HUGO AGUIRRE ARMELIN

PROBLEMAS DA BIOSÍNTESE DE RNA EM EUCARIOTOS.

O modelo glândulas salivares de

Rhynchosciara angelae.

Tese de doutoramento
apresentada à Cadeira
de Química Orgânica e
Biológica da Faculdade
de Filosofia, Ciências
e Letras da Universidade
de São Paulo. Trabalho
realizado no Labora-
tório de Biologia Mole-
cular do Departamento -
de Botânica da mesma Fa-
culdade.

SÃO PAULO
1969

AGRADECIMENTOS

Este trabalho deve ser encarado primeiramente como uma tentativa de fazer ciência básica no Brasil. Esta tentativa não pode ser avaliada como empreendimento isolado. É apenas parte de um programa de implantação de um centro de pesquisa básica. Este programa é tarefa da qual se incumbiu o Prof. Francisco J.S. Lara, e deve ser considerado no seu conjunto. Não posso, entretanto, deixar de abrir um parêntese para considerações pessoais. Quero expressar meu agradecimento ao Prof. Lara que me recebeu em seu laboratório sem restrições, e acima de tudo teve o desprendimento de me confiar uma pequena parte do seu programa, a ele devo a minha oportunidade de tentar fazer ciência.

Dividi, a tal ponto, as excitações e frustrações diárias deste trabalho com meu colega Rogério Meneghini, que agora é difícil dizer o que é meu e o que é dele no material descrito nesta tese. Mas, não estou preocupado com este problema, pois desta colaboração o que me valeu menos foram nossos resultados.

O meu colega Nelson Marques, durante o seu estágio como bolsista da F.A.P.E.S.P. em nosso Laboratório, dividiu comigo parte dos trabalhos experimentais desta tese. Os meus colegas Jane Balsamo e Roberto V. Santelli não mediram esforços no sentido de melhorar a correção e a clareza do meu texto. Não sei se foram bem sucedidos em tarefa tão penosa, pois a mim importou muito mais o interesse sincero que demonstraram pelo trabalho. Não poderia deixar de mencionar que grande parte das experiências que realizei seriam praticamente impossíveis se não fosse a colaboração técnica de minha colega Hiromi Tamaki. A eles todos deixo aqui meus agradecimentos.

iv

PARA MEUS PAIS

"

"I have often had cause to feel that my hands are cleverer than my head. That is a crude way of characterizing the dialectics of experimentation. When it is going well; it is like a quite conversation with Nature. One asks a question and gets an answer; then one asks the next question and gets the next answer. An experiment is a device to make Nature Speak Intelligibly. After that one has only to listen"

(G. Wald, (1968), Science, 162,230.)

Í N D I C E

	Pag.
I. INTRODUÇÃO	1
a. Eucariotos e procariotos.	4
b. Porque glândulas salivares de <i>R. angelae</i> ?	9
c. O Problema da extração e caracterização de RNA em células nucleadas.	13
d. Problemas da biossíntese de rRNA	16
e. RNA nuclear.	24
f. Etapas do mecanismo de expressão gênica em eucariotos.	29
g. Finalidades dêste trabalho.	36
II. MATERIAIS E MÉTODOS.	39
a. Animais	39
b. Administração de Isótopos	40
c. Extração de RNA.	40
d. Fracionamento celular.	43
e. Determinação de ácidos nucleicos e proteínas.	46
f. Determinação de radioatividade.	46
g. Determinação da composição de bases de RNA.	47
h. Reação de hibridização DNA-RNA.	47
i. Análise de sedimentação.	48
j. Reagentes.	49
III. RESULTADOS.	51
a. Dados gerais sôbre o RNA extraído das glândulas salivares de <i>R. angelae</i>	51
b. Fracionamento do RNA celular através do método de extração com fenol.	55
c. RNA de frações subcelulares.	69
d. Padrão de síntese de RNA no 3 ^o período do 4 ^o estádio do desenvolvimento larval.	77
e. Padrão de síntese de RNA no fim do 4 ^o estágio do desenvolvimento larval.	88

IV. DISCUSSÃO.	105
a. Fracionamento celular.	105
b. Biossíntese de rRNA.	108
c. RNA não ribossômico rapidamente marcado.	114
d. Padrões de síntese de RNA durante o desenvolvi- mento larval.	117
e. Conclusões e perspectivas.	120
V. RESUMO.	123
VI. ABREVIATURAS.	126
VII. BIBLIOGRAFIA.	127

I - INTRODUÇÃO

O grande feito alcançado pela genética molecular foi conseguir, na década de 1950, desenvolver um modelo molecular para a transmissão e expressão das informações genéticas nos sistemas biológicos. A série de trabalhos experimentais que foi importante nesse sentido já é assunto de livros básicos de biologia (BSCS), não havendo necessidade de descrevê-la aqui. A doutrina desenvolvida pela biologia molecular pode ser sintetizada no esquema já muito popular:

Este esquema que procura indicar o sentido do fluxo de informações num sistema biológico é conhecido como o Dogma Central da Biologia Molecular (Watson, 1965; Stent, 1968).

O ideário fundamental aqui envolvido, inclui premissas não explícitas no esquema acima. Uma sequência linear de bases em DNA significa uma sequência bem determinada de amino ácidos numa cadeia peptídica e a determinação da estrutura primária de uma proteína garante uma morfologia definida para sua estrutura tridimensional. Isto decorre do fato de que a sua conformação final é termodinamicamente determinada, assim que o polímero é liberado no meio celular. Meio celular quer dizer condições físico-químicas homeostaticamente controladas, o que significa informações não codificadas em DNA.

A morfogênese de organelas celulares, células ou órgãos, durante o desenvolvimento embrionário, é assumida como um fenômeno análogo ao processo pelo qual uma sequência linear de amino ácidos adquire sua conformação mais es

tável. Esta inferência não é original e tem sido considerada já há algum tempo (DAVIS, 1964). Isto não implica que a estrutura de uma célula será espontaneamente alcançada, como um estado de energia livre mínima, se misturarmos, nas proporções adequadas, tôdas as espécies químicas que a compõe. Na ontogênese de uma célula ou organela celular, têm papel fundamental padrões de organização preservados em estruturas celulares - preexistentes, q ue nada mais são do que informações armazenadas em material diferente de DNA. (ver exemplos em NANNY, 1968). Consequentemente, não tem sentido entender um genoma como, simplesmente, um conjunto de sequências de bases em DNA, independentemente do sistema celular no qual está inserido. Não obstante, o ciclo de vida de um organismo está, primàriamente, programado em termos de DNA. Dessa forma, o desenvolvimento do indivíduo depende do tipo e da quantidade de informação a ser expressa em termos de proteína, em cada etapa da sua ontogênese.

Consequentemente, os mecanismos que controlam o fluxo de informação do nível do DNA ao nível de proteína ocupam um ponto central na organização de um sistema biológico. Estes mecanismos de controle foram teleonômica⁽¹⁾mente selecionados durante a evolução biológica, para atender às necessidades de sistemas com níveis de organização progressivamente mais complexos.

O estudo da indução enzimática permitiu a descoberta da organização do genoma em bactérias e dos circuitos de controle metabólico que regulam a expressão gênica em anucleados (JACOB e MONOD, 1961). Nestes organismos, a classe de RNA responsável pela transmissão de informação do nível do DNA para o da proteína é altamente instável. A qualidade da informação a ser expressa é controlada exclusivamente ao nível da trans-

crição. Os circuitos que permitem êste contrôle foram selecionados para atender às necessidades de um organismo de vida livre, que necessita um mecanismo eficiente de adaptação às variações do meio (MONOD e JACOB, 1961).

Em células nucleadas, no entanto, encontram-se níveis de organização muito diferentes dos encontrados em bactéria, o que tenia exigido a seleção de mecanismos novos para o contrôle da expressão gênica. Não se espera que os circuitos de regulação em nucleados envolvam princípios básicos não encontrados em anucleados. Mas, a simples transposição do modelo de expressão diferencial de genes encontrado em bactérias na tentativa de explicar o contrôle genético de organismos superiores (JACOB e MONOD, 1963), tem resultado infrutífero. Ao que tudo indica, o processo básico da transmissão da informação do nível do DNA ao nível de proteína está diversificado para permitir a coordenação do programa de desenvolvimento de um

¹A discussão sôbre o desenvolvimento filogenético de estruturas e mecanismos adaptativos, envolve um raciocínio eminentemente finalístico. Evidentemente, no pensamento biológico, êste finalismo tem um sentido bem determinado. É consequência da aplicação do princípio da seleção natural, como processo que garante a preservação de apenas certas modificações, dentre as muitas que um sistema biológico pode sofrer casualmente. O componente finalístico destas especulações poderia ser, simplesmente, qualificado de teleológico. Esta prática, no entanto, traz certa ambiguidade, em face da conotação tradicional de teleologia. Para evitar êste inconveniente, foi introduzido o termo teleonomia, para designar o componente finalístico das discussões a respeito do significado fisiológico ou ecológico de estruturas ou mecanismos de um sistema biológico. (DAVIS, 1961).

organismo mais complexo. Esta diversificação envolveu o aparecimento de classes de RNA, e talvez também de DNA, sem similares no sistema bacteriano.

Os dados disponíveis, entretanto, não são suficientes para que se monte um modelo fundamental convincente. Na maior parte dos casos, os esforços de síntese não passam de tentativas de generalização, no sentido de orientar a interpretação de dados e o planejamento de novas maneiras de ataque experimental aos problemas. O trabalho relatado em seguida representa um esforço desse tipo: estudo de organização e metabolismo dos ácidos ribonucléicos num tipo de célula nucleada, na procura de informações básicas sobre o controle genico em organismos superiores.

a) Eucariotos e Procariotos

Sob a grande diversidade dos sistemas biológicos estão dois níveis básicos de organização, consequência de um salto fundamental na evolução. De um lado estão os procariotos, assim chamados por não possuírem núcleo e cromossomos diferenciados (RIS e CHANDLER, 1963). De outro aparecem os eucariotos cuja estrutura celular se caracteriza por um sistema elaborado de membranas, fazendo da célula um conjunto de compartimentos especializados.

Nos procariotos, transcrição e tradução não estão distribuídos em compartimentos separados. Os ribossomos, associando-se ao mRNA já durante a sua síntese, garantem o acoplamento de transcrição e tradução, permitindo que a síntese de mRNA ocorra a uma velocidade adequada à intensidade de síntese protéica (STENT, 1964 e 1966). Isto foi experimentalmente demonstrado: primeiro pelo efeito estimulatório de ribos

somos sôbre a atividade da RNA polimerase purificada com DNA puro "in vitro" (SHIN e MOLDAVE, 1966); depois pela demonstração direta de que um fator especial garante à subunidade ribossomal de 30S a propriedade de se associar a mRNA nascente (REVEL et alii, 1968); e agora já se consegue acoplar transcrição e tradução num sistema totalmente livre de célula (BRYAN, SUGIURA e HAYASHI, 1969; GELFAND e HAYASHI, 1969) com DNA de ϕ x 174 e polimerase, ribossomos e componentes solúveis de E. coli. Como se nota, a maneira pela qual a informação genética é expressa em bactéria tem suas linhas gerais claramente definidas, como um processo de duas etapas de tal forma acopladas que o mRNA uma vez transcrito é necessariamente traduzido.

Em células nucleadas, o principal sítio de transcrição é o núcleo, enquanto que o sistema de síntese protéica - está no citoplasma⁽²⁾. Esta característica estrutural de eucariotos introduz um problema novo não encontrado em bactérias: o transporte da informação para o citoplasma. Óbvio-mente não era de se esperar que o mRNA chegasse ao citoplasma por difusão. A primeira hipótese para resolver o problema foi inspirada no modelo bacteriano. Atribuiu-se à subunidade ribossomal de 40s o papel de conduzir o mRNA ao citoplasma. Esta sugestão veio baseada em dois dados experimentais: 1) no caso do desenvolvimento de vírus da Vaccinia em células HeLa, o mRNA recém sintetizado se associa à partícula de 40s

²Síntese de proteína no núcleo, cuja existência é discutível (GALLWITZ e MUELLER, 1969; ONO e TERAYAMA, (1968), deve estar ligada à produção de proteínas especiais e é sem dúvida quantitativamente sem importância, podendo ser ignorada para o propósito desta discussão.

e só depois aparece em polissomos (JOKLIK e BECKER, 1965); 2) o mRNA marcado recém chegado ao citoplasma sedimenta junto às partículas de 40s e só depois aparece em polissomo, fato que foi verificado em células HeLa (McCONKEY e HOPKINS, 1965) e em células de fígado de rato (HENSHAW, REVEL e HIATT, 1965). Mas esta hipótese não estava de acordo com a maior parte dos conhecimentos práticos. Durante o desenvolvimento embrionário de ouriço do mar, quando o rRNA não é sintetizado, o mRNA aparece no citoplasma associado a uma ribonucleoproteína diferente de ribossomo (SPIRIN e NEMER, 1965). Em células L, PERRY e KELLEY (1966) verificaram que realmente mRNA aparece sedimentando junto às subunidades de 40s. Mas está associado a uma partícula diferente de ribossomo, cujo coeficiente de sedimentação se aproxima de 40s. Dados deste tipo aconselharam o abandono da idéia do transporte do mRNA por ribossomos. Na verdade, ficou claro que a separação de transcrição e tradução em células nucleadas não é meramente topográfica. As necessidades de uma classe de mRNA de comportamento mais complexo que a correspondente bacteriana exigiu a seleção de um mecanismo novo, que permitisse ao mesmo tempo transporte do RNA informacional e controle da tradução ao nível citoplasmático. SPIRIN (1966) formalizou uma teoria sobre transporte e armazenamento de mRNA no citoplasma, postulando a existência, em células nucleadas, de partículas ribonucleoprotéicas especiais, que encerram mRNA, às quais denominou informossomos. A existência deste tipo de partículas tem recebido suporte experimental de diversas fontes; foram encontradas em células L (PERRY e KELLEY 1966, 1968), embrião de ouriço do mar (INFANTE e NEMER 1968), epiderme de inseto (KAFATOS, 1968) e células de fígado de rato (HENSHAW, 1968). Este problema, no entanto, está ainda bastante obscuro e a questão vai ser retomada num outro ponto

dêste capítulo.

Outro aspecto importante das células dos eucariotos, em geral, é a presença de DNA no citoplasma, principalmente - em mitocôndria e cloroplasto, representando centros de transcrição independentes do núcleo (GRAMICK e GIBOR, 1967; NASS, 1969). A fração de DNA ligado a estas organelas celulares representa uma pequena porcentagem do total encontrado na célula. O mais interessante, entretanto, é que este DNA, assim como os elementos do sistema de transcrição e tradução encontrados em mitocôndria e cloroplastos, parecem estar organizados segundo os padrões de organização encontrados em procariotos. Os dados que sugerem este fato são: ocorrência em mitocôndrias e cloroplastos de ribossomos semelhantes ao 70s bacteriano (KUNTZEL e NOLL, 1967; KUNTZEL, 1964); cloranfenicol e outros antibióticos inibem a síntese de proteína em mitocôndria e em bactéria, mas não afetam a síntese protéica citoplasmática, pelo menos em levedura e fígado de rato (CLARK-WALKER e LINNANE, 1966); formilmetionil-tRNA, um dos elementos fundamentais para iniciação de cadeia protéica em bactéria tem sido encontrado em cloroplasto e em mitocôndria mas não em fração microssomal (SMITH e MARCKER, 1968). A função destes centros de armazenamento e processamento de informações no citoplasma não é clara. Em células HeLa foi sugerido que polissomos solúveis contêm mRNA de origem mitocondrial (ATTARDI e ATTARDI, 1967). Num mutante determinado de Chlamydomonas encontraram-se evidências indicando que a máquina de síntese protéica do cloroplasto é responsável pela produção de proteínas estruturais desta organela (HOOBER, SIEKEVITZ e PALADE, 1969). A descoberta destes fatos trouxe elementos novos ao estudo da evolução dos eucariotos e da herança citoplasmática (WAGNER, 1969). Do ponto de vista da fisiologia das células nucleadas

como um todo, entretanto, estes sistemas citoplasmáticos têm sido negligenciados, simplesmente porque não se nota nenhuma relação simples com o sistema principal presente no núcleo.

Nos animais e vegetais superiores, durante o desenvolvimento embrionário, as células se especializam no sentido de atender às diversas funções necessárias ao organismo. Durante este processo, conhecido como diferenciação, as células sofrem modificações drásticas. Do ponto de vista morfológico, isto significa adquirir estruturas novas, eliminar ou hipertrofiar estruturas já existentes, alterando completamente a sua forma. Do ponto de vista bioquímico, significa adquirir competências metabólicas estáveis no sentido de desenvolver o papel fisiológico, imposto pela divisão de trabalho no organismo. A diferenciação não é um fenômeno homólogo à indução enzimática bacteriana. Seu aparecimento foi possível depois que os sistemas biológicos alcançaram um determinado nível de organização. Parece que um ponto essencial foi a diversificação do processo de expressão gênica, que em bactérias obedece uma via de duas etapas, como discutido acima. A bioquímica da diferenciação, entretanto, está atrasada o suficiente para não permitir sínteses definitivas (GROSS, 1968). Na maior parte dos casos o que se faz é sugerir trilhas, as quais poderão levar ao caminho seguro que dará acesso aos mecanismos de controle genético selecionados para eucariotos, que permitiram o aparecimento do processo de diferenciação.

O recente progresso do conhecimento dos mecanismos moleculares de controle genético deve-se à tática certa usada no ataque ao problema. Não é novidade para ninguém que a exploração experimental extensiva do sistema fago-bactéria foi o caminho certo (JACOB, 1966). LEDERBERG (1966) recentemente defendeu a idéia de que o progresso da genética molecular dos orga-

nismo superiores está dependendo do aparecimento de alguém com autoridade suficiente para desenvolver o papel disciplinador de ~~empenhado~~ por DELBRUCK em relação ao modelo fago-bactéria (STENT, 1968; CAIRNS, STENT e WATSON, 1966). Esta linha de raciocínio admite que é possível encontrar um sistema que seria o modelo ideal para o estudo da atividade gênica - em eucariotos. Dessa forma, o problema se resumiria na escolha do sistema adequado. Uma vez escolhido o modelo, ele seria objeto de intensos estudos, sob todos os aspectos possíveis, como foi feito com E. coli e fago lambda. Nós não estamos convencidos da validade desta idéia. O momento nos parece obrigar o ataque aos problemas já levantados, procurando o modelo mais apropriado para o estudo experimental em cada caso. É esta forma de encarar os caminhos possíveis para o progresso da biologia molecular do gene em organismos superiores que tem motivado a escolha de R. angelae como um modelo útil ao enfoque experimental de problemas básicos da biologia de nossos dias.

b) Porque glândulas salivares de R. angelae?

A importância que os cromossomos politênicos dos Diptera tiveram para o desenvolvimento da citogenética clássica é largamente conhecida. Mais recentemente, o estudo do desenvolvimento dos "puffs" nos cromossomos das glândulas salivares de Chironomidae (BEERMANN, 1956 e 1963; CLEVER, 1965) e Sciaridae (BREUER e PAVAN, 1955; PAVAN, 1959) introduziu a hipótese de que estas estruturas cromossômicas são manifestações morfológicas da atividade gênica. O alcance desta proposição pode ser adequadamente aquilatado se lembrarmos que estes dados forneceram o primeiro substrato experimental para a aplicação do modelo de ação diferencial dos genes como me

canismo básico da diferenciação em eucariotos (JACOB e MONOD, 1963).

Tomar as glândulas salivares destes dípteros como modelo de células nucleadas para estudos citogenéticos tem razões óbvias. Trata-se de um dos únicos casos em que a atividade celular pode ser acompanhada paralelamente com a atividade cromossômica, seja por simples exames microscópicos, ou pelas técnicas eficientes de citoespectrofotometria e autor-radiografia.

Para a bioquímica do desenvolvimento a primeira atração das glândulas salivares está em se tratar de um órgão de inseto, organismo que tradicionalmente tem sido encarado como modelo experimental da maior importância para o estudo de diferenciação e crescimento (GILBERT, 1967). Nos insetos, processos diferenciativos estão ocorrendo durante todo o desenvolvimento larval do indivíduo. Isto não quer dizer que a larva seja uma forma especial de embrião (WIGGLESWORTH, 1960). Na verdade ocorre que a citodiferenciação⁽³⁾ está suficientemente distendida para chamar a atenção, e não há nenhuma

- - - - -

3.

Citodiferenciação é aqui entendida como diferenciação terminal, sendo um exemplo típico o processo de transformação do hemocitoblasto fundamental em eritrócito, em medula óssea de mamífero adulto. Está implícito que o termo diferenciação embrionária inclui os processos que levam à determinação das linhagens fundamentais de células somáticas do organismo adulto. Não há interesse, nem cabe neste texto, uma análise mais minuciosa dos problemas das definições destes conceitos, os quais têm tradicionalmente suscitado discussões polêmicas.

razão para se admitir que os processos genéticos aqui envolvidos sejam diferentes daqueles envolvidos na diferenciação embrionária propriamente dita. Pelo contrário, parece que a citodiferenciação mantém grande paralelismo com a diferenciação embrionária (EBERT, 1968). No caso das glândulas salivares, estamos diante de um órgão que no decorrer do desenvolvimento larval apresenta, ao mesmo tempo, atividade de células diferenciadas e processos de citodiferenciação. Diante disto, este órgão parece reunir qualidades adequadas para ser escolhido como modelo para estudo de controle genético em células nucleadas. Uma vez feita esta escolha, a opção imediata seria tomar glândulas salivares de Drosophila, por ser este, o díptero melhor conhecido geneticamente, dispondo de um grande número de mutantes já selecionados, além de ser cultivado facilmente em laboratório. Há, no entanto, outras razões para se optar por R. angelae.

R. angelae oferece vantagens práticas imediatas. As larvas e as glândulas salivares são muito maiores que em Drosophila. Os animais oriundos de uma postura se desenvolvem sincronicamente, podendo a população ser considerada como homogênea quanto ao estágio do desenvolvimento. Além disso, o problema de cultura foi recentemente resolvido (LARA, TAMAKI e PAVAN, 1965), podendo os animais serem cultivados eficientemente em laboratório, embora não com a mesma facilidade que Drosophila. Mas a principal razão para a escolha deste sistema para estudo é outra. Estamos diante de um animal que oferece condições para o ataque experimental a problemas específicos de controle gênico em eucariotos.

