shining light on *Drosophila* oogenesis: live imaging of egg development. *Current Opinion in Genetics Development*. 2011;21:612-19.

Henley SA, Dick FA. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Division*. 2012;7:10-24.

Knoblich JA, Sauer K, Jones L, Richardson H, Saint R, Lehner CF. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell*. 1994;77:107-120.

Kobayashi S, Yamada M, Asaoka M, Kitamura T. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature*. 1996;380:708-11.

Lara FJS, Tamaki H, Pavan C. Laboratory culture of *Rhynchosciara angelae*. *Am Nature*. 1965; 99:189-91.

Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Development*. 2009;23:2461-2477.

Lefevre G Jr. Salivary chromosome bands and the frequency of crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1971;67:497–513.

Lehner CF, ÓFarrell PH. Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell*. 1989;56:957-68.

Lehner CF, ÓFarrell PH. The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell*. 1990;61: 535-47.

Lilly MA, Duronio RJ. New insights into cell cycle control from the *Drosophila* endocycle. *Oncogene*. 2005;24:2765-75.

Lilly MA, Spradling AC. The *Drosophila* endocycle is controlled by cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. *Genes Development*. 1996;10:2514-26.

Lynch JA, Roth S. The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects. *Genes Development*. 2011;25:107-18.

Lynn DE. Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cell Development Biology Animal*. 2001; 37:319-21.

Machado-Santelli GM, Basile R. Action of hydroxyurea on chromosome physiology in *Rhynchosciara angelae*. *Genetica*. 1978; 48: 131-135.

Machado-Santelli GM, Basile R. DNA replication and DNA puffs in salivary chromosomes of *Rhynchosciara*. *Ciência e Cultura*. 1975;27:167–74.

Machado-Santelli GM, Santelli RV. Oocyte Differentiation in *Rhynchosciara americana*. *Cellular and Molecular Biology*. 2000;46:145-50.

- Mehrotra S, Maqbool SB, Kolpakas A, Murnen K, Calvi BR. Endocycling cells do not apoptose in response to DNA rereplication genotoxic stress. *Genes Development*. 2008;22:3158-71.
- Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132:598–611.
- Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 2004;116:221-34.
- Nicolson S, Donna D, Kumar S. Ecdysone-mediated programmed cell death in *Drosophila*. *The international journal of developmental biology*. 2015;59:23-32.
- Nonato E, Pavan C. A new species of *Rhynchosciara Rubsaamen*, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 1951;11:435-37.
- Nordman J, Orr-Weaver TL, Regulation of DNA replication during development. *Development*. 2012;139:455-64.
- Pavan C. Nucleic acid metabolism in polytene chromosome and problem of differentiation. *Brookhaven Symposia in Biology*. 1965;18:222-41.
- Pavan C, Breuer ME. Polytene chromosomes in different tissues of *Rhynchosciara*. *Journal of Heredity*. 1952;63:151-7.
- Pavan C, Da Cunha AB. Chromosomal activities in *Rhynchosciara* and other *Sciridae*. *Annual Review of Genetics*. 1969; 3:425-49.
- Penalva LO, Yokosawa J, Stocker AJ, Soares MA, Graessmann M, Orlando TC, Winter CE, Botella LM, Graessmann A, Lara FJ. Molecular characterization of the C-3 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*. *Gene*. 1997;193:163–72.
- Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: The megakaryocyte example. *Journal of Cellular Physiology*. 2002;190: 7–20.
- Rezende-Teixeira P, Palomino NB, Machado-Santelli GM. Rananos expression pattern during oogenesis and early embryonic development in *Rhynchosciara americana*. *Development Genes Evolution*. 2012; 222:153-64.
- Rodman TC. DNA replication in salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster* at successive larval and prepupal stages. *Genetics*. 1967;55:375–86.
- Santelli RV, Siviero F, Machado-Santelli GM, Lara FJS, Stocker AJ. Molecular characterization of the B2 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*. *Chromosoma*. 2004;113:167-76.
- Sallé J, Campbell SD, Gho M, Audibert A. Cyc A is involved in the control of endoreplication dynamics in the *Drosophila* bristle lineage. *Development*. 2012; 139:547-57.