Os estudos citológicos de PAVAN e colaboradores - (PAVAN, 1965) permitiram obter indicações da existência de replicação diferencial de DNA em "puffs" específicos dos -

cromossomos das glândulas salivares de R. angelae, em determinados estágios de desenvolvimento larval. Estes dados sugeriam que genes particulares estavam sofrendo replicação extra imediatamente antes da época em que eram efetivamente transcritos. Eventos similares só foram experimentalmente demonstrados no caso do rDNA durante a ovulogênese. Em anfíbios - (BROWN e DAWID, 1968) e insetos (LIMA DE FARIA, BIRNSTIEL e JAWORSKA, 1969), o rRNA que suporta a síntese protéica durante as fases iniciais da embriogênese é sintetizado previamente, durante a maturação do óvulo. Para atender ao grande surto da síntese de rRNA nesta época, o rDNA, na linhagem germinativa destes animais, sofre uma amplificação, aparentemente para atender à maior necessidade de "template". Como mecanismos deste tipo, até agora, só foram encontrados para rDNA, foi sugerido que as bandas dos cromossomos politénicos que em R. angelae sofrem replicação diferencial provavelmente contêm DNA responsável pela síntese de RNA ribossômico (EBERT e KAIGHN, 1966). Há, no entanto, razões para supor que a replicação diferencial ocorre também em DNA diferente de rDNA e pode ser um passo importante na diferenciação celular (PAUL e HUNTER, 1969). Em face destes dados, prometia resultados interessantes o estudo do metabolismo de ácidos nucleicos nas glândulas salivares de R. angelae. Esperava-se que este sistema se revelasse favorável para o estudo da real importância e significado da replicação diferencial nos mecanismos de expressão gênica em eucariotes.

Este trabalho é devotado à extração e purificação do RNA das glândulas salivares de R. angelae, principalmen

te visando a isolar produtos de transcrição específicos de períodos determinados do desenvolvimento larval. O reconhecimento das funções de certas classes de RNA, encontradas em eucariotos e sem correspondência em procariotos, é um passo fundamental para a compreensão da diferenciação celular. Os principais problemas da biologia molecular do RNA em células nucleadas são sumariamente revistos nas seções seguintes desta introdução.

c) O problema da extração e caracterização de RNA em células nucleadas

Tôdas as classes de RNA, com exceção do sRNA, ocorrem naturalmente associadas com proteínas e organelas lipoprotéicas. A dissociação destes compostos constitui o primeiro problema do isolamento. É de se esperar que a procura de métodos para o isolamento e purificação do RNA forneça informações a respeito da organização geral desta substância nas células nucleadas. Este meio de acesso à organização do RNA celular, entretanto, é bastante frustrado pelo fato de que a quantidade de nucleases e a arquitetura celular varia muito com o tecido ou organismo. Tal fato coloca obstáculos que obrigam a elaboração de métodos particulares para enfrentar dificuldades de purificação, as quais não decorrem diretamente do arranjo molecular que caracteriza os complexos que na célula encerram os diversos tipos de RNA. As principais dificuldades dos métodos de purificação de RNA se relacionam com: a) a facilidade de formação de complexos artificiais de RNA com outras macromoléculas, uma vez rompida a organização celular; b) a ampla distribuição e larga resistência à inativação da RNase, que constitui uma barreira quase insuperável, impedindo a obtenção de RNA íntegro. Por êsses motivos ficou praticamente desconhecida, até recentemente, a estrutura e distri-

buição de RNA dentro da célula.

A situação mudou drasticamente quando, em 1956, foi introduzido o método de desproteinização com fenol (KIRBY, 1956, GIERER e SCHRAMM, 1956). Este processo não só garantiu um caminho eficiente para eliminar proteínas, como também possibilitou minimizar a ação das nucleases endógenas durante o trabalho preparativo. O primeiro resultado prático da aplicação da nova técnica foi a demonstração experimental de que 80 a 90% do RNA celular pertencia a uma única classe, conhecida como RNA ribossômico (SPIRIN, 1964). O restante, 10 a 20%, parecia ser devido à classe de RNA solúvel (WATSON, 1963).

O estudo da genética de E. coli, entretanto, permitiu a JACOB e MONOD (1961) postular a existência de uma outra classe de RNA independente da solúvel e ribossomal. Esta classe tem a função específica de transferir a informação do nível do DNA para o da proteína e por isso foi chamada RNA mensageiro. Esta hipótese teve confirmação quase imediata da prática. Como se trata de um RNA que em procariotos tem uma vida média muito baixa, em relação ao rRNA e tRNA, êle é marcado preferencialmente com precursores radioativos em tempos pequenos de incorporação. Esta propriedade do mRNA permitiu a sua detecção experimental em bactérias, pelo estudo do RNA rapidamente marcado por precursores radioativos (GROS et alii, 1961, BRENNER, JACOB e MESELSON, 1961). A teoria proposta por JACOB e MONOD (1961) teve um formidável valor heurístico para a genética molecular (STENT, 1964). Um dos efeitos desta teoria sobre a pesquisa em ácidos nucléicos de células nucleadas foi induzir um intenso estudo do RNA rapidamente marcado nestas células. Em eucariotos êste tipo de ataque experimental não revelou os mesmos dados que em bactérias, mas serviu de acesso a uma série de informações fundamentais a respeito da

fisiologia celular dêstes organismos.

O insucesso na tentativa de obtenção do RNA mensageiro de células nucleadas pela simples extração do RNA rapidamente marcado não se deve a dificuldades técnicas particulares a estas células. Os métodos de extração têm sido refinados, seja no sentido de melhor purificação, como no de evitar a hidrólise enzimática. A atividade enzimática tem sido evitada através do uso de SDS (FRAENKEL-CONRAT, SINGER e WILLIAMS, 1957; NOLL e STUTZ, 1968), bentonita (FRAENKEL-CONRAT, SINGER e TSUGITA, 1961; LITAUER e SELA, 1962), macaloid (STANLEY e BOCK, 1965), sulfato de polivinila (LITAUER e SELA, 1962) e pronase (HUPPERT e SEMMEL, 1965). A utilidade dêstes agentes varia com o tipo de tecido, mas no caso de fígado de rato tem-se aproximado da condição ideal. Neste órgão tem sido possível purificar um inibidor natural da RNase endógena (SHORTMAN, 1962) o qual tem sido útil na extração do RNA dêste tecido (SAMARINA et alii, 1968). Na verdade, a dificuldade no isolamento do mRNA reside no fato de que a organização do RNA em eucariotos não é a mesma que em procariotos, daí as experiências terem revelado dados não previstos pela teoria de JACOB e MONOD (1961).

Em eucariotos, o RNA mensageiro constitui uma classe heterogênea quanto à vida média. Uma mesma célula pode possuir mensageiros relativamente estáveis, ao lado de outros bastante instáveis (SINGER e LEDER, 1966). Como consequência de um mecanismo de controle da expressão genética mais complexo que em bactérias, o RNA mensageiro não é a classe preferencialmente marcada por precursores radioativos em tempos curtos de incorporação. No RNA rapidamente marcado de células nucleadas - em ativa proliferação, predomina a classe constituída pelos - precursores nucleares do RNA citoplasmático (PERRY, 1962; -

SCHERRER e DARNELL, 1962). Já em células que se diferenciam, estando empenhadas em intensa síntese de proteína, a maior parte do RNA rapidamente marcado pertence a uma classe de RNA nuclear cuja função ainda não é conhecida (SCHERRER et alii, 1966; ATTARDI et alii, 1966). Este tipo de RNA, sem dúvida - diferente do ribossômico, não é simplesmente um precursor nuclear do RNA mensageiro. Estas dúvidas, na verdade, são a preocupação atual dos investigadores trabalhando neste campo.

A situação mantida nos últimos anos tem dificultado a caracterização de frações de RNA extraídas de células nucleadas. O problema básico é que não se dispõe de um critério consistente para se caracterizar, quanto à função, frações de RNA diferentes da ribossomal e de transferência. Em vista disto, os autores têm-se apegado a dados físicoquímicos e de origem celular, na tentativa de caracterização de frações particulares de RNA que conseguem extrair dos sistemas que estudam. Como consequência desta prática têm proliferado os nomes de novas classes de RNA (D-RNA, GEORGIEV et alii, 1963; ~~mr~~RNA, WARNER et alii, 1966; nascent-RNA, SCHERRER et alii, 1966; TD-RNA, BILING, INGLIS e SMELLIE, 1969), cujas funções são meramente conjecturais. Somente uma síntese cuidadosa pode sistematizar a nomenclatura, assim como garantir a ordenação e hierarquização dos problemas atualmente em aberto. Os esquemas de síntese que têm sido propostos, no entanto, embora de utilidade como balanço crítico dos dados experimentais, têm tido um valor heurístico muito limitado.

d) Problemas da biossíntese de rRNA

A classe de RNA ribossômico é, sem dúvida, a melhor conhecida, seja quanto à estrutura, distribuição celular ou vias de biossíntese. Isto é compreensível se lembrarmos que é

a classe mais abundante na célula, cuja extração não oferece grandes dificuldades.

No núcleo, as primeiras classes de RNA claramente definidas foram os precursores dos ácidos ribonucleicos ribossômicos citoplasmáticos. Foi demonstrado que os RNAs de ribossomo se originam de um precursor comum, produto imediato de transcrição (PERRY, 1962; SCHERRER e DARNELL, 1962). Em células de mamíferos este precursor apresenta a constante de sedimentação de 45s (SCHERRER, LATHAM e DARNELL, 1963; - GEORGIEV, 1967; MURAMATSU e BUSH, 1965). Sua demonstração foi possível através da relação precursor-produto em perfis de RNA marcado. Este fato foi posteriormente confirmado pelo padrão de metilação do precursor e dos produtos maduros de 28s e 18s (WAGNER, PENMAN e INGRAM, 1967). A combinação de fracionamento celular com análise em gradiente de sacarose e em eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu a identificação de outros intermediários na síntese do rRNA (PENMAN, 1966; PENMAN, SMITH e HOLTZMAN, 1966; MURAMATSU, HODNETT e BUSCH, 1966; WEINBERG et alii, 1967). Este processo de síntese, através de um precursor comum, parece ser o padrão geral para todos os sistemas nucleados. Por outro lado, sabe-se que nos sistemas bacterianos não ocorre um processo equivalente (HECHT, BLEYMAN e WOESE, 1968). Mesmo os ácidos nucleicos - precursores de curta vida são encontrados associados a proteínas. O isolamento das partículas ribonucleoprotéicas que encerram os precursores veio definir as linhas gerais da biossíntese dos ribossomos (VAUGHAN, WARNER e DARNELL, 1967; WARNER e SOEIRO, 1967).

A este conjunto de etapas pós-transcrição que garantem a maturação das subunidades ribossomais que vão ter ao citoplasma será reservado o nome de processamento. Todo o pro-

cesso de biossíntese de ribossomo está restrito ao nucléolo. Assim indicaram os dados obtidos para nucléolos isolados de fontes diversas e através de métodos diferentes (PENMAN, SMITH e HOLTZMAN, 1966; EDSTRÖM e DANEHOLT, 1967; MURAMATSU e BUSH, 1965; ISAWA e KAWASHIMA, 1968). Esta afirmação não está suportada apenas por estes dados, os quais padecem das limitações das técnicas de fracionamento celular. É de concordância geral que o real significado dos compartimentos celulares obtidos pelas técnicas de fracionamento é sempre discutível. Mas, evidências independentes sugerem que o nucléolo é a sede da síntese de rRNA. O mutante de Xenopus laevis que não possui nucléolo e nem o DNA responsável pela síntese de rRNA (WALLACE e BIRNSTIEL, 1966), não é capaz de sintetizar rRNA (BROWN e GURDON, 1964). Além disto, muitos dados circunstanciais apontam no mesmo sentido. Quando em fígado em regeneração a síntese de rRNA é acelerada, observa-se um aumento concomitante do volume e do conteúdo em RNA do nucléolo (MURAMATSU e BUSH, 1965). Em glândulas salivares de R. angelae no fim do desenvolvimento larval, quando ocorre uma redução na síntese de rRNA o nucléolo está em aparente regressão (nesta tese). Enfim, atualmente não se colocam mais dúvidas sérias quanto à função nucleolar de síntese de rRNA. Se esta é a única função desta organela celular é outra questão, cuja resposta segura não é possível em face dos resultados experimentais conhecidos até o momento (BIRNSTIEL, 1967; BRENTANI, 1968 e 1969).

É agora sabido que a subunidade ribossomal madura de 60s possui, além do RNA de 28s, duas outras espécies estruturais de peso molecular menor, conhecidas pelos coeficientes de sedimentação 5s e 7s. A espécie de 5s foi primeiro observada em bactéria (ROSSET e MONIER, 1963), mas é também de ocorrência geral em eucariotos. Este tipo de RNA, en-

tretanto, é sintetizado independentemente do precursor comum dos ribossômicos principais de 28s e 18s. Aparece no núcleo como um reservatório relativamente grande (KNIGHT e DARNELL, 1967) e o DNA responsável pela sua síntese não se encontra integrado na unidade de transcrição correspondente aos demais ácidos ribonucleicos ribossômicos (BROWN e WEBER, 1968; BROWN e DAWID, 1968; BIRNSTIEL, comunicação pessoal).

O RNA de 7s foi encontrado em ribossomos de células de mamíferos e de ave, não se sabendo se é uma espécie comum a todas as células nucleadas. Está estreitamente associado ao rRNA de 28s, mas a associação não envolve ligação covalente; sua origem, em células HeLa, se dá por clivagem do precursor intermediário de 32s, sendo portanto, um produto da mesma via de síntese do 28s e 18s (PENE, KNIGHT e DARNELL, 1968).

Durante o processamento ocorre eliminação de parte da cadeia do precursor inicial dos RNA's ribossomais. Este fato é sugerido por diversos dados experimentais: medidas das relações uridina- C^{14} /metil- H^3 incorporadas nos rRNA's de 45s, 32s, 28s e 18s (WEINBERG et alii, 1967); determinação dos pesos moleculares dos precursores e das formas maduras de rRNA (McCONKEY e HOPKINS, 1969); análise comparativa das sequências de nucleotídeos nos rRNA de 45s, 32s, 28s, e 18s - (JEANTEUR, AMALDI e ATTARDI, 1968); medida dos níveis de hibridização para os rRNA's precursores e maduros em relação ao DNA nucleolar (STEELE, 1968). Além disso, foi possível demonstrar em Xenopus laevis, que no DNA os cistrons para 28s e 18s estão contíguos (BROWN e WEBER, 1968b; BIRNSTIEL et alii, 1968). Este conjunto de dados claramente sugerem a organização provável da unidade de transcrição para o rDNA: estão linearmente dispostos os cistrons para os RNA's do ribossomo maduro

e o "cistron" responsável pelo segmento que é eliminado durante o processamento. A unidade de transcrição para rRNA pode ser diretamente visualizada ao microscópio eletrônico no caso dos ovócitos de anfíbios (MILLER e BEATTY, 1969 e 1969b). As eletromicrografias mostraram que as unidades de transcrição têm o comprimento esperado em vista do peso molecular estimado para o primeiro precursor de rRNA; 2 a 3 μ para um peso molecular da ordem de $2,5$ a $3,5 \times 10^6$. Estas unidades estão linearmente dispostas, intercalando-se com segmentos de DNA (associado a proteína) que não são transcritos. As implicações destes resultados são formidáveis, pois pela primeira vez se têm indicações claras da organização das unidades de transcrição em eucariotos.

O controle da síntese de rRNA, como das demais classes deste ácido nucléico, nos organismos superiores é praticamente desconhecido. Não obstante, uma quantidade enorme de trabalhos tem sido feita a respeito disso. A maior parte desses trabalhos estão voltados para a procura do mecanismo pelo qual os hormônios interferem com a síntese de RNA. Os resultados até agora obtidos não dão oportunidade a grandes generalizações (TATA, 1968; GREENGARD, 1969) e não serão aqui considerados por estarem fora da preocupação direta deste trabalho. É, no entanto, pertinente à linha de raciocínio aqui desenvolvida a **pergunta**: qual ou quais as etapas da biossíntese de rRNA que têm importância para os mecanismos de regulação?

Colocando a questão da maneira mais ampla possível, podemos admitir que três são as etapas potencialmente úteis como passos de regulação, nominalmente: replicação diferencial do rDNA, transcrição e processamento.

A replicação diferencial do rDNA é uma maneira de manter a quantidade de "template" num nível adequado à velocidade de síntese do rRNA. No caso de ovócitos de anfíbios (EVANS e BIRNSTIEL, 1968; BROWN e DAWID, 1968) e de insetos (LIMA DE FARIA, BIRNSTIEL e JAWORSKA, 1969) o rDNA experimenta uma enorme amplificação para atender às necessidades de grande surto de síntese de rRNA, num período do desenvolvimento do óvulo. É interessante notar que este processo parece ser um mecanismo especial restrito à linhagem germinativa. No mutante de Xenopus anucleolado heterozigoto observava-se nas células somáticas apenas a metade de rDNA observado para o genótipo selvagem e também apenas um nucléolo por célula (WALLACE e BIRNSTIEL, 1966). Apesar disso, as células somáticas do mutante heterozigoto apresentam a mesma capacidade de síntese de rRNA que as células do selvagem - (BROWN e GURDON, 1963) assim como um nucléolo maior. Isto sugere que os cistrons de rDNA no genótipo de Xenopus não estão num nível limitante para a velocidade de síntese de rRNA. Mas quando foram examinados os ovócitos do mutante heterozigoto verificou-se que apresentavam aparentemente o mesmo nível de rDNA que os ovócitos do selvagem (PERKOWSKA, MACGREGOR e BIRNSTIEL, 1968). Isto mostra que, independentemente do nível inicial, o mecanismo de amplificação do rDNA na linhagem germinativa garante o alcance da quantidade de cistrons adequada à intensidade de síntese de rRNA. Tentativas de detectar variação no número de cistrons para rDNA em órgãos de galinha resultaram infrutíferas (RITOSSA et alii, 1966). O único caso relatado de amplificação de rDNA em células somáticas foi em cérebro de rato, descrito por STEVENIN et alii (1968) que, entretanto, não foi confirmado por MOHAN, DUNN e CASOLA (1969). Amplificação de rDNA, ao que

tudo indica, está largamente difundida entre eucariotos (GALL, 1969); parece porém ser uma característica exclusiva da ovulogênese.

A possibilidade de mecanismos regulatórios agirem ao nível da transcrição no controle da síntese de rRNA é uma matéria que merece discussão. Em núcleos isolados de fígado de rato tem-se demonstrado a existência de duas atividades de RNA-polimerase: uma é dependente de Mn^{2+} e é ativada por sulfato de amônio, a outra é dependente de Mg^{2+} e não é ativada por sulfato de amônio. Foi sugerido que a RNA-polimerase dependente de Mg^{2+} está implicada apenas na síntese de rRNA (WIDNELL et TATA, 1966). Esta sugestão foi baseada na análise do RNA produzido pelas duas polimerases quanto à composição de base, frequência de vizinho mais próximo em relação a AMP e GMP e perfil de sedimentação em gradiente de sacarose. Além destes dados, outros têm indicado a existência das duas polimerases: autorradiografia de alta resolução tem permitido a detecção da polimerase dependente de Mg^{2+} apenas no nucléolo, enquanto a dependente de Mn^{2+} está distribuída por toda a cromatina (MAUL e HAMILTON, 1967); estrógeno, que tem um efeito inicial de aumentar a síntese de rRNA, estimula inicialmente a atividade da polimerase dependente de Mg^{2+} e só tardiamente se observa aumento da atividade de RNA polimerase dependente de Mn^{2+} (HAMILTON, 1968). Duas atividades de RNA polimerase como descrito acima têm sido detectadas em glândulas salivares de R. angelae, seja para cromatina isolada ou para núcleos isolados (R.V. SANTELLI e H.A. ARMELIN, resultados não publicados). Deve ser mencionado, no entanto, que a existência de duas polimerases tem sido posta em dúvida. Duas outras alternativas para o efeito estimulatório do sulfato de amônio foram propostas: pode inibir nucleases que degradam preferencialmente RNA não ribossomal (STEINER e KING, 1966);

o sal pode estar contribuindo para a dissociação da desoxiribonucleoproteína, e portanto aumentando a capacidade de "template" da cromatina, daí o aumento da síntese de RNA com baixo conteúdo em G-C (CHAMBON, RAMUZ, MANDEL e DOLY, 1968 ; CHAMBON, KASON, RAMUZ e MANDEL, 1968). Não obstante, recentemente, tentativas iniciais de separação e purificação das duas enzimas foram bem sucedidas, (LIAO et alii, 1969). Parece claro que somente novos estudos poderão levar a uma interpretação consistente destes dados. Consequentemente, a interessante hipótese de uma RNA-polimerase especial para rRNA permanece duvidosa. Segue-se que as implicações da enzima postulada nos mecanismos de regulação têm sua discussão prejudicada. Na realidade, estamos ainda no estágio anterior de verificação da hipótese que propõe a existência de uma polimerase especial para rRNA em eucariotos.

As etapas do processamento parecem ter grande importância no controle da síntese de rRNA em células nucleadas. Esta idéia é sugerida por diversos dados experimentais. Em condições não fisiológicas tem-se observado o bloqueio da maturação dos ribossomos, sem que a síntese do precursor primário seja afetada. Assim, células HeLa, quando cultivadas em meio carente em metionina, sintetizam normalmente o precursor de 45s, o qual, no entanto, não é metilado, ficando a maturação dos ribossomos totalmente bloqueada (VAUGHAN et alii, 1967), muito embora a síntese das proteínas ribossomais ocorra normalmente (MADEN, 1968). Em tumores ascíticos, BURDON (1967) verificou que tioacetamida inibe a maturação dos precursores ribossomais, sem interferir com a sua metilação. Isto sugere que o antibiótico age num passo metabólico independente da metilação. À primeira vista pode parecer que estes dados não tenham nenhuma importância fisiológica, não passando do compor-

tamento anormal devido a condições drásticas. O quadro muda de figura se lembrarmos que bloqueio de maturação de rRNA o corre durante a diferenciação de células vegetais e animais, permanecendo uma síntese residual dos precursores. Isto foi verificado no desenvolvimento de embriões de plantas (WATERS e DURE, 1966; CHAKRAVORTY, 1969), na diferenciação de cristalino de boi (PAPACONSTANTINOU e JULKU, 1968) e no desenvolvimento larval de R. angelae (ARMELIN, MENECHINI e LARA 1969b; nesta tese). Como estas informações são importantes para consideração dos dados desta tese este ponto será retornado posteriormente, na discussão deste trabalho.

e.) RNA nuclear

Sob o título RNA nuclear tem se discutido todos os problemas envolvidos no metabolismo de RNA no interior do núcleo das células de eucariotos. Durante certo tempo houve uma tendência geral a admitir que RNA era sintetizado sõmente no núcleo; ficando neste sítio celular apenas transitòriamente, para ser em seguida transferido ao citoplasma, onde realmente desempenhava suas funções (PRESCOTT, 1964). Esta visão simplista da fisiologia nuclear foi definitivamente abandonada, uma vez que está em desacôrd~~o~~ com dados experimentais ora conhecidos. A visão anterior, no entanto, ainda não pode ser substituída por um esquema geral, pois os ressultados conhecidos não oferecem possibilidade de uma síntese satisfatória. Sobre o assunto, diversos artigos têm sido escritos (HARRIS, 1963; GEORGIEV, 1967; ARMELIN, 1969) procurando fazer uma revisão da literatura ou uma avaliação - dos resultados experimentais disponíveis. Novas informações surgiram recentemente, obrigando a uma reconsideração das interpretações anteriores, a qual será tentada no final des

ta introdução.

Foi proposta em 1959 (HARRIS, 1959) a existência de um RNA exclusivamente nuclear. Esta hipótese, nos anos que se seguiram, não encontrou aceitação. Foi somente após 1963, com a grande quantidade de trabalhos feitos no sentido de verificar a natureza do RNA rapidamente marcado em eucariotos, que esta idéia foi revivida e sèriamente considerada. Um dos primeiros resultados que motivaram esta reconsideração foi a observação de que parte do RNA rapidamente marcado, era prontamente degradado, se a síntese de RNA fôsse bloqueada com actinomicina D (SCHERRER, LATHAM e DARNELL, 1963). As especulações em tórno disto sugeriram que o RNA altamente instável, demonstrado pelo bloqueio com actinomicina D, poderia pertencer a uma classe exclusivamente nuclear. A situação ficou claramente definida quando foram feitas experiências de hibridização RNA-DNA com a finalidade de obter respostas claras à questão (SHEARER e McCARTHY, 1967; GEORGIEV, 1967). Na hibridização do RNA nuclear com o DNA nuclear observou-se um nível de saturação da ordem de 5%, enquanto o RNA citoplasmático alcançou um nível de saturação de apenas 1% (SHEARER e McCARTHY, 1967). Os resultados de hibridização por competição entre os dois tipos de ácido nucléico foram concordes com os níveis de saturação observados. Os níveis de saturação indicam que a população do RNA nuclear representa uma parcela maior do DNA nuclear, o que é compatível com a idéia de que parte das seqüências transcritas em tórmos de RNA jamais atingem o citoplasma. Recentemente, MELLI e BISHOP (1969) reexaminaram estas experiências. Os dados anteriores foram perfeitamente confirmados, mas as novas informações trazidas por êstes autores obrigaram a uma revisão das interpretações anteriores. É hoje perfeitamente conhecido que o DNA de eucari

otos em geral está sujeito a uma grande reiteração (BRITTEN e KOHNE, 1968). Foi verificado que o RNA nuclear rapidamente - marcado hibridiza com a fração do DNA que é altamente reiterada. Além disso, as condições em que usualmente se fazem as reações de hibridização só permitem a detecção de híbridos - formados com o DNA altamente reiterado (MELLI e BISHOP, 1969). Por outro lado, a fração não reiterada de DNA parece estar - sendo extensivamente transcrita, como sugerem os resultados de hibridização conseguidos por BRITTEN e KOHNE (1968). Isto quer dizer que os dados iniciais de SHEARER e McCARTHY (1967) realmente dão uma clara demonstração de que grande parte do RNA rapidamente marcado nuclear nunca deixa o núcleo. Mas os níveis de saturação obtidos não dão uma estimativa do grau de heterogeneidade da população de RNA, seja do núcleo ou do citoplasma, uma vez que classes transcritas de DNA não reiterado não estão sendo detectadas devido às condições experimentais.

Como já foi mencionado, o RNA rapidamente marcado em células nucleadas se compõe principalmente de duas classes, se deixarmos de lado o RNA 4s que normalmente, também, é rapidamente marcado. Além do RNA ribossômico, em células de mamíferos dividindo-se ativamente, observa-se nos perfís de radiatividade uma banda largamente polidispersa, cujas espécies mais pesadas atingem coeficientes de sedimentação superiores a 60s (WARNER et alii 1966; SOEIRO et alii 1966). Já em eritroblastos que não mais se dividem, o RNA rapidamente marcado se compõe quase exclusivamente deste RNA pesado, distinto do ribossomal (SCHERRER et alii, 1966; ATTARDI et alii, 1966). As principais propriedades desta classe de RNA são: composição de base semelhante ao DNA; instabilidade metabólica; alto peso molecular; localização nuclear; não mantém relação sim

ples do tipo precursor-produto com mRNA citoplasmático (SCHERRER et alii, 1966; ATTARDI et alii, 1966; WARNER et alii, 1966; SOEIRO et alii, 1966; GRANBOULAN e SCHERRER, 1969). Este tipo de RNA, como o primeiro-precursor ribossomal, é também um produto de transcrição policistrônico, enquanto que o mensageiro funcional em polissomos é monocistrônico⁽⁴⁾. Por outro lado, experiências de hibridização por competição mostraram que o RNA microssomal é parcialmente homólogo ao RNA pesado nuclear (STEVENIN, MANDEL e JACOB, 1969). GEORGIEV (1969) tem resultados indicando que o RNA nuclear rapidamente marcado é um produto imediato de transcrição policistrônica, tendo uma parte da cadeia composta por mRNA que vai ter ao citoplasma e uma outra que não codifica para proteínas, sendo eliminada durante o processamento do mRNA. Esta via nuclear de biossíntese do mRNA que finalmente chega aos polissomos é uma hipótese francamente especulativa, mas bastante plausível em face dos dados até agora conhecidos.

As partículas ribonucleoproteicas que encerram o RNA pesado nuclear são bem menos conhecidas que os precursores de ribossomos. A rigor, somente em fígado de rato foi possível até agora isolar ribonucleoproteínas nucleares com propriedades claramente distintas das apresentadas por partículas ribossomais (SAMARINA, LUKANIDIN e GEORGIEV, 1967; SAMARINA et alii, 1968). Assim mesmo, estas partículas estão caracterizadas apenas pela sua composição química. Trata-se de RNP com um conteúdo protéico superior ao observado para os ribossomos maduros,

- - - - -

4

RNA mensageiro policistrônico e funcionante em polissomos só foi encontrado, até agora, em bactéria (KIHO e RICH, 1965).

cujas proteínas componentes são totalmente distintas das ribossomais quanto ao comportamento eletroforético. Não se sabe nada, no entanto, do comportamento fisiológico destas ribonucleoproteínas, sendo, inclusive, desconhecida sua distribuição intranuclear.

Pode-se admitir, como hipótese de trabalho viável, que estas ribonucleoproteínas são os precursores nucleares - das RNP's citoplasmáticas, que carregam mRNA. Neste sentido, o processamento do mRNA seria a maturação destas RNP's, a partir das partículas ribonucleoprotéicas nucleares que contêm o RNA policistrônico, produto primário de transcrição. Certamente estas idéias só têm bases especulativas, e somente serão válidas se sugerirem um ataque experimental ao problema.

Uma vez confirmada pela prática a existência de um RNA exclusivamente nuclear, um outro grande problema foi aberto: qual o significado da síntese de uma larga quantidade de RNA, que representa um segmento considerável do genoma, é altamente instável e jamais deixa o núcleo? É consenso geral que esta classe de RNA não deve servir como mensageiro para a síntese de proteína. A imediata conclusão a que se tem chegado é que esta classe de RNA deve estar envolvida num mecanismo de regulação da atividade gênica. Mas esta afirmação é tão geral que nada adiciona ao problema e muito menos oferece qualquer orientação para a abordagem experimental. Das tentativas de especulação em torno do problema, a de GEORGIEV (1969) é a mais interessante. Este autor propôs um modelo de organização para as unidades de transcrição em eucariotos. A unidade proposta contém fundamentalmente duas partes: uma é composta de múltiplos loci para interação com proteínas reguladoras, cada locus representando uma unidade

equivalente ao operador do operon bacteriano. A outra é composta por cistrons que codificam para proteínas, sejam enzimas, proteínas estruturais ou proteínas reguladoras. Na transcrição, toda a unidade é copiada em RNA. A parte do RNA complementar aos operadores não contém informações para síntese de proteína e deve ser eliminada durante as etapas pós-transcritivas do metabolismo nuclear de mRNA. Isto está de acordo com o alto peso molecular do RNA rapidamente marcado e com a grande instabilidade do RNA nuclear. Como os operadores são repetidos em unidades de transcrição diferentes, a hipótese fornece uma nova interpretação para a existência da repetição no DNA de eucariotos. Por outro lado, a grande homologia entre as classes de RNA nuclear produzidas por tecidos diferentes (MELLI e BISHOP, 1969) não está em desacordo com o modelo. Desde que os operadores podem se repetir em unidades de transcrição diferentes, como necessidade dos circuitos de regulação, então, os tecidos sintetizando proteínas diferentes, e, portanto, transcrevendo unidades diferentes, podem apresentar grande homologia entre as classes nucleares de RNA. Naturalmente estas características não são suficientes para garantir a validade do modelo. Seu valor está em se tratar de uma interpretação que pode ser testada na prática, engendrando novas formas de experimentação como sugere o próprio GEORGIEV (1969).

f) Etapas do mecanismo de expressão gênica em eucariotos

Estão insinuadas nas considerações anteriores uma série de etapas que podem se constituir no mecanismo básico da expressão gênica em eucariotos. Estas interpretações podem ser explicitamente colocadas no modelo formal esquematizado no quadro que segue :

A sintetização resumida neste esquema certamente não é de aceitação geral entre os biólogos moleculares mas se justifica porque, de um lado, é sustentável em face dos dados conhecidos, e de outro, suas previsões podem ser testadas na prática, pelo menos em princípio. Algumas considerações finais devem ser feitas no sentido de complementar a breve revisão aqui introduzida.

Replicação diferencial em DNA diferente de rRNA é uma questão reaberta ultimamente (EBERT, 1968). O único caso até agora relatado foi o que ocorre nas glândulas salivares de R. angelae observado recentemente (MENECHINI et alii. 1969; MENECHINI, 1969). Estas observações indicam que o DNA que

sofre replicação diferencial é aparentemente responsável pela síntese de RNA nuclear. Estas interpretações são, entretanto de natureza preliminar, podendo ser revistas depois que estas experiências forem realizadas. A importância da questão é clara pois toca o problema fundamental da estabilidade do genoma em eucariotos. Muito embora o problema envolva polêmicas antigas, que têm sido reavivada periodicamente mais ou menos nas mesmas bases, é possível adiantar umas especulações sob novos aspectos. O único caso bem conhecido de replicação diferencial diz respeito à amplificação do rDNA, como foi discutido anteriormente. Aqui a amplificação visa^a atender exclusivamente à maior demanda de "template" para transcrição. Por isso parece estar ocorrendo apenas na ovulogênese, único processo que necessita de síntese de uma grande massa de rRNA num período de tempo bem restrito. Esta situação não se verifica para a maior parte do mRNA, que aparece sempre em baixas concentrações (a população toda não perfaz 2% do total citoplasmático), não necessitando por esse motivo de amplificação do DNA responsável pela sua síntese. Em situações particulares como a dos reticulócitos, o mRNA para hemoglobina deve aparecer em concentrações relativamente grandes. Esta ocorrência pode exigir em determinado momento da diferenciação da linhagem hematopoiética uma certa amplificação de cistrons, para garantir a síntese do mRNA de hemoglobina com velocidade adequada. Isto estaria de acordo com a replicação de DNA não comprometida com a divisão celular que está envolvida na indução de síntese de hemoglobina por eritropoietina, como descrito por PAUL e HUNTER (1969). A verificação desta ocorrência ainda não pôde ser feita pela dificuldade prática, até agora insuperável, de se obter inequivocamente o mRNA de hemoglobina (LABRIE, 1969). Não obstante,

não é de se esperar grande amplificação dos genes para hemoglobina, se é que ocorre alguma. Pequenas amplificações de genes estruturais podem, entretanto, acarretar uma amplificação maior de DNA que não codifica para a síntese de proteína, mas é transcrito em termos de RNA nuclear. Isto explicaria a amplificação de DNA para síntese de RNA nuclear verificada em R. angelae (MENECHINI, at alii, 1969; MENECHINI, 1969). Se a função da replicação diferencial for apenas atender à amplificação de genes por necessidade de maior quantidade de "template", então, sua importância é secundária nos mecanismos de regulação gênica e diferenciação em eucariotos. Outra seria a importância se a replicação diferencial estivesse envolvida na seleção dos genes a serem expressos (ARMELIN, 1969). Esta idéia é, no entanto meramente conjectural, não tendo nenhum aval da prática e por isso deve ser afastada, pelo menos por enquanto.

O termo informossomo foi introduzido por SPIRIN para designar RNP encerrando mRNA, encontrada em embrião de peixe e de ouriço do mar (NEMER e SPIRIN, 1965; SPIRIN, 1966). Este autor introduziu e pôs ênfase no conceito de mRNA mascarado, entendido como mRNA mantido no citoplasma, estável e inativo. Foi postulado que mRNA mascarado poderia aparecer em informossomos (RNP com coeficientes de sedimentação inferiores ao de ribossomo), oligossomos (associação de mRNA com alguns ribossomos) ou polissomos inativos. O conceito de mRNA mascarado tem grande importância, pois supõe-se que o controle da expressão gênica ao nível da tradução tem papel fundamental na embriogênese.

O estudo da síntese de RNA na embriogênese do mutante anucleolado de Xenopus laevis, sugeriu que mRNA pode ser

também armazenado sob a forma de uma espécie policistrônica (BROWN e GURDON, 1966). Isto implicaria em que as fases de processamento do mRNA também têm importância para os mecanismos de controle gênico durante a embriogênese. É possível que as duas etapas do mecanismo de expressão gênica em eucariotos: processamento e transcrição, sejam usadas como passo de regulação do fluxo de informações durante a diferenciação embrionária. O controle ao nível da tradução parece, no entanto, melhor documentado.

SLATER e SPIEGELMAN (1968) verificaram que a quantidade e o padrão de distribuição de "template" não varia quando se compara RNA total de óvulo não fertilizado, blástula ou gástrula de equinoides. Estes resultados indicam que o controle da expressão gênica no desenvolvimento destes animais está sendo exercido primariamente ao nível da tradução. Como o sistema de síntese protéica está ativo (GROSS, 1967; STAVY e GROSS 1969a e 1969b; KEDES e STAVY, 1969) e há mRNA com capacidade de "template" em quantidade adequada, a síntese de proteína no óvulo deve estar bloqueada devido a um mascaramento do mRNA. Por outro lado KEDES e GROSS (1969) verificaram que nas fases de desenvolvimento de ouriço do mar não ocorre armazenamento de mRNA no citoplasma sob a forma de oligossomos ou polissomos inativos. Estes fatos sugerem que mensageiros são "mascarados" no citoplasma tanto de óvulo como das primeiras células do embrião, sob a mesma forma, talvez uma ribonucleoproteína independente de ribossomo. Deve-se acrescentar ainda, que mRNA pode ser encontrado transitòriamente sob a forma estável, inativo e não associado a ribossomos, em células diferentes de óvulos ou blastômeros. Isto é o que se observa em células HeLa, nas quais durante a divisão celular a síntese de proteína se reduz a um mínimo e os polissomos se desagregam. Quando a síntese de proteína é retomada nas células filhas, parte dos polissomos carregam

mRNA preservado da célula mãe (HODGE, ROBBINS e SCHARFF, 1969). Em vista disso é provável que o armazenamento temporário de mRNA no citoplasma na forma inativa e não ligado a polissomo ocorra, em maior ou menor extensão, em qualquer tipo de célula. Estas considerações mostram que é conveniente focalizar nossa atenção sobre a ribonucleoproteína que pode garantir esse comportamento observado para o mRNA de eucariotos. Em vista disso, é interessante tentar desenvolver um conceito de partícula ribonucleoprotéica que encerra o mRNA em células nucleadas. Em artigo recente, SPIRIN (1969) faz uma tentativa deste tipo, reavaliando a idéia que introduzira anteriormente (SPIRIN, 1966). O conceito de informossomo proposto por este autor é equivalente ao que emerge desta discussão. Informossomo é definido como a RNP, produto final do processamento do mRNA no núcleo, o qual começa com a ribonucleoproteína resultante da associação de proteínas especiais com o RNA nascente, durante a transcrição de cada unidade de transcrição. A parte protéica desta partícula garante-lhe o papel de veículo do mRNA do núcleo para o citoplasma e permite-lhe controlar o armazenamento temporário do mRNA no citoplasma, bem como deve ter uma participação ativa na iniciação de síntese protéica. O grande problema na verificação prática das inferências colocadas aqui é que até agora não foi possível isolar e caracterizar qualquer partícula citoplasmática como o informossomo conceituado. Em diversos casos tem sido possível a obtenção de dados sugerindo a existência no citoplasma de uma ribonucleoproteína encerrando mRNA e diferente de ribossomos (PERRY e KELLEY, 1968; KAFATOS, 1968; HENSHAW, 1968). Mas a dificuldade está em que o rompimento da estrutura celular parece possibilitar a formação de agregados artificiais de RNA e proteína (GIRARD e BALTIMORE, 1967; PLAGEMAN, 1969). Estas limitações, entretanto, certamente não são dificuldades insuperáveis que possam impedir a verificação experimental das interpreta-

ções aqui sugeridas.

A visão esboçada nesta introdução pode dar uma idéia de que a organização do RNA em eucariotos está se aclarando e que estamos muito próximos de montar um esquema básico convincente. É preciso ter em mente que esta idéia pode ser falsa. Para esclarecer, devemos lembrar que diversas informações ^{foram} ~~pro~~positadamente ignoradas nesta síntese, em parte porque estas informações nada ajudam na interpretação dos resultados desta tese e também porque não se enquadram em nenhum ponto da síntese que foi elaborada. Estas informações se referem a classes de RNA de baixo pêso molecular diferentes das ribossomais já referidas. O tRNA embora seja o melhor conhecido do ponto de vista estrutural é muito pouco conhecido quanto à sua biossíntese. A distribuição para os cistrons de tRNA ainda não foi suficientemente estudada; os dados de EDSTRÖM e DANEHOLT (1967) devem ser reconsiderados no sentido de demonstrar que se trata de tRNA de fato e não outra classe nuclear de baixo pêso molecular. Como a maturação ocorre no citoplasma (BURDON, CLASON, 1969; BERNHARDT e DARNELL, 1969) não é de se esperar que tRNA seja sintetizado por um caminho semelhante ao observado para rRNA. Mais intrigantes, todavia, são as espécies de RNA exclusivamente nucleares que têm sido descritas por diversos autores. Trata-se de RNA distinto do rapidamente marcado e de alto pêso molecular. Duas linhas de evidência têm indicado a existência de classes de RNA exclusivamente nucleares de baixo pêso molecular e aparentemente estáveis. Uma delas resulta da análise do RNA encontrado em cromatina de embriões vegetais e animais. Estas experiências indicaram a presença no complexo nucleoproteico da cromatina, de uma classe de RNA de baixo pêso molecular, heterogênea quanto às sequências de base e ligada covalentemente a proteínas (HUANG, 1967; BONNER e WIDHOLM, 1967). Os autores que têm estudado esta classe de RNA

atribuem-lhe um papel na regulação gênica, possivelmente como reconhecedor de sequências de DNA (BONNER et alii, 1968). A outra linha de evidência tem surgido de resultados conseguidos com a análise acurada de RNA nuclear através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Estes resultados revelam a existência de uma classe de RNA nuclear de baixo peso molecular, heterogênea, aparentemente estável e não associada covalentemente a nenhum outro tipo de macromolécula (PRESTAYKO e BUSCH, 1968; WEINBERG e PENMAN, 1969; MORIYAMA et alii, 1969). Os resultados conhecidos até agora nada sugerem a respeito da função desta classe de RNA. Em artigo recente, BRITTEN e DAVIDSON (1969) propõem um modelo de controle da atividade gênica em organismos superiores. Este modelo postula a existência de uma classe de RNA que serve como ativador de genes. Estes mesmos autores sugerem que o RNA de baixo peso molecular encontrado exclusivamente em núcleo e cromatina pode ter esta função. O importante a salientar é que estes dados são ainda insuficientes para avaliações duradouras, mas representam sem dúvida informações que indicam a existência de classes de RNA com comportamento não previsto pelas discussões anteriores. O progresso das pesquisas neste campo pode trazer ainda dados imprevisíveis que podem modificar drasticamente as interpretações até agora sustentáveis. Como conclusão, podemos adiantar que é preciso ter em mente que os resultados conhecidos até o momento podem estar refletindo apenas alguns dos aspectos fundamentais da organização do RNA em eucariotos.

g) Finalidades deste trabalho

Para que o estudo dos "puffs" cromossômicos de R. angelae realmente contribua para o conhecimento da fisiologia cromossômica, dependemos de identificar produtos dos genes, cuja a

tividade é indicada por estas estruturas cromossômicas. O primeiro passo neste caninho é procurar espécies de proteínas e de RNA's cujo aparecimento coincida com o desenvolvimento de "puffs" determinados. O estudo dos padrões de proteínas sintetizadas pelas glândulas salivares durante o desenvolvimento larval foi iniciado recentemente e ainda está em sua fase preliminar (A.G. BIANCHI, resultados não publicados). Já a procura de variações na síntese de RNA durante o desenvolvimento de R. angelae é empreendimento iniciado há mais tempo (LARA e HOLLANDER, 1966). LARA e HOLLANDER (1966) verificaram uma aparente redução na síntese de rRNA quando do aparecimento dos grandes "puffs" dos cromossomos B e C (Períodos IV e V). Os mesmos autores chamaram a atenção para a ausência de um precursor ribossômico de 45s em R. angelae. A interpretação destes dados, entretanto, era, nessa época, difícil. Devido a isso tornou-se urgente um estudo sistemático dos padrões de síntese de RNA durante o desenvolvimento larval. Era especialmente necessário elaborar um método de extração de RNA suficiente para uma clara detecção das variações nos padrões de síntese. Além disso, este método deveria permitir a purificação de frações de RNA específicas de períodos diferentes do desenvolvimento larval de R. angelae. Estas finalidades foram cumpridas no transcorrer do trabalho relatado nesta tese.