Sauaia AM, Laicine EM, Alves MA, Hydroxiurea-induced inhibition of DNA puff development in the salivary gland chromosomes of *Bradysia hygida*. *Chromosoma*. 1971; 34:129-51.

Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*.1998;35:461-78.

Simon CR, Siviero F, Monesi N. Beyond DNA puffs: what can we learn from studying sciarids?. *Genesis*. 2016;54:361-78.

Song L, Rape M. Substrate-specific regulation of ubiquitination by the anaphase-promoting complex. *Cell Cycle*. 2011;10:52-6.

Sprenger F, Yakubovich N, O'Farrel, PH. S-phase function of *Drosophila* cyclin A and its downregulation in G1 phase. *Current Biology*. 1997;7:488-99.

Stocker AJ, Gorab E, Amabis JM, Lara FJS. A molecular cytogenetic comparison between *Rhynchosciara americana* and *Rhynchosciara hollanderi* (Diptera: Sciaridae). *Genome*. 1993;36:831-43.

Stocker AJ, Pavan C. The influence of ecdysone on gene amplification, DNA synthesis, and formation in the salivary gland chromosomes of hynchosciara hollanderi. *Chromosoma*.1974;45:295-319.

Stocker AJ, Pueyo MT, Pereira SD, Lara FJS. Ecdysteroid titers and changes in chromosomal activity in the salivary glands of *Rhynchosciara americana*. *Chromosoma*. 1984; 90: 26-38.

Stormo BM, Fox DT. Polyteny: still a giant player in chromosome research. *Chromosome Research*. 2017;25:201-14.

Terra WR, De Bianch AG, Gambarini AG, Lara FJS. Haemolymph amino acids and related compounds during cocoon production by the larvae of fly *Rhynchosciara americana*. *J. Insect Physiology*. 1973;19:2097-106.

Touati SA, Cladiere D, Lister LM, Leontiou I, Chambon JP et al. Cyclin A2 is required for sister chromatid segregation, but not separase control, in mouse oocyte meiosis. *Cell Reports* 2012;2:1077–87.

Tyson JJ. Models of cell cycle control in eucaryotes. *Journal Biotechnology*. 1999; 71:239-44.

Weiss A. et al. Continuous Cyclin E expression inhibits progression through endoreduplication cycles in *Drosophila*. *Current Biology*. 1998;8:239–42.

Westendorf JM, Swenson KI, Ruderman JV. The role of cyclin B in meiosis I. *J Cell Biol*. 1989;108:1431-44.

Whitfield WGF, Cayetano G, Maldonado-Codina G, Glover DM. The A- and B-type cyclins of *Drosophila* are accumulated and destroyed in temporally distinct events that define separable phases of the G2-M transition. *The EMBO Journal*. 1990; 9:2563-72.

Winter CE, De Bianchi AG, Terra WR, Lara FJS. Relationships between newly synthesized proteins and puff patterns in salivary glands of *Rhynchosciara americana*. *Chromosoma*; 1977;61:193-206.

Wu X, Tanwar OS, Raftery LA. *Drosophila* follicle cells: morphogenesis in an eggshell. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2008;19:271-82.

Zielke N, Edgar BA, De Pamphilis ML. Endoreplication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5:129-48.

Zielke N, Querings S, Rottig C, Lehner C, Sprenger F. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes Development*. 2008; 22:1690-703.

Zhimulev IF, Belyaeva ES, Semeshin VF, Koryakov DE, Demakov SA, Demakova OV, Pokholkova GV, Andreyeva EN. Polytene Chromosomes: 70 years of genetic research. *International Review of Cytology*. 2004