Além destas finalidades, imposições inevitáveis do estudo da biologia molecular de R. angelae, o autor teve outras intenções. Foi intenção explícita deste trabalho tomar as glândulas salivares de R. angelae como um modelo de organismo nucleado. Neste sentido, evitamos restringir o planejamento da abordagem experimental às vantagens óbvias que o sistema oferece como modelo de estudo. O plano inicial pretendia investi-

gar num modelo de invertebrado problemas básicos da organização do RNA em eucariotos. Particularmente, pensávamos focalizar os problemas do RNA nuclear e das ribonucleoproteínas diferentes de ribossomo. Este plano foi apenas parcialmente cumprido. Não obstante, trouxe dados de significação, cujas implicações são consideradas na discussão desta tese.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

a) Animais

As larvas de R. angelae foram cultivadas sob condições de laboratório conforme anteriormente descrito (LARA, TAMAKI e PAVAN, 1965). Todas as experiências descritas neste trabalho foram executadas com larvas do 4º estágio. Todas as larvas de um grupo originário da postura de uma única fêmea desenvolvem-se sincronicamente. Grupos diferentes com a mesma idade cronológica, podem, entretanto, diferir na idade fisiológica. Por este motivo, e também para uma caracterização inequívoca da idade dos animais usados nas experiências, o 4º estágio do desenvolvimento larval foi dividido em 6 períodos, arbitrariamente delimitados por importantes ~~eventos~~ fisiológicos e por variação do comportamento das larvas. Em geral, os animais usados pertenciam ao 3º, 4º, 5º ou 6º período; em alguns casos, foram usadas larvas do 2º período. Vejamos os dados que orientam a caracterização desses períodos. O início do 3º período é caracterizado pelo início de formação do futuro pupário coletivo, o que corresponde a larvas com idade de 46 a 49 dias. Nestas ^{as} células das glândulas salivares estão em ativo crescimento, exibem um nucléolo bem formado em torno da base do cromossomo X e não apresentam "puffs" gigantes. Os períodos 4º e 5º se caracterizam pelo aparecimento de "puffs" gigantes nos cromossomos politênicos das glândulas salivares, dos quais os mais distintos são os grandes "puffs" dos cromossomos B e C, cujos desenvolvimentos foram largamente estudados por BREUER e PAVAN (1955). Estes períodos também se caracterizam pela regressão do nucléolo e aparecimento de corpúsculos tipo micro-nucléolos, possivelmente resultantes da desagregação do nucléolo primitivo. O

início do 4^o período é demarcado pelo início do desenvolvimento do "puff" B-2 o que corresponde a larvas de 50 a 53 dias. O desenvolvimento do grande "puff" do cromossomo C delimita o 5^o período, com duração aproximada de 24 horas, ocorrendo em larvas de 54 a 58 dias. Segue-se o 6^o e último período que se encerra com a muda pupal, quando as larvas atingem uma idade de 58 a 62 dias. As glândulas salivares, que são órgãos exclusivamente do estágio larval, sofrem histólise no decorrer da metamorfose. Para informações mais detalhadas a respeito da biologia de R. angelae, pode-se recorrer ao trabalho de GUARACIABA e TOLEDO (1967). Dados citológicos fundamentais a respeito das glândulas salivares são encontrados no trabalho de PAVAN (1965).

b) Administração de isótopos

A administração de isótopos às larvas foi feita a través de injeções diretas na hemocèle do animal. Agulhas de injeção foram feitas com microcapilares de 15 λ (Drumond Scientific Co. Broomall Pa. USA). Para isso uma das extremidades foi afilada e o tubo foi demarcado para volumes de 2 λ . A incorporação era interrompida no tempo desejado colocando os animais sobre gelo moido. As glândulas salivares eram imediatamente dissecadas e colocadas em solução fisiológica gelada para Rhynchosciara (ARMELIN, MENECHINI e LARA, 1969), onde permaneciam até o tratamento posterior.

c) Extração do RNA

Foram feitas experiências sistemáticas para encontrar o processo mais adequado para a extração do RNA das glândulas salivares de R. angelae. Para se chegar a um mé

todo que reunisse condições mínimas de funcionamento, foram experimentadas diversas alternativas, das quais a literatura especializada é pródiga. As principais observações obtidas com estas experiências estão descritas em resultados. Aqui é feito um relato do processo padrão que serviu ao desenvolvimento deste trabalho. Este processo é suficientemente prático para permitir que diversos lotes de tecido sejam tratados si multaneamente e em pouco tempo, condição necessária para servir ao tipo de estudo que foi efetuado. Além disso este método permite uma extração eficiente das diversas classes de RNA, minimizando a ação das nucleases endógenas.

As glândulas salivares, imediatamente após a disseção, são homogeneizadas rapidamente num homogeneizador, tipo Potter-Elvehjem em tampão TMN 7 (Tris 50 mM, NaCl 50 mM e $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,4) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% (40 glândulas por 3 ml de tampão). Em seguida um volume igual de fenol saturado com o tampão TMN-7 é adicionado. Estas operações levam de 40 a 50 segundos e é importante que sejam feitas rapidamente para reduzir a degradação devida às RNases endógenas. A homogeneização pode ser feita eficientemente, na ausência de detergente, da mesma maneira. A mistura de fenol e homogeneizado é agitada mecanicamente por 5 a 10 minutos e centrifugada. Para separação das fases basta uma centrifugação de 1 ou 2 minutos a aproximadamente 10000 g. A fase aquosa é recolhida para tratamento posterior. A fase orgânica e interfase são reextraídas com igual volume de tampão TMN-8 (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 1 mM pH 8,3). A segunda extração permite recolher uma segunda fase aquosa enquanto que a fase fenólica e interfase são guardadas para novo tratamento. As duas fases aquosas conseguidas são, em separado, novamente desproteinizadas com fenol. Todas as opera

ções aqui são feitas à temperatura de 0 a 4°C. Seguindo-se à segunda desproteínização as fases aquosas podem ser misturadas ou mantidas independentes, conforme o interesse da experiência. Misturadas ou não, são tornadas 150 mM em NaCl e os ácidos nucleícos são precipitados por adição de dois volumes de etanol, mantendo-se a -15°C por, pelo menos, 4 horas, para precipitação eficiente. RNA em concentrações tão baixas quanto 5 a 10 μ g/3 ml é precipitado quantitativamente, se fôr mantido por, pelo menos, 24 horas a baixa temperatura. Os precipitados são coletados por centrifugação e lavados duas vezes com uma mistura de etanol TMN-7 (2:1 em volume). Logo em seguida são dissolvidos em TMN-7, incubando-se por 30 minutos a 37°C com DNase (20 μ g/ml). Este tratamento enzimático é passo rotineiro do processo; em casos especiais (RNA para hibridização e exame cuidadoso do perfil de sedimentação do RNA rapidamente marcado) foi feito um tratamento adicional com pronase (20 μ g/ml) por 30 minutos, também a 37°C. Estes tratamentos são seguidos de dois ciclos de desproteínização com fenol e precipitação final com etanol como descrito acima. Finalmente, o ácido nucléico obtido é dissolvido num volume conveniente de Tris 10 mM, NaCl 100 mM pH 7,4.

As extrações descritas acima deixam para trás uma pequena porção do RNA celular que não é extraído nessas condições. Esta fração do RNA é extraída se a temperatura fôr aumentada. A fase fenólica e interfase, após as extrações a baixa temperatura, são submetidas a nova extração com igual volume de TMN-8 e SDS 1%, agora à temperatura de 65-70°C (extrações efetuadas a temperaturas que vão até 30-35°C, são tão ineficientes quanto as efetuadas a 0°C). Após centrifugação, a fase aquosa é recolhida e submetida aos mesmos tra-

tamentos descritos para as fases aquosas obtidas a frio. A interfase e fase fenólica restantes podem ser ainda reextraídas com igual volume de tampão Tris 50 mM NaCl 500 mM, - $MgCl_2$ 1 mM, SDS 1%, pH 8,3 agora à temperatura de 85°C. A fase aquosa desta última extração é processada como as anteriores. A fase fenólica é finalmente abandonada, enquanto a interfase é recolhida para verificar se ainda mantém quantidade significativa de radioatividade. Para tanto, a mistura da interfase mais fase fenólica é misturada a igual volume de álcool, agitada e centrifugada. O sobrenadante é eliminado e o material da interfase, sedimentado, é lavado três vezes com álcool, ressuspensão em TMN-7, imediatamente precipitado com $HClO_4$ para 0,2N e em seguida dissolvido em KOH 0,3N para tratamento igual ao descrito no item e deste capítulo.

d) Fracionamento celular

O enorme tamanho dos núcleos (50 a 100 μ de diâmetro) e a grande resistência à ruptura mecânica apresentada pelo envoltório das glândulas salivares, tornam-nas de difícil processamento através dos métodos clássicos de fracionamento celular. Assim os métodos que dão ótimos resultados - para HeLa (PENMAN, 1966) e para células de fígado de rato (BLOBEL e POTTER, 1966) não dão bons resultados no caso das glândulas salivares de R. angelae. Diante disto foi necessário desenvolver um processo adequado ao fracionamento celular deste tecido. A alternativa conseguida por nós é descrita abaixo.

i) Obtenção das frações nuclear e citoplasmática

Para uma experiência de fracionamento as glându-

las salivares são obtidas por dissecação como descrito acima e colocadas sobre uma rede de coleta de plâncton (Nylon, 529 malhas por cm^2), presa a um anel de polietileno, imersas em solução fisiológica para Rhynchosciara. Quando a quantidade desejada é obtida (usualmente 400), a rede com as glândulas é imersa em uma solução de pronase 10 mg/ml em tampão T-0,25 (Tris 50 mM, NaCl 10 mM, MgCl_2 1 mM, sacarose 250 mM, pH 7,4), onde é mantida por 3 minutos a 0°C . Nas primeiras experiências o tampão T-0,25 continha MnCl_2 . Esta substância é no entanto, indesejável, uma vez que foi detectada uma atividade de RNase a pH 7,4 dependente de Mn^{2+} , nas glândulas salivares de R. angelae (R. SANTELLI resultados não publicados). Depois deste tratamento a rede com as glândulas é lavada por imersão em quatro diferentes frascos contendo uma solução de albumina de soro bovino (Fração V) em tampão T-0,25 (20 μg de albumina/ml). Finalmente, o anel de polietileno é adaptado a um frasco apropriado contendo 5 ml da T-0,25 com NPT-6 0,5% (ZALTA et alii, 1962), onde as glândulas ficam totalmente imersas. As glândulas são, então, esmagadas contra a rede com a ajuda de um bastão de vidro com a extremidade achatada. Os envoltórios glandulares, tubos quitinosos e células ainda inteiras são retidos pela rede e abandonados, enquanto que os núcleos e o citoplasma das células rompidas passam através das malhas para a solução do frasco. A suspensão de núcleos é transferida para um tubo de vidro e centrifugada a 250g por 5 minutos. O sobrenadante constitui a primeira fração citoplasmática, chamada S-1. O sedimento é ressuspenso em 3 ml de T-0,25 com NPT-12 1% (ZALTA et alii, 1962), sendo vigorosamente agitado, por 30 segundos e então centrifugado como anteriormente. O sobrenadante constitui a segunda fração citoplasmática chamada S-2. O sedimento

(fração N) contém de 60 a 80% dos núcleos originalmente presentes nas glândulas salivares.

ii) Preparação da fração microssomal

A fração citoplasmática S-1 (obtida como descrito acima) é centrifugada por 30 minutos a 12.000 g. O sedimento mitocondrial é abandonado e o sobrenadante é recolhido para posterior centrifugação. A fração pós mitocondrial é então centrifugada a 37500 rpm por 2 horas no rotor SW 39 da ultracentrífuga Spinco Modelo L. O sedimento obtido desta centrifugação constitui a fração microssomal. O sobrenadante contém apenas RNA solúvel.

iii) Preparação de cromatina

Neste processo o fracionamento celular foi efetuado por outro caminho. As glândulas salivares foram homogeneizadas em T-0,25, num homogeneizador tipo Dounce e na ausência de detergentes. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 g por 5 minutos; o sobrenadante foi recolhido e o precipitado foi lavado com T-0,25. O sobrenadante da 2ª etapa foi misturado ao 1º. Através deste processo a célula foi dividida em duas frações:

1) o precipitado, que constitui uma preparação de cromatina; a morfologia cromossômica não é mantida durante o processo, mas esta fração cromossômica apresenta uma boa atividade de RNA polimerase (R. SANTELLI, resultados não publicados); 2) os sobrenadantes combinados, que contêm o restante do material celular. Nesta fração não foi possível detectar DNA, mas cerca de 90% do RNA celular está aqui contido.

e) Determinação de ácidos nucleicos proteínas

Para determinação da quantidade de ácidos nucleicos em hemogeneizados de tecido, em preparações de RNA ou resíduos de interfase fenólica foi seguido o processo de FLECK e MUNRO (1962).

O hidrolisado alcalino foi sempre dividido em duas partes: uma é acidificada com HClO_4 (para medidas espectrofotométricas) e a outra com ácido tricloroacético (para medidas de radioatividade, uma vez que HClO_4 dá alto "quenching"). Usualmente RNA purificado tinha sua massa estimada através da absorbância a 260 m μ , assumindo que a esse comprimento de onda uma solução 45 μ g/ml, a pH 7,4 tem absorbância igual a 1,000. Quando necessário, DNA foi desado através da reação colorimétrica com difenilamina segundo o processo de GILES e MYERS (1965). Proteínas foram dosadas através do processo de LOWRY et alii (1951), seguindo as modificações propostas por OYAMA e EAGLE (1956).

f) Determinação de radioatividade

Radioatividade incorporada em RNA foi determinada precipitando-se as macromoléculas em TCA 5% a frio (nos casos de soluções com baixas concentrações, como frações de gradiente de sacarose, adicionou-se rotineiramente 2 ou 3 gotas de RNA comercial de levedura 1 mg/ml como carregador). O precipitado era coletado em filtros de nitrocelulose (Millipore HAWP ou Schleicher & Schull Tipo B-6), secos a 60°C e colocados em frascos de vidro para cintilação líquida. Aos frascos eram adicionados 10 ml da solução de cintilação cuja composição é POPOP 100 mg e PPO 4g por litro de tolueno.

As medidas de radioatividade foram feitas em um **Espectrômetro** Parckard Tri-Carb operando com 10% de eficiência para H^3 ("unquenched Standard") ou num Espectrômetro Nuclear Chicago Mark I operando com a eficiência de 54% para H^3 ("unquenched Standard"). Os valores determinados nunca foram transformados para radioatividade absoluta por dificuldade de determinação da verdadeira eficiência das contagens. Através do método da razão de canais, foi controlada a variação de "quenching" de uma amostra para outra. Nos casos de radioatividade incorporada em substância solúvel em ácido, como por exemplo hidrolizado de RNA, alíquotas da solução foram pipetadas diretamente em filtros de fibra de vidro (Whatman GF/A). Os filtros eram então, secos a $60^{\circ}C$, colocados em frascos de plásticos, aos quais se adicionava 10 ml da solução cintilante, citada acima mas com hidróxido de hiamina a 0,5%, e agitados violentamente (SCHERRER et alii, 1966).

g) Determinação da composição de bases do RNA.

O RNA foi hidrolizado em KOH 0,3N por 18 horas a $37^{\circ}C$, sendo em seguida adicionado $HClO_4$ para pH = 1, eliminando-se o $KClO_4$ precipitado por centrifugação. A separação dos nucleotídeos foi feita por eletroforese segundo MARKHAM e SMITH (1952). A eluição foi feita com HCl 0,05N e os níveis dos nucleotídeos foram determinados através das absorbâncias específicas fornecidas por KATZ e COMB (1963).

h) Reação de Hibridização RNA-DNA

A técnica usada foi a introduzida por GILLESPIE e SPIEGELMAN (1965). A preparação do DNA foi efetuada através de um processo desenvolvido recentemente (MENECHINI, (1969);

MENECHINI et alii, 1969). A reação (cada filtro em 2 ml de SSC 6X ocorreu por 40h a 63°C. O tratamento com RNase foi feito (50 µg/ml) por 1h, à temperatura ambiente com agitação branda.

i) Análise de sedimentação

As análises de sedimentação de RNA foram feitas em gradientes lineares de sacarose 15-30% em Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM pH 7,4 a 2°C. Para uma boa resolução as centrifugações feitas no rotor SW 39 da ultracentrífuga - Spinco modelo L levam 5h a 37.000 rpm, coletando-se de 30 a 35 frações, através de perfuração no fundo do tubo. Para análise de partículas ribonucleoproteínas foram usados gradientes lineares de sacarose 15-30% em Tris 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM pH 7,4. Para exame de perfil de polissomos bastam 40 minutos de centrifugação a 32000 rpm no rotor SW 39. Para boa resolução da banda de ribossomos livres e subpartículas ribossomais há necessidade de 3h de centrifugação.

Os gradientes foram feitos através de duas seringas hipodérmicas montadas num sistema adequado, que dispõe de um dispositivo mecânico para movimentar os êmbolos. Com este sistema conseguem-se gradientes perfeitamente lineares conforme determinações refratométricas.

Os coeficientes de sedimentação foram estimados pelo processo de MARTIN e AMES (1961), o qual pode ser aceito como válido para gradientes de sacarose 15-30% no intervalo de variação de S que interessa no caso de ácidos nucleicos (McCONKEY, 1967). Para estimar os valores de S para os RNA ribossômicos de R. angelae foi tomado RNA radioativo de E. coli como referência.

j) Reagentes

Uridina- H^3 (7,2 C/mM, 1 mC/ml) foi obtida da New England Nuclear Corporation, Boston, Massachusetts, EEUU. Uridina- H^3 (20 C/mM, 0,5 mC/ml) comprada da Schwarz Bio Research Inc., Oranburg, New York, EEUU. L-metionina-metil- H^3 (5,14 C/mM, 1 mC/ml) produto da Schwarz Bio Research foi gentilmente cedida pelo Dr. R. R. BRENTANI.

A RNase pancreática (recristalizada 5 vezes) usada foi comprada da Sigma Chemical Corporation. As soluções foram preparadas em NaCl 0,15M, pH 5,0, sendo aquecidas por 10 minutos a 80°C para eliminar a DNase contaminante (Marur, 1961).

A DNase pancreática (purificada eletroforéticamente) usada foi o produto da Worthington Biochemical Corporation DNase I livre de RNase. As soluções foram preparadas em água destilada.

A pronase foi comprada da Calbiochem California - Corporation for Biochemical Research. As soluções foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente, imediatamente antes de usar, para eliminar atividade de nucleases.

Actinomicina D foi gentilmente cedida pelo Dr. K. Scherrer.

Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi comprado da Sigma Chemical Co., e purificado segundo SCHMIDT (1957).

NPT 6 e NPT 12, (ZALTA et alii, 1962), detergentes não iônicos, foram gentilmente cedidos pelo Dr. F. Gros.

Nonidet-P40, detergente não iônico, foi gentilmente cedido pelo Dr. A. L. de Resende da Shell do Brasil S. A.

2,5-difeniloxazol (PPO), 14-bis-2-(5-feniloxazolil)-benzeno (POPOP), hidróxido de hiamina (solução 1 M em metanol) foram comprados da Packard Instrument Company, Inc.

Para preparar soluções de cintilação, o tolueno fornecido pela Química Moura Brasil S/A, procedente de J.T.Baker Chemical, mostrou-se um produto adequado.

A sacarose para gradientes foi comprada da J.T.Baker Produtos Químicos Ltda. Para minimizar a contaminação possível de nucleases as soluções foram tratadas com macaloid (STANLEY e BOCK, 1965), colocando-se aproximadamente 10 mg por 20 ml de solução de sacarose, sendo eliminado por filtração em filtros de nitrocelulose.

O fenol foi sempre purificado imediatamente antes de usar, por destilação fracionada (fração de 178, 5°C) do produto técnico.

O álcool também foi obtido a partir do produto técnico por destilação simples.

Todos os outros reagentes usados neste trabalho foram produtos "P.A.", em geral procedentes da British Drug Houses, Inglaterra, ou da E. Merck A. G., Alemanha.

III RESULTADOS

a) Dados gerais sôbre o RNA extraído das glândulas salivares de R. angelae.

Como foi descrito em métodos, o RNA das células das glândulas salivares de R. angelae pode ser obtido em diversas frações por sucessivas etapas de extração com fenol e SDS, durante as quais se varia o pH e a temperatura da mistura. Muito embora as condições de extração variem e a natureza do RNA obtido em cada fase do processo mude, o espectro de absorção em U.V. é praticamente o mesmo para todas as frações obtidas. Um espectro típico é apresentado na Figura 1. Um máximo de absorbância a 260 m μ e um mínimo a 232 m μ foram regularmente encontrados; a absorção na banda de 200 a 210 m μ não se mostrou reprodutível. A relação $A_{260} \text{ m}\mu / A_{230} \text{ m}\mu$ normalmente variou entre 2,3 e 2,4, enquanto a relação $A_{260} / A_{280} \text{ m}\mu$ oscilou entre 1,9 e 2,2. Estas relações foram usadas rotineiramente como critério inicial de pureza das preparações; produtos cujas relações desviaram dos valores citados foram sistematicamente abandonados. Houve particular atenção em evitar ao máximo contaminação das preparações com DNA e proteína. Fazendo do tratamento com DNase um passo rotineiro do processo de purificação, evitou-se que as preparações tivessem uma contaminação significativa de DNA. Uma única extração com fenol na ausência de SDS já fornece um RNA com menos que 2% de proteína, determinada pelo método de LOWRY et alii (1951).

Os coeficientes de sedimentação das classes de rRNA e sRNA foram estimados pelo método de MARTIN e AMES (1961)

FIGURA 1. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE RNA EXTRAÍDO DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE R. ANGELAE.

O RNA foi extraído a pH 7,4 conforme descrito em Métodos. Para determinação do espectro o RNA foi dissolvido em Tris-HCl 0,01M, NaCl 0,1M, pH 7,4.

tendo RNA radioativo de E. coli como padrão. Tomando para rRNA e sRNA de E. coli os coeficientes 23S, 16S e 4S respectivamente, os coeficientes correspondentes para o RNA de R. angelae foram 28s, 18s e 4s conforme os perfís da Figura 2. A relação entre as áreas dos picos de 28s e 18s nos perfís de UV é um indicador muito sensível da degradação do RNA durante o processo de extração (NOLL e STUTZ, 1968). Este fato fornece um meio simples de controle da degradação das preparações: quanto mais degradado o RNA, menor a relação entre as áreas do pico de 28s e de 18s. Os valores mais altos desta relação obtidos para as frações de RNA de R. angelae extraídas a pH 7,4, com SDS e a 0°C estiveram em torno de 2,0, mas os valores mais frequentes estiveram entre 1,5 a 2,0. Deve-se levar em conta que nos resultados descritos neste trabalho, a relação entre as áreas de 28s e 18s pode estar afetadas pelas condições de extração, pois os dois componentes do rRNA podem não estar sendo extraídos quantitativamente. O RNA preparado pelo método aqui descrito apresenta razoável estabilidade. Quando dissolvido em Tris 0,01M, NaCl 0,1M pH 7,4 pode ser mantido a -15°C. Armazenadas nestas condições, as preparações se mantêm estáveis por pelo menos quinze dias, mesmo depois de alguns descongelamentos. Depois de um mês de estocagem, no entanto, as preparações apresentam perfís de sedimentação irregulares, talvez devido à degradação. Ao que tudo indica esta degradação se deve a traços de RNase presentes nas soluções armazenadas.

FIGURA 2. PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DE RNA DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE R. ANGELAE JUNTO COM RNA DE E. COLI MARCADO COM C^{14} .

O RNA de R. angelae corresponde à primeira fração extraída a pH 7,4 conforme descrito em Métodos. O RNA de E. coli foi marcado por duas gerações com guanossina- C^{14} e citosina- C^{14} , tendo sido extraído de acordo com Naono e Gros (1967). A quantidade de RNA de E. coli (atividade específica 60000 cpm/ μ g), introduzida no gradiente, não interfere com o perfil de UV. Trata-se de um gradiente linear de sacarose 15 a 30% em EDTA 0,01M, NaCl 0,05M, pH 7,4; condições de centrifugação conforme descrito em Métodos.

b) Fracionamento do RNA celular através do método de extração com fenol

A extração com fenol e SDS permite um fracionamento do RNA das glândulas salivares de R. angelae. Uma extração inicial com fenol na ausência de detergente fornece de 70 a 80% do RNA celular. A adição de detergente não melhora significativamente o rendimento da extração inicial. Entretanto, seu uso é de fundamental importância para a extração do RNA rapidamente marcado. Como mostra a Figura 3-a, na ausência de SDS obtêm-se espécies de RNA marcado quase exclusivamente na banda de 4 a 5 s, as quais provavelmente representam RNA citoplasmático. Na presença de detergente e a pH 7,4 (Figura 3-b) obtêm-se diversos picos de radioatividade, os quais devem corresponder a espécies de origem nuclear. Quando o resíduo deste último tratamento é extraído a pH 8,3 como descrito em Métodos, obtêm-se de 5 a 10% do RNA total. Esta fração é, porém, mais rica em classes polidispersas e tem uma atividade específica ^{maior} que as anteriores, como mostra a Figura 3-c. Repetidas extrações sem detergentes e a pH 7,4 fornecem frações de RNA com características idênticas às da primeira extração (ver tabela II). Isto indica claramente que a introdução de SDS e o aumento de pH são essenciais para a extração do RNA rapidamente marcado.

O método de extração descrito acima indica condições ótimas tanto para a extração do RNA ribossomal (citoplasmático e precursores nucleares), como para o RNA solúvel. Outras classes de RNA são também extraídas, nas representam uma pequena porção do RNA rapidamente marcado, pois grande parte de radioatividade incorporada permanece ainda ligada ao material da interfase fenólica.

NÚMERO DAS FRAÇÕES

FIGURA 3. PERFIS DE SEDIMENTAÇÃO DE FRAÇÕES DE RNA MARCADO COM URIDINA- H^3 OBTIDAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES POR SUCESSIVAS EXTRAÇÕES NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE SDS.

56 larvas de 5º período foram injetadas com $1,2\lambda$ de uridina- H^3 (7,2 C/mM, 1mC/ml), permitindo-se a incorporação por 1 h. O perfil a corresponde à primeira extração com TMN-7, na ausência de SDS. b e c correspondem às frações obtidas nas extrações seguintes com SDS a 1%, TMN-7 e TMN-8 respectivamente. Condições de centrifugação descritas em Métodos.

Um meio eficiente para extrair o RNA marcado remanescente na interfase após as extrações descritas é aumentar a temperatura do meio de extração. A tabela I reúne os dados de experiências em que larvas do 2º e 4º períodos incorporaram uridina- H^3 por 3 horas e o RNA foi obtido das glândulas salivares através de sucessivas extrações fenólicas, a diferentes temperaturas, como foi descrito em Métodos. Os resultados mostram claramente que as frações extraídas a baixa temperatura compreendem a maior parte de RNA celular, cujas características foram descritas acima. A fração obtida a 65°C é quantitativamente pouco importante, mas tem muito maior atividade específica que as frações obtidas a frio. A fração de 85°C é pouco importante quando comparada com a obtida a 65°C e pode representar um resíduo da extração a 65°C ou outra classe de RNA, a qual exige condições mais drásticas de extração. Os dados atuais não permitem distinguir entre estas duas possibilidades.

Um outro processo que poderia permitir a obtenção do RNA refratário à extração a frio, seria o tratamento da interfase com solventes de lípides, após as extrações com fenol frio (KIMURA, TOMODA e SIBATANI, 1965). Este meio se mostrou pouco eficiente, como se nota pelos resultados da Tabela II. Apesar de ter sido possível conseguir um RNA com atividade superior ao das primeiras frações, cerca de 25% da radioatividade incorporada permaneceu na interfase residual após o tratamento. O uso de p-aminosalicilato para extrair o RNA refratário à extração com fenol a frio, conforme descrito por KIDSON, KIRBY e RALPH, (1963), mostrou-se em R. angelae totalmente ineficiente (ver Tabela III).

TABELA I

Condições de extração	Períodos do 4º estágio					
	4º Período				2º Período	
	Experiência 1		Experiência 2		Experiência 3	
pH; temp.	radioat.	cpm/ μ g	radioat.	cpm/ μ g	radioat.	cpm/ μ g
7,4; 0°C	725741	102	398160	87	50340	59
8,3; 0°C	-*	-*	27530	132	-*	-*
8,3; 65°C	126129	895	56410	698	20060	272
8,3; 85°C	7917	773	-*	-*	2255	-*

FRAÇÕES DE RNA OBTIDAS POR SUCESSIVAS EXTRAÇÕES FENÓLICAS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 2º E 4º PERÍODOS QUE INCORPORARAM URIDINA- H^3 POR 3 h.

Em cada experiência foram usadas 200 larvas, recebendo cada uma 2 λ da solução do isótopo. Nas experiências 1 e 3 foi usada uridina- H^3 (7,2 c/mM, 1 mC/ml) e na experiência 2 uridina- H^3 (20 c/mM, 0.5 mC/ml); para detalhes experimentais ver Métodos.

*Dados não computados.

TABELA II

Condições da extração	RNA obtido em μ g	Radioatividade extraída em cpm	% da radioatividade total em cada fração	Atividade específica em (cpm/ μ g)
TMN-7; 1ª	364	3400	40,0	9
TMN-7; 2ª	35	300	3,5	9
EDTA-acetato	138	2710	31,5	20
Exr. alcalina do resíduo	—*	2150	25,0	—*

EXTRAÇÃO DE RNA DAS GLÂNDULAS SALIVARES SEGUNDO KIMURA, TOMODA E SIBATANI (1965) MODIFICADO.

19 larvas (machos^{**}) do 4º período foram injetadas com 2 λ de uridina- H^3 (20 C/mM. 0,5 mC/ml), permitindo-se a incorporação por 30 minutos. Inicialmente foram feitas duas extrações com fenol nas condições descritas em Métodos (tampão Tris-HCl 0,05M, NaCl 0,05M, Mg(Ac)₂ 0,001M, pH7,4 [TMN-7] com SDS a 1%). Em seguida foi eliminada a fase fenólica e a interfase foi lavada por centrifugação uma vez com TMN-7 uma vez com etanol e 3 vezes com éter. Depois de seco o material da interfase foi ressuspensão em NaAc 0,05M, EDTA 0,001M pH6,2 (com SDS a 1% e macaloid 3 mg/ml), permanecendo por 3 h. a 6°C. A seguir foi feita uma desproteinização com igual volume de fenol saturado com o tampão acetato-EDTA. Os ácidos nucleicos foram precipitados da fase aquosa com etanol e a interfase residual foi extraída em meio alcalino, conforme descrito em Métodos. Para medir a quantidade de RNA e radioatividade extraídas com TMN-7 e tampão EDTA-acetato, o material precipitado com álcool foi hidrolisado em meio alcalino, como descrito em Métodos.

*Dados não computados.

**Regularmente, as experiências relatadas neste trabalho foram feitas com larvas fêmeas, excepcionalmente nos casos das experiências desta Tabela e da Tabela III as larvas empregadas eram machos.

TABELA III

Condições de extração	RNA obtido em μg	Radioatividade extraída em cpm	% da radioatividade total em cada fração	Atividade específica em cpm/ μg
TMN-7 : 1ª	498	5550	51,2%	11
TMN-7 : 2ª	18 (?)	310	2,8%	17
4- AS : 1ª	zero	zero	zero	zero
4- AS : 2ª	zero	zero	zero	zero
Ext. alcalina do resíduo	- *	4990	46,0%	- *

EXTRAÇÃO DE RNA DAS GLÂNDULAS SALIVARES SEGUNDO KIDSON, KIRBY e RALPH (1963) MODIFICADO.

28 larvas (machos do 4º período) foram injetadas com 2λ de uridina- H^3 (20 C/mM, 0.5 mC/ml) permitindo-se a incorporação por 30 minutos. Inicialmente foram feitas duas extrações como na experiência da Tabela II (fenol com 8-Hidroxiquinolina 0.10%). Em seguida foram efetuadas mais duas extrações, ainda com TMN-7, mas com 4-amino-salicilato [4-AS] a 6%. A interface residual foi finalmente submetida à extração alcalina. Para determinação de radioatividade, as frações de RNA obtidas foram submetidas à hidrólise alcalina. Para detalhes experimentais verificar Métodos.

* Dados não computados.

Certamente o RNA não extraível com fenol a frio pertence a uma classe diferente de rRNA. Além das já citadas características de rápida marcação e difícil extração, existem outros dados indicando tratar-se de classe com natureza diferente da ribossômica.

A Tabela IV traz dados a respeito da composição de base das frações de RNA extraídas a quente e a frio. Verifica-se que o conteúdo em G + C é menor para as frações extraídas a quente. Quando se compara resultados obtidos com larvas de idades diferentes, larvas mais jovens apresentam maior nível em guanina mais citosina que as mais velhas. Sabe-se que o conteúdo em G + C nos rRNA de R. angelae é de 47% e no DNA é de 35% (R. MENECHINI resultados não publicados). Estes dados sugerem que as frações extraídas a 65°C estão contaminadas com rRNA. A tabela V mostra como varia o rendimento das diversas extrações com a idade da larva. A porcentagem do RNA total extraída a 65°C é claramente superior para larvas mais jovens. Esta variação não deve ser reflexo da variação nas frequências das classes de RNA extraídas a 65°C, durante o desenvolvimento larval de R. angelae mas, provavelmente, devido a uma maior contaminação de rRNA nas extrações a quente correspondentes a larvas mais jovens, o que estaria de acordo com os resultados de composição de base citados acima.

A estabilidade metabólica das classes de RNA obtidas por extrações a frio e a quente **foi** comparada através da inibição por actinomicina D. Para esta finalidade, três grupos de larvas foram injetadas com uridina-H³ e a incorporação foi permitida por 30 minutos. Depois deste tempo um dos grupos foi sacrificado e as larvas dos outros dois

TABELA IV

Frações de RNA	Composição em bases em %				
	U	G	C	A	G + C
extração a frio, pH 7,4	29,6	31,8	15,3	23,9	47,1
extração a 65-70°C 3º período	33,7	28,8	16,0	21,2	44,8
extração a 65-70°C 4º período	36,0	26,0	15,0	23,0	41,0

COMPOSIÇÃO DE BASES DE FRAÇÕES DE RNA EXTRAÍDAS A 65-70°C DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3º E DO FIM DO 4º PERÍODO.

As extrações e as determinações das composições de bases das diversas frações de RNA foram efetuadas de acordo com os processos descritos em Métodos. Os resultados apresentados na tabela são médias de dois valores experimentais.

TABELA V.

Condições de extração: pH; temp.	2º período	3º período	4º período
7,4; 0°C	88%	89%	94%
8,3; 0°C	4,1%	4,4%	4,2%
8,3; 65°C	7,9%	6,6%	1,8%

RENDIMENTO DAS DIFERENTES FRAÇÕES DE RNA OBTIDAS POR EXTRAÇÕES FENÓLICAS SUCESSIVAS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 4º ESTÁDIO.

Glândulas de 200 larvas foram usadas em tôdas as experiências. Os resultados da tabela representam porcentagens do total de RNA extraído. Para detalhes experimentais ver Métodos.

foram injetadas com actinomicina-D; destes grupos, um foi sacrificado 30 minutos após a injeção de antibiótico e o outro 150 minutos depois. Os resultados apresentados no gráfico da Figura 4 indicam, seguramente, que a maioria das classes de RNA extraídas a 65°C são instáveis, enquanto que o RNA extraído a frio é perfeitamente estável, durante o tempo de observação da experiência. Está implícito nestes resultados que a fração extraída a quente é heterogênea.

As frações de RNA extraídas a 65°C, tanto para RNA do 2º como do 4º período, apresentam alta capacidade de hibridização. A Tabela VI apresenta os resultados de uma experiência de hibridização entre RNA e DNA extraídos de larvas do fim do 4º período. Estes resultados são compatíveis com classes de RNA distintas de rRNA e sRNA.

A Figura 5 apresenta perfis de sedimentação de frações de RNA extraídas a 65°C, de glândulas salivares de larvas do 3º período, que incorporaram uridina- H^3 por 10 e 20 minutos respectivamente. O perfil de 10 minutos é um pouco mais polidisperso, mas ambos são muito semelhantes apesar dos tempos diferentes de incorporação. Nos dois casos, as espécies mais frequentes têm coeficientes de sedimentação da ordem de 16 a 18s. Perfis de sedimentação equivalentes a estes foram encontrados para larvas do 4º período. Quando o RNA celular foi extraído numa única fração com fenol a 65°C obteve-se uma preparação que apresentou um perfil em U.V. indicando séria degradação do rRNA. Isto mostra que o aumento de temperatura favorece a ação das nucleases endógenas, uma vez que rRNA puro é estável a esta temperatura. Estes dados fornecem uma explicação para a baixa frequência de espécies com altos coeficientes de sedimentação nos

FIGURA 4. VARIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES DE RNA OBTIDAS POR EXTRAÇÕES FENÓLICAS, A 0°C, E A 65°C DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3º PERÍODO, APÓS INJEÇÃO DE ACTINOMICINA-D.

Cada larva de 3 lotes de 19 indivíduos foi injetada 2 λ de uridina- H^3 (72 c/mm, 1mC/ml). 30 minutos depois da injeção do isótopo, um lote foi sacrificado. Cada larva dos outros dois lotes foi injetada com 2 λ de uma solução de actinomicina D (60 μ g/ml); um lote destes foi sacrificado 30 e o outro 150 minutos após injeção do antibiótico. RNA foi extraído das glândulas, obtidas dos 3 lotes de larvas, em duas frações: uma corresponde a mistura de duas extrações a 0°C, na presença de SDS com TMN-7 e TMN-8; a outra fração corresponde a uma extração a 65°C com TMN-8 e SDS a 1%. As atividades específicas destas frações foram colocadas no gráfico em função do tempo após a injeção do isótopo.

TABELA VI

RNA ug/ml	% de DNA hibridizado
4,5	0,5
9,0	0,9
23,0	1,7
45,0	4,3

HIBRIDIZAÇÃO DA FRAÇÃO DE RNA EXTRAÍDA A QUENTE DE GLÂNDULAS DO 4º PERÍODO COM DNA DE GLÂNDULAS DO MESMO PERÍODO.

O DNA foi preparado de acôrdo com MENECHINI (1969). O RNA foi extraído de glândulas salivares de larvas que incorporaram uridina- H^3 por 3 horas, utilizando-se o mesmo processo usado na experiência da Tabela I. Apenas a fração de RNA (890 cpm/ μ g) extraída a 65°C foi usada. As condições de hibridização estão descritas em Métodos.

NÚMERO DAS FRAÇÕES

FIGURA 5. PERFIS DE SEDIMENTAÇÃO DE FRAÇÕES DE RNA, MARCADO COM URIDINA- H^3 , EXTRAÍDAS A $65^{\circ}C$ DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3 $^{\circ}$ PERÍODO.

A experiência foi efetuada segundo o processo descrito na legenda da Tabela IX. Condições de sedimentação descritas em Métodos.

perfis de radioatividade das frações extraídas a 65°C, mesmo com tempos pequenos de incorporação.

Os resultados descritos acima, no seu conjunto, sugerem fortemente, que o RNA rapidamente marcado, extraível somente com condições severas, pertence à classe que em outros sistemas tem sido chamado RNA tipo - DNA [D - RNA] (GEORGIEV et alii, 1962; ATTARDI et alii, 1966; BROWN e GURDON 1964 e 1966; SCHERRER et alii, 1966; WARNER et alii, 1966; SOEIRO, BIRNBOIM e DARNELL, 1966; HOUSSAIS e ATTARDI, 1966; STÉVENIN, MANDEL e JACOB, 1969).

As propriedades: 1) dificuldades de extração com fenol a frio (GEORGIEV et alii, 1963) 2) alta capacidade de hibridização (MELLI e BISHOP, 1969) 3) instabilidade metabólica (ATTARDI et alii, 1966 SCHERRER et alii, 1966) têm sido atribuídas a uma classe de RNA nuclear. Estas propriedades também são exibidas pelos RNA's extraídos a 65-70°C das glândulas salivares de R. angelae. Era de se esperar, portanto, que esta fração de RNA fôsse de origem nuclear. Os resultados, que são descritos na seção seguinte, indicam que nesta fração o RNA rapidamente marcado é predominantemente de origem nuclear. Mas, os resultados indicam ainda que, em glândulas salivares, o citoplasma também, parece conter classes de RNA refratárias à extração com fenol a frio,

c) RNA de frações subcelulares

A Figura 6 apresenta perfis de sedimentação do RNA radioativo extraído da fração nuclear e das frações citoplasmáticas S-1 e S-2, obtidas através do processo de fracionamento celular descrito em Métodos. As larvas usadas nesta experiência eram do 4^o período e incorporaram uridina- H^3 por 1 hora. O RNA extraído em frações N, S-1 e S-2 representam respectivamente 5%, 71% e 24% do total de RNA extraído. As atividades específicas observadas foram respectivamente: 145 cpm/ μ g 56, cpm/ μ g e 22 cpm/ μ g. Em experiência equivalente feita com larvas da mesma idade, que incorporaram uridina- H^3 por 3 horas, observou-se que os RNAs extraídos das frações S-1 e S-2 apresentaram a mesma atividade específica.

O perfil de radioatividade da Figura 6-a corresponde à fração nuclear (N) e mostra um pico de 30s bem definido, uma larga banda de 18s a 5s, assim como radioatividade significativa nas frações com coeficientes de sedimentação maiores que 30s. O perfil da Figura 6-b corresponde à fração citoplasmática S-1 e apresenta um pico de radioatividade bem definido, coincidindo com o pico de UV atribuído a sRNA. Além deste, formas polidispersas dão uma larga banda de radioatividade de 28s a 4s, com um ombro a 16s. O perfil da Figura 6-c corresponde à segunda fração citoplasmática (S-2). Aqui se observa a predominância de formas polidispersas, uma banda em torno de 8s, um pico a 20s e grande proporção de radioatividade nas primeiras frações do gradiente.

O sobrenadante pós-mitocondrial da fração citoplasmática S-1, após adição de Nonidet P-40 para 1%, apresenta perfil de ribonucleoproteínas em gradiente de sacarose 15-30%

como os exibidos na Figura 7a e 7b. Êstes resultados foram obtidos com larvas de 5^o período que incorporaram uridina- H^3 por 3 horas. Com apenas 40 minutos de centrifugação (Figura 7a) o pico de U.V. devido a monossomas aparece em frações próximas ao topo do gradiente. Aos ribossomos livres foi atribuído coeficiente de sedimentação 80s, o qual tem significado apenas nominal, uma vez que não foi feita nenhuma estimativa do valor verdadeiro. Pelas frações que vão de 1 a 22 se distribuem os polissomos, num intervalo de aproximadamente 120 a 280s. Mas poliribossomos com coeficientes de sedimentação ainda maiores estão presentes, pois no fundo do tubo, apareceu quantidade apreciável de radioatividade. Três horas de centrifugação, num gradiente de mesmo tipo, é o tempo adequado para uma boa resolução da banda em torno do pico de monossoma, como mostra o perfil da Figura 7b. No perfil de U.V. aparecem dois picos devidos às subunidades ribossomais, às quais foram atribuídos os coeficientes nominais de sedimentação 60s e 40s. A radioatividade presente nas partículas ribonucleoprotéicas que aparecem nas frações dêstes gradientes é devida à incorporação em rRNA e mRNA. Neste período, com êste tempo de incorporação, no entanto, o rRNA está pobremente marcado, como indicam os resultados descritos nas seções seguintes dêste capítulo.

Os perfís de sedimentação da Figura 8, correspondem a uma experiência ainda com larvas do 4^o período, que também incorporaram uridina- H^3 por 3 horas. A centrifugação desta fração celular em presença de EDTA 1mM⁽⁴⁾ leva à sensível diminuição da radioatividade no fundo do tubo e nas primeiras frações do gradiente (Figura 8a). Êstes dados sugerem que esta fração celular não contém ribonucleoproteína com altas constantes de sedimentação que

NÚMERO DAS FRAÇÕES

NÚMERO DAS FRAÇÕES

FIGURA 7. PERFIS DE SEDIMENTAÇÃO DE RIBONUCLEOPROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS DAS CÉLULAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES.

50 larvas de 5º período foram injetadas com uridina- H^3 (7,2 c/mm, 1mc/ml); permitindo-se a incorporação por 3h. Após a incorporação as glândulas foram dissecadas e misturadas a igual numero de glândulas "frias". A mistura de glândulas foi submetida ao fracionamento celular descrito em Métodos, recolhendo-se apenas a fração pós-mitocôndrial de S-1. Aliquotas desta fração foram tornadas 1% em Nonidet P40 e imediatamente aplicadas a 2 gradientes de sacarose 15-30%. A centrifugação foi efetuada por 40 minutos (a) e por 180 minutos (b); demais condições descritas em Métodos. O material que atingiu o fundo do tubo de gradiente foi resuspenso em 0,5ml de Tris-HCl 10mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.

FIGURA 8. EFEITO DE EDTA e Mg^{2+} NA ESTABILIDADE DAS RNP's CITOPLASMÁTICAS DAS CÉLULAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES.

O processo observado nesta experiência foi idêntico ao descrito na Figura 7, apenas que as larvas eram do fim do 4º período. A fração pós-mitochondrial de S-1, depois da adição de Nonidet p40 foi aplicada a dois gradientes de sacarose 15-30%, sendo um com EDTA 1mM (a) e outro com $Mg(Ac)_2$ 15 mM (b). Em ambos os casos a centrifugação durou 3 h.; demais condições como descrito em Métodos. Fração F: material resuspenso do fundo do tubo de centrifuga.

não sejam poliribossomos. A centrifugação desta mesma fração em Mg^{2+} 15 mM (Figura 8b) trouxe interessantes resultados. Nestas condições o equilíbrio de associação das subunidades ribossomais é deslocado no sentido do ribossomo e inclusive uma agregação de ribossomos livres pode ocorrer, mesmo na ausência de mRNA. Apesar disso, observamos picos pronunciados de radioatividade na banda de 30 a 80s. Uma possível explicação para o fato seria a presença de ribonucleoproteínas, nesta banda do gradiente, encerrando RNA de tipo mensageiro cossedimentado com partículas ribossomais. Tais partículas têm sido descritas para células de embrião de ouriço do mar (SPIRIN e NEMER, 1965, INFANTE e NEMER, 1968), células de cultura (PERRY e KELLEY, 1966 e 1968) células de fígado de rato (HENSHAW, 1968) e células de epiderme de inseto (KAFATOS, 1968). Também o pico das frações de números 25 a 28 na curva de atividade específica da Figura 7b poderia ser devido à presença de partículas deste tipo.

- - - - -

$40 Mg^{2+}$ tem papel importante na manutenção estrutural dos polissomos - (GILBERT, 1963a e 1963b; WARNER, KNOFF e RICH, 1963). Quando polissomos são colocados em solução contendo EDTA, em concentração adequada, ocorre total dissociação da partícula em subunidades ribossomais e mRNA presumivelmente contido numa partícula ribonucleoproteica especial (PERRY e KELLEY, 1968). Por outro lado são conhecidas RNP's com altas constantes de sedimentação, diferentes de polissomo e que não tem rRNA (SAMARINA et alii, 1968; PENMAN, VESCO e PENMAN, 1968), em cuja estrutura, Mg^{2+} parece não ter papel importante. Devido a isso EDTA não exerce qualquer efeito sobre a estrutura destas RNP's. Como RNase, em condições brandas, ataca tanto polissomos como outras RNP's de "alto peso molecular", a melhor forma de se distinguir polissomos de outras RNP's de mesma constante de sedimentação, é o comportamento frente a EDTA.

Com a finalidade de verificar a origem celular do RNA rapidamente marcado, somente extraível com condições drásticas, foi feita a experiência cujos resultados aparecem na Tabela VII. Neste caso as larvas usadas eram do 3º período e uridina- H^3 foi incorporada por 1 hora. Os dados mostram que o RNA marcado, cuja extração é difícil com fenol a frio, é principalmente de origem nuclear. Estes dados estão coerentes com a interpretação dada aos resultados descritos na seção anterior. Estariam também de acordo com a sugestão de outros autores (GEORGIEV et alii, 1963; HADJIVASSILIOU e BRAWERMAN, 1965) os quais admitiram que o RNA rapidamente marcável se localizaria no núcleo, sendo sua extração difícil devido ao seu comprometimento com a estrutura da cromatina. As frações citoplasmáticas, no entanto, também contribuem, para a fração do RNA somente extraível a quente das células inteiras. Estas espécies de origem citoplasmática não são, entretanto, rapidamente marcáveis. É possível que este tipo de RNA tenha comportamento diferente de rRNA, por estar contido em partículas ribonucleoprotéicas citoplasmáticas diferentes de ribossomo, como as sugeridas pelos perfis das figuras 7b e 8a. Resultados recentes de HADJIVASSILIOU e BRAWERMAN (1967) concordam com estes aqui descritos.

A dificuldade de extração do RNA rapidamente marcável nuclear não é determinada por uma associação desta classe de RNA com a cromatina. Isto é sugerido pelos resultados da experiência cuja descrição se segue. Larvas do 3º período foram injetadas, com uridina- H^3 , permitindo-se a incorporação por 1 hora. As células das glândulas salivares foram fracionadas em cromatina e sobrenadante, por um processo que propositadamente evitou ação de detergentes ou de enzi

TABELA VII

Frações celulares	Temperatura da extração	Atividade específica cpm/µg
Fração citoplasmática S-1	zero - 5°C	32
	65 - 75°C	64
Fração citoplasmática S-2	zero - 5°C	22
	65 - 70°C	66
Fração nuclear	0 - 65°C + 65 - 70°C	500

ATIVIDADES ESPECÍFICAS DOS RNA'S OBTIDOS DAS FRAÇÕES NUCLEAR E CITOPLASMÁTICAS DAS CÉLULAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3º PERÍODO. EXTRAÇÕES FENÓLICAS A FRIO E A QUENTE.

Larvas do 3º período foram injetadas com 2λ de uridina- H^3 (7,2 C/mM, 1m C/ml) permitindo-se a incorporação por 1 h. As larvas foram então sacrificadas, as glândulas salivares foram dissecadas e misturadas a igual número de glândulas obtidas de animais não injetados do mesmo grupo. Logo em seguida, as glândulas foram fracionadas como descrito em Métodos. O RNA foi extraído do citoplasma a 0°C em duas extrações sucessivas a pH 7,4 e pH 8,3 na presença de SDS a 1% e as frações obtidas foram misturadas. O resíduo dos primeiros tratamentos foi extraído a 65°C e pH 8,3 na presença de SDS a 1%. O dado de atividade específica para o RNA nuclear representa a atividade específica da mistura de duas extrações a frio mais a obtida com fenol quente a pH 8,3; todas estas extrações foram levadas a efeito em presença de SDS.

mas, sendo a ruptura celular executada apenas por efeito mecânico, conforme descrito em Métodos. Verifica-se pelos dados da tabela VIII que a grande maioria do RNA rapidamente marcável extraível a quente apareceu no sobrenadante e não na cromatina. Isto indica que esta classe de ácido nucléico está encerrada em estrutura celular, não estreitamente ligada à cromatina, talvez uma ribonucleoproteína nuclear como a descrita por SAMARINA et alii (1968) para fígado de rato. O RNA extraído a 55°C do sobrenadante deste fracionamento celular apresenta um perfil de sedimentação (Figura 9) equivalente ao da fração correspondente extraída de células inteiras (Figura 5a e 5b).

É interessante mencionar que quando núcleos isolados pelo método de pronase eram homogeneizados em homogeneizador tipo Dounce e centrifugados, o sedimento continha cromossomos, cuja morfologia era bem preservada, e ainda núcleos íntegros. No sobrenadante, no entanto, foi possível observar partículas ribonucleoprotéicas, polidispersas num gradiente de sacarose e sensíveis a RNase em condições brandas (Figura 10). O comportamento de sedimentação e a sensibilidade à RNase sugerem tratar-se de partículas de ribonucleoproteínas não ribossômicas, possivelmente RNP nuclear, que encerra o RNA não ribossômico e rapidamente marcado.

d) Padrão de síntese de RNA no 3º período do 4º estágio do desenvolvimento larval

Quanto ao padrão de síntese de RNA no 3º período, as glândulas salivares de R. angelae se comportam como células de cultura em crescimento (SCHERRER e DARNELL, 1962). Trabalho anterior de LARA e HOLLANDER (1967) mostrou que nesta

TABELA VIII

Frações celulares	Condições de extração	μg de RNA extraído	Radioatividade Total por fração	% da radioatividade extraída por fração	Atividade específica em cpm/ μg
Sobrenadante	7,4 - 0°C	1443	101000	42,0	70
	7,4 - 0°C/SDS	57	4350	1,8	76
	8,3 - 0°C/SDS	—*	1710	0,7	—*
	8,3 - 65°C/SDS	114	84300	35,0	739
Sobrenadante interfase	hidrólise alcalina	—*	6150	2,6	—*
Cromatina	8,3 - 0°C +8,3 - 65°C	142	41750	17,3	294
Cromatina interfase	hidrólise alcalina	* —	1580	0,6	—*

INCORPORAÇÃO DE RADIOATIVIDADE EM RNAs EXTRAÍDOS SOB DIVERSAS CONDIÇÕES DA CROMATINA E SOBRENADANTE DAS CÉLULAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3º PERÍODO.

60 larvas foram injetadas da maneira descrita na Tabela VII; depois de 1 h. de incorporação, as glândulas foram dissecadas e misturadas com 120 glândulas de animais não injetados. O 12º todo de glândulas foi então fracionado em cromatina e fração sobrenadante. O RNA foi extraído de cada fração celular por sucessivas extrações a diferentes pH's e temperaturas como indicado. A radioatividade remanescente na interfase foi obtida por hidrólise alcalina. Para maiores detalhes ver Métodos.

FIGURA 9. CARACTERÍSTICAS DE SEDIMENTAÇÃO DO RNA EXTRAÍDO A 65°C DO SOBRENADANTE OBTIDO APÓS CENTRIFUGAÇÃO DA CROMATINA DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3º PERÍODO.

O sobrenadante da cromatina foi obtido conforme o processo descrito na Tabela VIII. O RNA centrifugado corresponde à fração chamada 8,3-65°C na Tabela VIII. Condições de sedimentação descritas em Métodos.

NÚMERO DAS FRAÇÕES

FIGURA 10. PERFIS DE SEDIMENTAÇÃO DE RIBONUCLEOPROTEÍNAS DO NUCLEOPLASMA DAS CÉLULAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 4º PERÍODO.

O processo seguido nesta experiência para o fracionamento celular é o descrito em Métodos com uma modificação: as células foram rompidas num homogeneizador tipo Dounce (grande folga). Os núcleos recolhidos foram rempidos em outro Dounce (folga muito pequena) em presença de NPT 12 a 0,5%. Os cromossomos foram centrifugados e o sobrenadante foi recolhido. Uma alíquota do sobrenadante foi aplicada ao gradiente a. Outra alíquota foi incubada por 20 minutos a 0°C com RNase 4 μ g/ml e em seguida aplicada ao gradiente b. A centrifugação foi feita em gradientes de sacarose 15-30% em Tris-HCl 10mM, H_2L_2 10mM, $MgCl_2$ 1mM, pH 7,4, por 100 minutos a 37000 rpm.

época do desenvolvimento larval o conteúdo de RNA por célula nas glândulas salivares aumenta abruptamente. Além disto, durante a incorporação de uridina- H^3 observa-se um aumento linear da atividade específica do RNA celular por até 24 h. (MENECHINI, ARMELIN e LARA, 1968). Estes resultados sugeriam uma intensa síntese de rRNA, o que está de acordo com os perfis de sedimentação de RNA marcado mostrados na Figura 11. Estas preparações foram obtidas por extração do RNA com fenol a frio, de glândulas salivares de larvas do 3º período, que incorporaram uridina- H^3 por 10, 20, 30, 90, 270 e 360 minutos. A análise da sequência de marcação das diversas frações destes gradientes traz informações valiosas a respeito do metabolismo de RNA neste tecido.

Com 10 minutos de incorporação (Figura 11a) o grosso do RNA marcado se constitui de espécies polidispersas de origem nuclear, que são parcialmente extraídas nestas condições. Já com 20 minutos de incorporação (Figura 11b) se denota claramente um pico a 37s, devido ao precursor nuclear comum do rRNA de 28s e 18s. Além deste, ocorrem um pico a 23s, que corresponde a frações enriquecidas num possível precursor intermediário do rRNA de 18s, e uma larga banda de 10 a 16s que vai se manter nos perfis mesmo depois de 360 minutos de incorporação. No perfil de 30 minutos (Figura 11c) observa-se o aparecimento de um pico destacado a 30s, o que é atribuído ao acúmulo de um precursor intermediário do 28s, o qual, por ser mais estável que os precursores de 37s e 23s, vai dominar o perfil de radioatividade após 90 minutos de incorporação (Fig. 11d). rRNA maduro de 18s já aparece em quantidade relativamente grande com 90 minutos de incorporação (Figura 11d) e com 270 minutos de incorporação (Figura 11e) já ocorreu síntese suficiente de ambos os rRNA maduros

FIGURA 11 (legenda na pg. seguinte)

FIGURA 11. ANÁLISE DE SEDIMENTAÇÃO DAS CLASSES DE RNA, MARCADAS COM URIDINA- H^3 E EXTRAIDAS COM FENOL A $0^{\circ}C$ DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3 $^{\circ}$ PERÍODO.

Larvas, em grupos de 30, foram injetadas com 2λ de uridina- H^3 (7,2 C/mM, 1m C/ml) e sacrificadas à diferentes tempos: a) 10 min; b) 20 min; c) 30 min; d) 90 min; e) 270 min; f) 360 min. As extrações foram efetuadas somente a $0^{\circ}C$ de acordo com o descrito em Métodos, mas as frações obtidas com TMN-7 e TMN-8 foram misturadas antes da precipitação com etanol. Condições de sedimentação descritas em Métodos.

para que os perfis de U.V. e radioatividade coincidam nas bandas de 28s e 18s. Uma clara definição dos picos de 37s e 23s aparece no perfil de radioatividade da figura 12.

A identificação dos precursores nucleares de rRNA é claramente suportada pelo perfil de sedimentação devido a RNA marcado com metionina-metil- H^3 por 30 minutos. Nesta experiência o RNA foi extraído inicialmente na ausência de detergente, seguindo-se uma nova extração na presença de SDS como descrito em Métodos. As atividades específicas das primeira e segunda frações de RNA obtidas foram 1,5 cpm/ μ g e 8 cpm/ μ g respectivamente. O perfil de sedimentação devido à segunda fração aparece na Figura 13. Observa-se claramente picos a 4s e 23s assim como picos na banda de 30s a 37s. É conhecido que metilação é característica apenas das classes de rRNA e tRNA (SRINIVASAN e BORECK, 1966)⁽⁵⁾ e que rRNA é metilado já durante sua síntese (GREENBERG e PENMAN, 1966; MURAMATSU e FUJISAWA, 1969). Estas considerações sugerem que os picos de 23s, 30s e 37s do perfil de metilação da Figura 13 só seriam explicados pela presença de precursores de rRNA nas frações correspondentes no gradiente de sacarose. Se forem aceitas as interpretações dadas acima para os resultados aqui apresentados, então a via de síntese de rRNA nas glândulas salivares de R. angelae pode ser esquematizada da seguinte forma:

5

Recentemente foram encontrados RNA's, diferentes de rRNA e tRNA, exclusivamente nucleares e de baixo peso molecular que também são metilados (WEINBERG e PENNAN, 1969).

FIGURA 12. PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DE RNA MARCADO COM URIDINA- H^3 POR 15 MINUTOS, DE LARVAS DO INÍCIO DO 4º PERÍODO.

50 larvas macho foram injetadas com uridina- H^3 (7,2C/mM, 1mC/ml); das glândulas destes animais o RNA foi obtido por duas extrações sucessivas uma com TMN-7 e outra com TMN-8 (ambas com SDS 1%), sempre a 0°C; as duas frações extraídas foram misturadas antes da precipitação com etanol. A centrifugação foi efetuada nas condições citadas na legenda da Figura 2. Foram colocados no gráfico apenas os dados de radioatividade.

FIGURA 13. PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DE RNA MARCADO COM METIONINA-METIL- H^3 DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3º PERÍODO.

20 larvas foram injetadas com metionina-metil- H^3 (5,14C/mM, 50 μ C/ml) e as glândulas salivares foram dissecadas após 30 minutos de incorporação. Duas frações de RNA foram extraídas com TMN-7: a primeira na ausência de SDS e a segunda com SDS 1%. Este perfil de sedimentação corresponde à segunda fração. Condições de centrifugação descritas em Métodos.

Este esquema concorda muito bem com alguns dados publicados a respeito da síntese de rRNA em tecidos análogos, como as glândulas salivares de Chironomus (EDSTRÖM e DANEHOLT, 1968). Nos seus traços gerais o quadro está de acordo com o proposto para outros sistemas biológicos, como células de ^{cultura de} tecido (PERRY, 1962; SCHERRER e DARNELL, 1962 e PENMAN, 1966), células de tumores ascíticos e de fígado de rato (GEORGIEV et alii, 1963; MURAMATSU, HODNETT e BUSH, 1966). Evidentemente o quadro proposto está limitado nas suas minúcias pelos tipos de métodos usados para a obtenção dos resultados que o suportam. A aplicação, como já foi feito para células HeLa, de técnicas refinadas de fracionamento celular (PENMAN, SMITH e HOLTZMAN, 1966) e de análise de misturas de ácido nucléico (WEINBERG et alii, 1967), trará informações novas e eventualmente poderá levar a modificações no diagrama proposto.

O aparecimento constante da banda de radioatividade de 10 a 16s nos perfis de sedimentação, mesmo depois de 360 minutos de incorporação, deve ser considerado à parte. Uma explicação para estes dados seria que neste período do desenvolvimento larval ocorre mRNA relativamente estável, uma vez que o RNA nuclear é altamente instável. Estas considerações motivaram a procura de espécies de RNA com comportamento semelhante em frações microsossomais de células das glândulas salivares de larvas desta idade. Verificou-se que, mesmo depois de 27 horas de incorporação de uridina- H^3 , o RNA extraído da fração microsossomal (preparada conforme descrito em Métodos), apresentou um perfil de sedimentação (Figura 14) indicando a presença de espécies de RNA de comportamento semelhante ao indicado pelos perfis de sedimentação obtidos para o RNA marcado de células inteiras. Embora os dados experimentais sejam precários, pode-se admitir que as células das glândulas salivares de larvas do 3º período do desenvolvimento apresentam RNA mensageiro relativamente estável. Estas interpretações estão de acordo com os dados de A. G. BIANCHI e R. MENECHINI (resultados não publicados) os quais verificaram que actinomicina D inibe apenas 50% da síntese protéica em larvas do terceiro período.

e) Padrão de síntese de RNA no fim do 4º estágio do desenvolvimento larval

Nos períodos estudados ^{durante} o 4º estágio do desenvolvimento larval, a velocidade de síntese de RNA em glândulas salivares sofre um aumento marcante do 2º para o 3º e 4º período. Este fato é sugerido pela incorporação de uridina- H^3 em RNA no 2º e no 4º período (Tabela I), quando se verifica - que a quantidade de precursor radioativo incorporado é muito

FIGURA 14. PERFIL DE SEDIMENTAÇÃO DE RNA MICROSSOMAL MARCADO COM URIDINA- H^3 .

200 larvas foram injetadas com 5 λ de uridina- H^3 (20C/mM, 0.5 mC/ml) e as glândulas salivares foram dissecadas logo após 27 h. de incorporação. A fração citoplasmática S-1, foi preparada e usada para obtenção da fração microssomal como descrito em Métodos. O RNA microssomal foi obtido numa única fração por extração com TMN-7 na presença de SDS a 1%. Condições de centrifugação descritas em Métodos.

maior no 4^o período. Por outro lado, a incorporação de uridina- H^3 no 3^o e no 4^o período é da mesma ordem de grandeza (Tabela IX). Evidentemente a quantidade de uridina- H^3 incorporada depende do tamanho do reservatório endógeno de UMP. Se o tamanho deste reservatório variar, o nível de incorporação muda, indicando uma variação aparente de velocidade de síntese. Ocorrência deste tipo foi verificada em camundongo (PASERGA, PETERSEN e ESTENSEN, 1966). No caso das glândulas salivares de R. angelae tem-se medido a atividade específica do reservatório intracelular de UMP no 2^o e 4^o período, após a injeção de uridina- H^3 na cavidade do corpo das larvas (M. CORDEIRO e R. MENECHINI, resultados não publicados). Os resultados destas determinações mostraram que a atividade específica do reservatório de UMP, para a mesma quantidade de uridina- H^3 injetada, é maior no 2^o que no 4^o período. Conclui-se, destas informações, que a diferença entre os níveis de incorporação de uridina- H^3 no 2^o e no 4^o período é uma medida subestimada da diferença entre as velocidades de síntese de RNA nos mesmos períodos do desenvolvimento de R. angelae ⁽⁶⁾.

⁶ A relação uridina- H^3 incorporada em RNA por massa de DNA celular serve como uma medida de intensidade de transcrição de uma célula. No desenvolvimento larval de R. angelae a quantidade de DNA por glândula aumenta cerca de 4 vezes do fim do 2^o para o fim do 4^o período (LARA e HOLLANDER, 1967; MENECHINI, 1969). Por outro lado, como os dados desta tese mostram, a incorporação de uridina- H^3 no fim do 4^o período é no mínimo 10 vezes maior que no 2^o período. Isto quer dizer que a intensidade de transcrição nas glândulas salivares, no fim do 4^o período, é, pelo menos, 2,5 vezes maior que no 2^o período.

TABELA IX

Tempo de incorporação (minutos)	3º período (cpm/ 5 glândulas)			4º período (cpm/ 5 glândulas)		
	fenol frio	fenol quente	soma da radio-atividade extraída	fenol frio	fenol quente	soma da radio-atividade extraída
10	919	928	1847	299	1825	2124
20	1011	978	1989	1238	1308	2546

RADIOATIVIDADE EM FRAÇÕES DE RNA OBTIDAS POR SUCESSIVAS EXTRAÇÕES COM FENOL FRIO E QUENTE, DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3º E 4º PERÍODOS.

Lotes de 10 larvas foram tomados; cada larva recebeu uma injeção de 2 λ de uridina- H^3 (7,2 C/mM, 1m C/ml), permitindo-se a incorporação pelos tempos indicados. As glândulas foram dissecadas e o RNA foi obtido através de duas extrações fenólicas: a primeira a 0°C com TMN-7 e SDS a 1%; a segunda extração foi efetuada a 65-70°C com TMN-8. Nos casos das frações extraídas a quente, antes da precipitação com etanol foram acrescentados 150 μ g de RNA frio de glândulas salivares de R. angelae com o papel de carregador. As etapas subsequentes da purificação seguiram o processo padrão descrito em Métodos.

A Figura 15 apresenta curvas de cinética de incorporação de uridina- H^3 em frações de RNA extraídas com fenol para larvas do 3^o, 4^o e 6^o período do desenvolvimento larval. Estes resultados indicam um decréscimo na síntese destas classes de RNA, à medida que a larva se torna mais velha.

Perfis de sedimentação de RNA extraídos a frio para larvas do início do 4^o período e do 5^o período são apresentados na Figura 16. Nestas experiências as larvas incorporaram uridina- H^3 por 15, 60 e 180 minutos. Comparando-se os perfis da RNA de 4^o (Figura 16a, 16b e 16c) com os de RNA de 5^o período (Figura 16d, 16e, 16f) nota-se uma grande redução na síntese dos precursores de rRNA, permanecendo os padrões de marcação muito semelhantes entre si. A redução na síntese dos precursores de rRNA é progressiva e larvas próximas da época da muda pupal (6^o período) exibem perfis de radioatividade totalmente dominados por formas polidispersas de RNA, como é mostrado na Figura 17.

Os resultados apresentados até aqui mostram apenas - uma visão parcial do quadro, pois a análise de sedimentação de RNA marcado por longo tempo trouxe informações bastante surpreendentes. Mesmo após 24 horas de incorporação, RNA's de larvas do início do 4^o período (Figura 18a) assim como de larvas do 5^o período (Figura 18b) apresentaram perfis de radioatividade que não coincidiam com os perfis de U.V. nos picos ribossômicos de 28s e 18s. A mais provável explicação para estes fatos é que, nesta época, a maturação dos precursores de rRNA está bloqueada parcial ou totalmente.

É sabido que a cinética de incorporação de uridina- H^3 para larvas do 3^o período é linear por longo tempo, - mas muda drasticamente no fim do 4^o período para uma cinética de 'platô', alcançado após aproximadamente 3 horas de

FIGURA 15. VARIAÇÃO DAS ATIVIDADES ESPECÍFICAS DAS FRAÇÕES DE RNA, EXTRAÍDAS A FRIO, PARA LARVAS DA SEGUNDA METADE DO 4º ES TÁDIO, DURANTE AS PRIMEIRAS 3 HORAS DE INCORPORAÇÃO DE URIDINA- H^3 .

As atividades específicas colocadas no gráfico correspondem a frações de RNA, extraídas das glândulas salivares pelo processo descrito na Figura 11. Em todos os casos as larvas receberam injeções de 2 λ de uridina- H^3 (7,2 C/mM, 1MC/ml).

FIGURA 17. PERFIS DE SEDIMENTAÇÃO DE RNA MARCADO COM URIDINA- H^3 POR 15 MIN. a) E POR 180 MIN. b) DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 6º PERÍODO.

Os RNA's foram obtidos segundo o protocolo resumido na Figura 11. Condições de sedimentação descritas em Métodos.

FIGURA 18. PERFIS DE SEDIMENTAÇÃO DE RNA's, MARCADOS COM URIDINA- H^3 POR 24h. DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 4º PERÍODO (a) E DO 5º PERÍODO (b).

Larvas em lotes de 25 animais foram injetadas com 2 λ de uridina- H^3 (7,2 C/mm, 1mC/ml), permitindo-se a incorporação por 24 h. O RNA foi extraído das glândulas salivares da maneira descrita na Figura 11. Condições de centrifugação descritas em Métodos.

incorporação (MENECHINI, ARMELIN e LARA, 1968). Esta modificação no padrão de incorporação de uridina- H^3 , ao que tudo indica, ocorre já no início do 4º período. Tal afirmação é sugerida pelos resultados mostrados na Figura 19, indicando que a radioatividade incorporada por glândula salivar permanece constante após aproximadamente 3 horas de incorporação. A variação na cinética de incorporação de uridina- H^3 pode ser explicadas pela inibição de síntese dos precursores de rRNA.

A análise de perfis de sedimentação de RNA obtido de frações citoplasmáticas, marcado por diferentes intervalos de tempo, permite uma verificação direta da síntese líquida de rRNA maduro. Nas Figuras 20 e 21 são mostrados perfis de RNA's citoplasmáticos de glândulas salivares do 3º e 5º período respectivamente. Aquêles devidos a 3 horas de incorporação (Figuras 20b e 21a) são dominados por radioatividade acumulada em picos correspondendo a RNA de 28s, 18s e 4s. Verifica-se que há uma diferença marcante na distribuição relativa de radioatividade entre os picos de 28s e 18s. Assim, nota-se claramente que a razão entre as atividades específicas a 18s e a 28s é muito menor no 3º período (Figura 20b) que no 5º período (Figura 21a).

É geralmente admitido que os precursores do 28s permanecem muito mais tempo no núcleo que os de 18s (MADEN, 1968). Este fato torna possível estimar a velocidade de maturação dos precursores de rRNA, na base das variações de atividade específica do pico de 18s para a atividade específica do de 28s com os tempos de incorporação. Decorre imediatamente destas premissas que as variações observadas para as relações de atividades específicas (Figura 20b e 21a) constituem segura evidência em favor da hipótese de que há

FIGURA 19. CINÉTICA DE INCORPORAÇÃO DE URIDINA- C^{14} EM RNA DE GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 4º PERÍODO.

Para a determinação da cinética de incorporação de uridina- C^{14} , as glândulas salivares de 5 larvas foram rapidamente homogeneizadas em 4,0 ml de NaOH 50 mM a 0°C. Então $HClO_4$ foi adicionado para dar a concentração final de 200 mM em relação a $HClO_4$. Aliquotas de 1 ml desta suspensão foram filtradas em membranas Millipore lavadas 4 vezes com 15 ml de $HClO_4$ 200 mM e secas para determinação de radioatividade (as medidas foram feitas num Geiger-Muller Nuclear Chicago Gas Flow Counter). Todas as soluções usadas neste processo continham uridina não radioativa a 200 $\mu g/ml$. (Processo desenvolvido por R. MENECHINI, não publicado).

FIGURA 20. PERFIS DE SEDIMENTAÇÃO DE RNA, MARCADO COM URIDINA- H^3 , OBTIDO DA FRAÇÃO CITOPLASMÁTICA (S-1) DAS CÉLULAS SALIVARES DE LARVAS DO 3º PERÍODO.

30 larvas foram injetadas com uridina- H^3 (7,2 C/mm, 1mC/ml) permitindo-se a incorporação por 1 h. a) e por 3 h. b). Após decorridos os tempos de incorporação os animais foram sacrificados, as glândulas salivares foram dissecadas e misturadas a igual número de glândulas obtidas de larvas do mesmo grupo não injetadas. O fracionamento celular foi feito como descrito em Métodos, recolhendo-se apenas a porção do mesmo grupo não injetadas. O fracionamento celular foi através de duas extrações com IPN-7 e IPN-8 (ambas a 0°C), as quais foram misturadas antes da precipitação com etanol. Condições de centrifugação descritas em Métodos.

FIGURA 21. PERFIS DE SEDIMENTAÇÃO DE RNA, MARCADO COM URIDINA- H^3 , OBTIDO DA FRAÇÃO CITOPLASMÁTICA (S-1) DAS CELÚLAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE LARVAS DO 5º PERÍODO.

O procedimento experimental seguido nesta experiência foi idêntico ao descrito na legenda da Figura 20. Tempos de incorporação: a) 3 h.; b) 18 h. Condições de sedimentação descritas em Métodos.

uma inibição da maturação de rRNA no fim do 4^o estágio do desenvolvimento larval de R. angelae. A Figura 21b mostra que mesmo depois de 18 horas de incorporação a radioatividade acumulada nas bandas de 19s e 28s é muito menor que aquela acumulada na banda 4s. Estes fatos estão de acordo com o observado para os perfís de radioatividade e U.V., os quais não coincidem mesmo depois de 24 horas de incorporação, tanto no início do 4^o (Figura 18a) como no 5^o período (Figura 18b).

A variação da cinética de incorporação de uridina- H^3 no fim do 4^o estágio do desenvolvimento larval não é totalmente explicada pela hipótese de bloqueio parcial da maturação dos precursores de rRNA. O aumento relativo da síntese de classes de RNA instáveis deve contribuir grandemente para esta variação. Esta idéia é sugerida pelos dados da Tabela VIII. Estes resultados se referem a experiência onde larvas do 3^o e do 4^o período foram injetadas com uridina- H^3 , permitindo-se a incorporação por 10 e 20 minutos. Para cada grupo de larvas, o RNA das glândulas salivares foi extraído em duas frações, uma extraída a frio e a outra a quente. O total de radioatividade extraída em cada caso indica que larvas de idades diferentes incorporaram quantidade muito semelhante de isótopo. A distribuição de radioatividade pelas duas frações de RNA, no entanto, variou muito com a idade da larva. Para larvas mais velhas a maior parte do RNA marcado foi extraído a quente. Isto sugere que o RNA rapidamente marcado tem maior contribuição de classes instáveis - no 4^o período do que no 3^o período. Dados adicionais a esse respeito são trazidos pelo gráfico da Figura 22. Nesta figura aparecem curvas que dão a variação da atividade específica da fração de RNA extraída a quente com o tempo de incor

FIGURA 22. VARIAÇÃO DAS ATIVIDADES ESPECÍFICAS DAS FRAÇÕES DE RNA, EXTRAÍDAS A 65°C, PARA LARVAS DO FIM DO 4º ESTÁDIO, DURANTE OS PRIMEIROS 60 MINUTOS DE INCORPORAÇÃO.

Larvas em lotes de 15 foram injetadas com 2 λ de uridina- H^3 (7,2C/mM, 1MC/ml) permitindo-se a incorporação pelos tempos assinalados no gráfico. O RNA foi extraído das glândulas salivares em 3 frações: a primeira por extração com TMN-7, a 0°C na ausência de SDS; a segunda com TMN-7, SDS 1% e temperatura entre 10 e 20°C; a terceira com TMN-8 SDS 1%, entre 65 e 70°C. Foram lançados no gráfico apenas os dados de atividade específica referentes às frações de RNA extraídas a temperatura de 65 a 70°C.

poração, para larvas de diversas idades do fim do desenvolvimento larval. Nota-se claramente que a incorporação nesta fração de RNA é muito maior para larvas do 4^o que para larvas do 5^o período. Animais cujo desenvolvimento larval está terminando, durante a muda pupal, ainda incorporam uridina- H^3 , mas num nível bem inferior.

Os dados globais a respeito da síntese de RNA em glândulas salivares de R. angelae, durante o 4^o estágio do desenvolvimento larval, podem ser assim resumidos:

- 1) na passagem do 2^o para o 3^o e o 4^o período a velocidade de síntese de RNA aumenta grandemente.
- 2) Muito embora o nível de incorporação de uridina- H^3 varie muito pouco durante o 3^o, 4^o e 5^o períodos, o padrão de síntese de RNA nestes períodos varia enormemente.
- 3) No 3^o período ocorre síntese predominante de RNA ribossômico.
- 4) No 4^o período a síntese de rRNA é inibida ao nível do processamento; a incorporação de uridina- H^3 em RNA polidisperso e refratário à extração com fenol a frio é intensificada. Quanto ao padrão de incorporação o 5^o período se identifica ao fim do 4^o período, mas representa um estágio de transição entre uma época de síntese intensa de RNA, que é o 4^o período, para outra de muito baixa atividade de incorporação de uridina- H^3 , que é o 6^o período.
- 5) O 6^o período se caracteriza por uma síntese muito baixa de RNA, ocorrendo a incorporação de uridina- H^3 em classes polidispersas. Isto parece indicar atividade transcritiva residual de células que imediatamente vão morrer.

IV DISCUSSÃOa) Fracionamento Celular

A grande dificuldade com o fracionamento celular advém do fato de que as frações subcelulares obtidas são compartimentos definidos bioquimicamente. A comparação morfológica entre as estruturas celulares preservadas nas frações derivadas dos fracionamentos e as descrições citológicas das organelas celulares serve apenas como orientação. Somente parâmetros bioquímicos permitem definir objetivamente porções isoladas pelas técnicas de fracionamento (De DUVE, 1964). Daí não podermos nunca identificar totalmente frações isoladas de células com os compartimentos celulares descritos pelos citologistas. O processo de fracionamento para as glândulas salivares de R. angelae, desenvolvido neste trabalho, permite a obtenção de compartimentos bioquímicos claramente definidos.

Foi necessário desenvolver um processo apropriado para as glândulas salivares, já que os métodos clássicos de fracionamento de tecido são ineficientes neste caso. As mesmas dificuldades são encontradas com glândulas salivares de Drosophila e de Chironomus. Recentemente apareceram publicações descrevendo técnicas adequadas ao isolamento de núcleo das glândulas salivares de Drosophila (BOYD, BERENDES e BOYD, 1968) e de Chironomus (RISTOW e ARENDS, 1968). Nossa intenção, em glândulas salivares de R. angelae, foi procurar um meio prático para o fracionamento total das células. Um primeiro passo no sentido de atingir esse objetivo foi o processo que garantiu a obtenção de (S-1 e S-2) duas frações citoplasmáticas e (N) uma fração nuclear. A etapa que permite o isolamento de S-1 é uma tentativa de obter uma fração citoplasmática isenta de contaminação nuclear.

A etapa seguinte é dirigida no sentido de eliminar o mais possível os contaminantes citoplasmáticos da fração nuclear. Como consequência da maneira pela qual a preparação é leva da avante, a fração S-1 deve conter praticamente todo o material solúvel do citoplasma. Já S-2 está enriquecida com a porção ligada às membranas, principalmente àquelas do retículo endoplasmático próximo à membrana nuclear.

A partir destas interpretações e dos dados de atividades específicas do RNA extraído a frio de S-1 e S-2, po demos admitir que as frações de RNA solúveis do citoplasma marcam mais rapidamente do que as ligadas às membranas. Esta conclusão é, no entanto, de pequeno alcance, uma vez que tanto o RNA da parte solúvel como o ligado às membranas citoplasmáticas formam populações complexas.

O fato do RNA extraído a quente das porções citoplasmáticas ter apresentado uma atividade específica maior que a observada para as extrações a frio deve ser considerado com cuidado. Logo de início, deve-se lembrar que não há critério que permita eliminar totalmente a possibilidade de contaminação com o RNA rapidamente marcado nuclear. Mas se fosse esta a explicação para a presença nas frações citoplasmáticas de RNA que exige condições mais drásticas de extração, era de se esperar que S-2 fosse mais rica - neste tipo de RNA, uma vez que é a fração citoplasmática - mais susceptível de contaminação nuclear. Resultados similares foram obtidos por HADJIVASSILIOU e BRAWERMAN (1967) em fígado de rato. Estes autores verificaram que uma segunda extração com fenol em pH 8,3 da fração citoplasmática - fornecia um RNA com maior atividade "template" que o extraído a pH 7,3. Estes resultados sugerem que o m-RNA cito-

plasmático pode ser refratário à extração com fenol em condições mais brandas, como o RNA rapidamente marcado nuclear. O comportamento do mRNA poderia ser consequência do tipo de associação que mantém na ribonucleoproteína, à qual está associado, conferindo-lhe propriedades, quanto à extração, diferentes de rRNA. Ribonucleoproteínas citoplasmáticas com características de informossomo têm sido notadas em diversos sistemas: fígado de rato (HENSHAW, 1968); células L (PERRY e KELLEY, 1968), epiderme de inseto (KAFATOS, 1968) e embrião de curiço do mar (INFANTE e NEMER, 1968). Os dados apresentados a respeito de distribuição e comportamento das ribonucleoproteínas de R. angelae são insuficientes para adicionar novas informações ao problema. Nossos dados devem ser encarados como informações preliminares a respeito das ribonucleoproteínas citoplasmáticas das glândulas salivares.

PENMAN, SMITH e HOLTZMAN (1966), examinando o RNA em frações citoplasmáticas de células HeLa, encontraram classes rapidamente marcadas com altas constantes de sedimentação. Estas observações sugerem, à primeira vista, que tais frações citoplasmáticas estão contaminadas com o RNA nuclear. Recentemente, novos dados do mesmo laboratório indicam que o citoplasma de fato contém RNA polidisperso rapidamente marcado, de alto peso molecular independente do RNA pesado nuclear (PENMAN, VESCO e PENMAN, 1968). Esta classe de RNA em HeLa foi descrita associada a RNA que sedimenta junto com polissomo e é insensível a EDTA. RNP deste tipo, no entanto, pode ser de origem nuclear e aparecer na fração citoplasmática como consequência do processo de fracionamento, como foi verificado para hepatoma de rato (PLAGEMANN, 1969) e células L (PERRY e KELLEY, 1968). Nossos resultados com glândulas salivares de R. angelae estão mais de acordo com os de PERRY

e KELLEY (1968) para células L. A fração S-1 não está enriquecida em RNA rapidamente marcado de alto peso molecular e a maior parte dos RNA's presentes nesta fração são sensíveis a EDTA. Já a fração S-2 parece conter significativa quantidade de RNA pesado. Este RNA pesado pode ser de origem nuclear, mas não se pode afastar a hipótese de que este já ligado às membranas do retículo endoplasmático próximas à membrana nuclear. Dúvidas do mesmo tipo pairam sobre os resultados observados em células L e somente novas experiências poderão aclará-las. O tipo de fracionamento celular desenvolvido para glândulas salivares parece ser profícuo na abordagem experimental a estes problemas.

b) Biossíntese de rRNA

O conjunto "organizador nucleolar-nucléolo" representa o sistema gênico melhor conhecido em eucariotos (PERRY, 1967; BIRNSTIEL, 1967; BROWN, 1967). O rDNA está restrito ao organizador nucleolar (RITOSSA e SPIEGELMAN, 1965; WALLACE e BIRNSTIEL, 1966) e o nucléolo é uma estrutura celular que aparece como consequência da transcrição e do processamento do rRNA. Na falta do rDNA ou na ausência de síntese de rRNA não se observa nucléolo. A compreensão da fisiologia do sistema "organizador nucleolar-nucléolo" tem dois importantes aspectos: I) rRNA é uma classe de ácidos nucleicos de importância fundamental na vida celular; II) os modelos elaborados para a biossíntese de rRNA têm valor heurístico no estudo da biossíntese de mRNA, cujo progresso tem sido grandemente limitado pela dificuldade, até agora não superada, de se obter uma espécie claramente definida de RNA mensageiro.

A elucidação das vias nucleolares de biossíntese de rRNA foi possível principalmente devido à exploração do modêlo células de mamífero em cultura de tecido (PERRY, 1962; SCHERRER e DARNELL, 1962; PELMAN SMITH e HOLTZMAN, 1966; WEINBERG et alii, 1967; JEANTEUR, AMALDI e ATTARDI, 1968; McCONKEY e HOPKINS, 1969). Investigações em células normais confirmaram e complementaram êstes resultados (MURAMATSU e BUSCH, 1965; STEELE, 1968; MURAMATSU e FUJISAWA, 1968). Como foi descrito na introdução, dêstes estudos emergiu o modêlo padrão para a via de biossíntese de rRNA em mamíferos. A questão de interêsse que então surgiu é saber se esta via de síntese de RNA ribossômico é geral para tôdas as células nucleadas. O trabalho relatado nesta dissertação indica que em glândulas salivares de R. angelae o rRNA é sintetizado segundo o esquema descrito para mamíferos. Êstes aspectos da biossíntese de rRNA, em invertebrados, só foram examinados, até agora, nas glândulas salivares de dípteros. É interessante lembrar que para R. angelae (nesta tese) Chironomus (EDSTROM e DANEHOLT, 1967) e Drosophila (GREENBERG, 1967) o precursor inicial de rRNA foi descrito com um coeficiente de sedimentação da ordem de 36-37s. Embora êste valor não seja uma determinação rigorosa, representa um dado reprodutível que se distingue significantemente do valor de 45s atribuído ao precursor de rRNA, em mamíferos. A preocupação com esta diferença não é meramente acadêmica. Estamos interessados em saber se êstes resultados podem revelar aspectos básicos da regulação gênica de eucariotos.

LOENING (1968) estudou a variação dos pêsos moleculares de rRNA na escala biológica, fazendo determinações de pêsos moleculares através do método da eletroforese em gel de poliacrilamida recentemente desenvolvido (LOENING, 1967;

BISHOP, CLAYBROOK e SPIEGELMAN, 1967). Foi verificado que o peso molecular do rRNA de 18s não varia desde protozoários até mamíferos, tendo um valor médio de $0,7 \times 10^6$ daltons. Já o "28s" tem um peso molecular aumentando progressivamente desde $1,30 \times 10^6$ em protozoários e fungos até $1,75 \times 10^6$ em mamíferos. Em particular, Drosophila e Xenopus apresentam para o "28s" $1,4 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^6$ daltons, respectivamente. O precursor primário de rRNA em Xenopus apresenta um coeficiente de sedimentação da mesma ordem do observado em dípteros (M. L. BIRNSTIEL, comunicação pessoal). Apenas as diferenças entre os pesos moleculares do "28s" em Xenopus e Drosophila ($1,40$ e $1,51 \times 10^6$) e em mamíferos ($1,75 \times 10^6$) não podem explicar as diferenças entre os coeficientes de sedimentação dos precursores. Era de se esperar uma variação maior na extensão da parte do precursor eliminado durante o processamento. Agora os primeiros resultados a esse respeito são conhecidos. Sabe-se que em células HeLa pelo menos 50% do precursor de 45 s é eliminado (McCONKEY e HOPKINS, 1969) enquanto em Xenopus a eliminação é da ordem de 10 a 20% (LOENING, JONES e BIRNSTIEL, 1969). Estes resultados mostram que a diferença entre os coeficientes de sedimentação do precursor primário de rRNA em mamíferos e em anfíbios e invertebrados é principalmente devida ao segmento de cadeia perdido no processamento. O significado destes achados é totalmente desconhecido no momento, uma vez que não se sabe qual a função da parcela do precursor seletivamente eliminada no processamento de rRNA.

Os resultados obtidos com as glândulas salivares de R. angelae indicam claramente que, no fim do desenvolvimento larval, a síntese de rRNA é reduzida por inibição parcial da maturação. Isto nos sugeriu que o bloqueio de alguma etapa do processamento serve de passo inicial do mecanismo que leva à

redução da síntese de rRNA e desagregação do nucléolo. Resultados equivalentes foram observados na diferenciação do cristalino de boi (PAPACONSTINOU e JULKU, 1968). Outros dados mostram que inibição ao nível do processamento pode ser um mecanismo de importância geral no controle de biossíntese de rRNA em células nucleadas, como foi lembrado na Introdução. Além dos dados já citados, sabe-se que na citodiferenciação da linhagem eritropoiética de pato, a síntese de ribossomos é totalmente reprimida, não obstante uma síntese residual dos precursores ribossomais permaneça (ATTARDI et alii, 1966; SCHERRER e MARCAUD, 1968). Estas considerações nos levaram a crer que R. angelae é um sistema que favorece a visualização de um importante mecanismo de controle metabólico. Estas afirmações merecem uma discussão mais minuciosa.

Nada se pode afirmar a respeito do fator que permite limitar a maturação dos ribossomos. Colocando da maneira mais ampla possível, admite-se duas possibilidades: I) alguma etapa do processamento do rRNA pode ser inibida (metilação, clivagem da cadeia, etc.) II) a maturação do ribossomo pode ser limitada pela falta de proteínas estruturais.

Diversos resultados são conhecidos, os quais podem orientar nas considerações destas alternativas. Como já foi mencionado aqui, células HeLa, quando crescem em meio carente em metionina, têm a biossíntese de ribossomos bloqueados. Não obstante, o precursor de 45s é sintetizado à velocidade normal, sendo inclusive clivado até 32s, mas ambos não são metilados e sua maturação não progride, sendo degradados no núcleo (VAUGHN et alii, 1967). Neste caso assume-se que a síntese de ribossomos maduros está bloqueada exclusivamente pela falta de metilação. Foi verificado que não há carência de

proteínas estruturais, pelo menos para a formação das partículas nucleolares precursoras de 80s e 55s, as quais encerram os rRNA de 45s e 32s respectivamente (MADEN e VAUGHN, 1968). Não é conhecido se o bloqueio da metilação tem algum papel na redução da síntese de RNA que ocorre a cada geração das células HeLa. Glândulas salivares de R. angelae, quando incubadas num meio quimicamente definido, contendo diversos aminoácidos mas sem metionina (ARMELIN, MENECHINI e LARA, 1969), sintetizam os precursores de rRNA mas o processamento fica inibido (resultados não publicados de R. MENECHINI). Esta experiência ainda não foi levada avante e não se pode dizer que a inibição de síntese se dá pelo mesmo processo observado em células HeLa. Nós tentamos verificar se na época do bloqueio da maturação, observada "in vivo" em R. angelae, os precursores de rRNA estão submetilados. Verificamos que a incorporação de metionina-metil- H^3 em RNA ocorre tão bem no 5º período quanto no 3º período do desenvolvimento larval. Estes resultados, no entanto, não podem ser considerados conclusivos, no sentido de eliminar a hipótese de submetilação, pois diversos fatores, dos quais depende a incorporação não estão controlados, como o tamanho do reservatório intracelular de metionina e a velocidade de sua ativação. Uma resposta segura à questão está dependendo de determinações de atividade de metilases nucleolares, tarefa que até agora não foi empreendida em R. angelae. Metilação, entretanto, não é o único passo do processamento de rRNA potencialmente útil aos mecanismos de controle de síntese. Esta sugestão vem das observações de BURDON (1967) sobre o efeito de tioacetamida na maturação de rRNA em células de tumor ascítico. Este autor observou que a droga não inibe a síntese dos precursores, os quais são normalmente metilados. Estes dados foram tomados como indicativos de que a tioaceta-

mida funciona como inibidor da maturação agindo num passo independente da metilação, talvez influenciando nas atividades das enzimas nucleolíticas envolvidas nas clivagens dos precursores. Diante dos fatos citados somos obrigados a admitir que não há nada definido a respeito dos mecanismos de regulação que agem "in vivo", ao nível do processamento de ribossomos.

Além da regulação da síntese de rRNA ao nível do processamento considerada até aqui, sem dúvida ocorre regulação ao nível da transcrição. A transcrição de rRNA é totalmente reprimida durante as primeiras clivagens do embrião. Isto implica na repressão do rDNA ou, se houver uma polimerase específica para rRNA, simplesmente na ausência dessa polimerase. Estas são alternativas, por ora, meramente especulativas, mas há outras implicações interessantes. GURDON e BROWN (1965) transplantaram núcleos de embriões ou girinos para zigoto de Xenopus. Os núcleos transplantados experimentaram rápida regressão do nucléolo e total repressão da transcrição do rDNA. Estes resultados indicam que o citoplasma do ovo e dos blastômeros contém um fator que desencadeia o processo repressivo, que poderia ser por repressão do rDNA ou por eliminação da atividade da polimerase. É possível que este evento seja exclusivo da diferenciação embrionária; esta sugestão é baseada em certos dados. Na embriogênese de Xenopus a transcrição de rDNA aparece na gastrulação, mas nesta época a maturação dos precursores de rRNA está parcialmente inibida (BROWN, 1967). Estes dados são evidências claras indicando que a regulação ao nível de transcrição e ao nível do processamento são eventos independentes. Como muitos exemplos indicam, em células citodiferenciadas, com síntese de ribossomos inibida, uma síntese residual de precursores ocorre. Por razões econômicas não era de se esperar, que em organismos superiores existisse um meca

nismo de regulação agindo ao nível da transcrição para eliminar totalmente a síntese de rRNA. Nas fases iniciais da embriogênese, um mecanismo deste tipo está presente, talvez não por motivos de economia. Em face destas considerações, somos tentados a pensar que a regulação ao nível da transcrição é característica da diferenciação embrionária. Já na citodiferenciação o processo primário de controle está ao nível do processamento, como descrevemos para glândulas salivares de R. angelae. A redução da transcrição dos precursores como observamos em R. angelae e é observado em outros animais, pode ser um fenômeno secundário resultante da redução da atividade da polimerase ou queda do nível da proteína que interage especificamente com o rRNA nascente ou ambos os casos ao mesmo tempo.

c) RNA não ribossômico rapidamente marcado

O método de extração de RNA descrito neste trabalho fornece um caminho prático e eficiente de obtenção deste ácido nucléico das glândulas salivares de R. angelae. Sua grande vantagem é permitir um fracionamento do RNA celular durante o processo. Por este método nós temos conseguido com a extração a quente uma fração enriquecida de RNA rapidamente marcado não ribossômico. Foi observado já há bastante tempo que o RNA rapidamente marcado não é extraído eficientemente com fenol frio a pH neutro (GEORGIEV e MANTIEVA, 1962; SIBATANI et alii, 1960; HADJIVASSILIOU e BRAWERMAN, 1965). A fração de RNA rapidamente marcada extraída a 65°C das glândulas salivares não é homogêneamente marcada. Em vista deste fato os valores dos níveis de hibridização calculados (os valores maiores observados atingem 5%) a partir da atividade específica deste RNA, não podem ser tomados como estimativa da porção do

genoma transcrito em termos dêste tipo de RNA.

Foi assumido que o RNA rapidamente marcado, cuja extração exige condições mais drásticas, é de origem nuclear - provavelmente ligado à cromatina (GEORGIEV e MANTIEVA, 1960; GEORGIEV et alii, 1963; HADJIVASSILIOU e BRAWERMAN, 1965). No caso de R. angelae, a 65°C extrai-se principalmente RNA nuclear, mas êste ácido nucléico está numa estrutura não estreitamente ligada à cromatina. Nós estamos inclinados a admitir que o RNA nuclear rapidamente marcado está ligado a uma ribonucleoproteína nuclear. As propriedades desta associação nucleoprotéica tornariam o RNA refratário à extração com fenol a frio. Estas RNP's são postuladas como partículas que encerram mRNA em processamento, portanto seriam pré-informossomos. No citoplasma, os informossomos podem determinar para o mRNA propriedades semelhantes às do RNA rapidamente marcado nuclear, daí a existência em frações citoplasmáticas de RNA extraível a quente com atividade específica superior à da massa de RNA extraída a frio. É evidente que estas interpretações não passam de uma hipótese de trabalho. Não obstante, trata-se de uma idéia viável que está de acordo com muitos dados conhecidos. Em fígado de rato foi possível extrair uma partícula ribonucleoprotéica, claramente distinta de ribossomo, que encerra o RNA rapidamente marcado (SAMARINA et alii, 1968). Em citoplasma de diversos tipos de células têm sido encontradas indicações para a existência de uma RNP não ribossômica encerrando mRNA (PERRY e KELLEY, 1966 e 1968; HENSHAW, 1968; INFANTE e NEMER, 1968 e KAFATOS, 1968). O RNA pesado rapidamente marcado contém seqüências homólogas ao mRNA que aparece no citoplasma - (STEVENIN, MANDEL e JACOB, 1969). Os dados conhecidos para o processamento dos precursores do rRNA servem como orien-

tação, desde que é plausível esperar um processamento análogo para mRNA. Estas considerações permitem prever uma série de características dos pré-informossomos, testáveis na prática. Estas partículas devem encerrar sequências de RNA homólogas aos ~~mensageiros~~ citoplasmáticos e sequências restritas ao núcleo. Como estas partículas devem ser envolvidas na tomada do RNA nascente da transcrição, seus componentes protéicos devem exercer atividade estimulatória sobre a RNA polimerase "in vitro". Resumindo, em princípio, todas as implicações desta hipótese podem ser experimentalmente investigadas. Em glândulas salivares de R. angelae nós temos agora mais razões para tentar isolar estas RNP's nucleares. Com uma série de bem engendradas experiências de hibridização RNA-DNA, usando a fração de RNA extraída a quente das glândulas salivares, foram conseguidos resultados de grande significação (MENECHINI et alii, 1969; MENECHINI, 1969). Estes resultados indicaram claramente que o RNA nuclear rapidamente marcado transcrito no 2º período do desenvolvimento larval é, pelo menos parcialmente, diferente do transcrito no 5º período. Além disso, os dados mostraram que o RNA extraído a quente do 5º período é transcrito de DNA que sofreu replicação diferencial. Até o momento esta é a primeira verificação experimental de amplificação de DNA diferente de rDNA. Com estas novas informações a importância de R. angelae ultrapassa as perspectivas iniciais que motivaram a sua exploração como modelo para o estudo da regulação genética. Nós temos agora um sistema claramente definido que tem potencialidades para favorecer a abordagem experimental a problemas básicos da regulação genética de eucariotos: papel da replicação diferencial do DNA, significado do RNA nuclear rapidamente marcado e suas relações com o processamento do mRNA.

d) Padrões de síntese de RNA durante o desenvolvimento larval

Os períodos do desenvolvimento larval de R. angelae focalizados neste trabalho envolvem grandes modificações no comportamento dos animais, as quais correspondem à preparação para a metamorfose. Durante estas épocas as larvas param de se alimentar e se entregam ao trabalho de construção do pupário coletivo. Como não sabemos a função exata das glândulas salivares em R. angelae, fica muito difícil interpretar o papel desempenhado por elas nêstes períodos. Não obstante, é facilmente verificável que até o fim do 2^o período as glândulas armazenam uma grande quantidade de secreção. Durante o 3^o período toda esta reserva de secreção é eliminada e é possivelmente usada na construção do pupário. BIANCHI e LARA (1969) têm estudado a síntese protéica nas glândulas salivares durante o 4^o estágio. Foi verificado que grande parte das proteínas das glândulas são possivelmente originárias da hemolinfa, fato também verificado em glândulas salivares de Chironomus (LAUFER e NAKASE, 1965). Mas além da tomada de proteínas da hemolinfa as glândulas estão envolvidas em ativa síntese protéica, cujo máximo de intensidade é alcançado no 4^o período (BIANCHI e LARA, 1969). Não foi possível, no entanto, detectar claramente variações no espectro de proteínas sintetizadas durante o 4^o estágio de desenvolvimento larval. Isto não quer dizer que não haja tais variações, pois esta análise, atualmente em curso (BIANCHI dados não publicados), tem sido dificultada pela entrada nas glândulas de proteínas da hemolinfa. Por outro lado, o comportamento dos cromossomos, indica ativação de novos genes durante o 4^o e 5^o períodos, como revelado, pelo desenvolvimento de grandes puffs nesta época (PAVAN, 1965).

Voltemo-nos agora para os dados fornecidos nesta tese a respeito da síntese de RNA no 4^o estágio do desenvolvimento larval. Durante o 3^o período temos uma intensa síntese de rRNA nas glândulas salivares. Este resultado já era esperado face aos dados anteriormente descritos: o conteúdo de RNA por célula aumenta nesta época (LARA E HOLLANDER, 1967) e a incorporação de uridina- H^3 em RNA obedece a uma cinética linear (MENECHINI, ARMELIN e LARA, 1968). Esta síntese de rRNA só se justifica se houver uma síntese de proteínas com intensidade correspondente. Esta implicação está coerente com os dados de BIANCHI e LARA (1969) citados anteriormente, que mostram ser o 4^o período uma época de grande síntese protéica. No 4^o período, já a síntese de rRNA maduro está inibida, desde que o suprimento de rRNA foi garantido pela síntese do 3^o período.

Quando nós examinamos os resultados referentes à síntese do RNA rapidamente marcado não ribossômico, chegamos a conclusões interessantes. Este tipo de RNA é o contribuinte mais importante da população rapidamente marcada do 4^o e 5^o período. Isto é indicado pela maior importância das formas polidispersas no perfil de sedimentação das extrações a frio, como também pela maior proporção de radioatividade incorporada na fração de RNA extraída a quente. As maiores atividades específicas para as frações de RNA extraídas a quente foram observadas no 4^o período. Do ponto de vista qualitativo nós sabemos que os RNAs rapidamente marcados, não ribossômicos, são populações diferentes no 2^o e no 5^o período do desenvolvimento larval (MENECHINI et alii, 1969; MENECHINI, 1969). Como foi discutido anteriormente, a maior parte do RNA rapidamente marcado não ribossômico é do tipo nuclear. Pelas interpretações que nós temos aceito, os RNA's nucleares rapidamente marcados são precursores dos mensageiros citoplasmáticos.

Levando em conta estas considerações podemos propor que no 4^o e 5^o períodos novos genes são ativados, daí o aparecimento de novas sequências no RNA nuclear, o que por sua vez seria reflexo do processamento de novos mensageiros. Até agora, entretanto, síntese de novas proteínas durante êstes períodos não foram inequivocamente demonstradas. Evidentemente, esta interpretação mesmo que seja correta, não fornece nada a respeito das relações entre a enorme síntese de DNA ocorrendo no fim do 4^o estágio do desenvolvimento larval - (MENECHINI, 1969) e as classes de RNA sintetizadas na mesma época.

No fim do desenvolvimento larval, na época imediatamente anterior e durante a muda pupal, ainda ocorre incorporação de uridina- H^3 em RNA. Esta incorporação se dá num nível muito baixo e exclusivamente em classes de RNA polidispersas que aparecem por todo o gradiente de sacarose com coeficientes de sedimentação que vão de 50-60s a 4s. A síntese de RNA neste período não foi estudada em detalhes, mas algumas especulações podem ser levantadas a respeito do significado desta síntese residual. Durante esta época a síntese de proteínas está bastante reduzida (BIANCHI e LARA, 1969). Não é de esperar que esta síntese de RNA seja para suportar a síntese de proteína. É possível que o transporte de mRNA para o citoplasma esteja totalmente bloqueado, sem bloqueio total da transcrição; assim, os produtos não são processados, sofrendo degradação no núcleo sem ter qualquer função. Esta também pode ser a explicação para a síntese residual de RNA observada no espermátócito primário de hamster (MURAMATSU, UTAKOJI e SUGANO, 1968). Na espermatogênese de hamster, quando praticamente não ocorre mais síntese de proteína, o espermátócito apresenta incorporação de uridina- H^3 que se dá

exclusivamente em autossomos. O RNA sintetizado é do tipo A-U e de alto peso molecular. Esta síntese não está relacionada com síntese de proteína, podendo ser apenas uma síntese residual, devido a uma ausência de repressão total da transcrição que por razões econômicas seria desnecessária em metazoários.

Este trabalho permitiu uma primeira descrição dos padrões de síntese de RNA nas glândulas salivares durante o desenvolvimento larval de R. angelae. Isto deve ser tomado como os passos iniciais no caminho da elucidação do significado biológico dos puffs cromossômicos de R. angelae.

e) Conclusões e perspectivas

A exploração das glândulas salivares de R. angelae como modelo de célula nucleada, foi levada a efeito neste trabalho com uma metodologia que, embora relativamente simples, permitiu a obtenção de importantes resultados. Com o método de extração introduzido, conseguimos separar por um lado frações ricas em rRNA e por outro frações contendo - RNA's específicos de cada período do desenvolvimento larval. O processo de fracionamento celular foi útil para o estudo da biossíntese de rRNA e também ajudou na caracterização das classes de RNA extraídas com fenol a quente. Desta forma alcançamos o objetivo deste projeto, que foi um levantamento dos padrões de síntese de RNA durante o desenvolvimento larval de R. angelae, assim como conseguimos um primeiro acesso a produtos de transcrição de genes diferentes e presumivelmente produtos de puffs cromossômicos característicos de certos estágios larvais. Como foi discutido nas seções anteriores, muitos dos resultados obtidos têm implicações que transcendem o interesse imediato da biologia de R. angelae. Nisto aliás, está o grande interesse deste organismo para a biolo-

gia molecular de eucariotos em geral. A abordagem experimental às questões suscitadas por este trabalho poderá, no entanto, ser limitada pelas possibilidades dos processos metodológicos disponíveis até agora. Nas partes anteriores desta discussão procuramos avaliar os resultados sob todos os aspectos significativos, sem nos preocuparmos seriamente se R. angelae será um bom sistema para a verificação experimental das implicações e hipóteses sugeridas. Cabe agora indagar - quais das questões levantadas poderão ser estudadas com vantagem em glândulas salivares de R. angelae.

Com respeito à biossíntese de rRNA temos nossa atenção atraída para os seguintes tópicos: I - Verificação de uma polimerase específica; II - Nível de rDNA no fim do 4º estágio; III - Estudo da inibição ao nível do processamento. Certamente é possível propor questões bem definidas referentes a estes tópicos, as quais poderão fornecer respostas de significação para a biologia molecular das células nucleadas. Mas devemos ter em mente que as mesmas questões terão maiores possibilidades, no sentido de fornecer informações básicas, se forem exploradas em sistemas mais adequados. No que diz respeito à polimerase e ao comportamento de rDNA o ovário de Xenopus é um modelo mais adequado. Já o estudo do processamento de rRNA continua sendo atacado com vantagem em células de cultura de tecido.

Na verdade a grande atração das glândulas salivares de R. angelae está na relação entre amplificação gênica e RNA nuclear. Até o momento só em R. angelae foi verificada amplificação gênica ligada a DNA diferente de rDNA (MENECHINI et alii, 1969; MENECHINI, 1969). Estas observações revestem de maior significação quando se lembra que o RNA transcrito do DNA amplificado é principalmente do tipo

nuclear. Estes dados vêm tocar em alguns dos problemas mais básicos da biologia molecular de eucariotos. Devido a isto ganhou grande interesse o estudo do processamento de mRNA em glândulas salivares de R. angelae. Como primeira etapa da abordagem experimental a este problema, acreditamos que deva ser tentado o isolamento e caracterização de ribonucleoproteínas nucleares diferentes das partículas ribossomais. Nesta etapa estamos pensando em responder à seguinte questão: existe RNP nuclear com as propriedades atribuídas aos pré-informossomos, conforme postulado nesta tese? Nada podemos adiantar a respeito do sucesso desse empreendimento, mas sem dúvida permitirá purificar frações de RNA bem definidas. Isto é necessidade prática importante para o progresso do estudo da amplificação gênica em R. angelae. A grande barreira prática oferecida por este trabalho é a dificuldade que temos de processar quantidades de material na escala preparativa que o projeto exige. Não obstante, estas dificuldades metodológicas não devem ser consideradas como barreiras insuperáveis. Uma limitação muito mais grave do sistema R. angelae é a inexistência de uma análise genética desenvolvida neste inseto. Até o momento não dispomos de nenhum mutante conhecido para R. angelae⁽⁸⁾. Podemos entender o significado prático desta limitação, se lembrarmos, que o papel de Xenopus, como modelo de estudo para o sistema gênico organizador nucleolar-nucléolo, não se deve apenas à existência da grande amplificação do rDNA no seu ovário, mas também à descoberta do hoje célebre mutante anucleolado.

⁸ Na verdade já foi encontrado um mutante numa espécie muito próxima de R. angelae (E. MATTINGLY, comunicação pessoal), que, entretanto, não teve nenhuma importância prática.

V RESUMO

a. Do ponto de vista metodológico dois problemas foram enfrentados neste trabalho: i) extração dos RNA's e ii) fracionamento das células das glândulas salivares de R. angelae.

i) O processo prático elaborado para resolver o primeiro problema se constituiu numa variação da técnica clássica de extração com fenol. Jogando com a presença de detergente e variações de pH e de temperatura, foi possível se chegar a um método que garante a extração e um fracionamento parcial de, praticamente, todo RNA celular. Com extrações a baixa temperatura obtém-se preferencialmente rRNA e tRNA. O RNA refratário à extração com ^{fenol} a frio tem propriedades do RNA nuclear, mas o citoplasma, também parece conter classes de RNA somente extraíveis a quente. A dificuldade de extração do RNA nuclear com fenol frio, foi especulativamente interpretada como uma propriedade das RNP's que encerram esta classe de RNA.

A grande ^{vantagem} deste método de extração está no fato de ter permitido isolar, com as extrações a alta temperatura, frações de RNA enriquecidas em produtos de transcrição específicos de determinados períodos do desenvolvimento larval.

ii) O fracionamento celular das glândulas salivares - não é alcançado pela aplicação das técnicas tradicionais de fracionamento de tecido. Em vista disso foi necessário procurar uma alternativa experimental para este caso. Combinando um enzima proteolítico com a ação de detergentes não iônicos foi conseguido um método útil para o fracionamento das células das glândulas salivares. Este método foi aplicado nesta tese para um estudo inicial das RNP's e da transferência do rRNA do núcleo para o citoplasma nas célu

las das glândulas salivares.

- b. Foi possível verificar com êste trabalho que o rRNA é sintetizado inicialmente na forma de um precursor primário de 37s, o qual é processado no interior do núcleo para dar as espécies maduras de rRNA segundo o esquema:

No 3^o período do 4^o estágio do desenvolvimento larval - de R. angelae, a síntese de rRNA é intensa. Neste mesmo período observa-se claramente um nucleolo típico na base do cromossomo X. No período seguinte ocorre uma redução na síntese das formas maduras de rRNA. Esta queda de síntese é desencadeada por um bloqueio ao nível do processamento dos precursores nucleares de rRNA citoplasmático. Estudos citológicos tem revelado que neste período o nucleolo sofre uma aparente desagregação.

- c. Os resultados de incorporação de uridina- H^3 mostraram que o 3^o e 4^o períodos tem uma velocidade de síntese de RNA muito superior à do 2^o período. No 4^o período quando a síntese de rRNA é inibida aumenta de importância a síntese de outras classes de RNA. Aparentemente é muito intensificada a síntese de RNA nuclear. Êstes resultados são interpretados como consequência da ativação de novos genes nesta época do desenvolvimento larval. Êstes fatos não são inesperados pois êste estágio se caracteriza pelo desenvolvimento de "puffs" gigantes, os quais são específicos do tecido e do período de desenvolvimento. O 5^o período parece representar uma fase de transição entre uma época de ativa síntese de RNA e outra onde a atividade transcritiva sofre

uma redução drástica, provavelmente devido à histólise do tecido que vai ocorrer logo em seguida.

- d. Os dados apresentados nesta tese são considerados sob todos os aspectos significativos. Com isto faz-se uma tentativa de discussão crítica, no sentido de avaliar a importância do sistema glândulas salivares de R. angelae, - como modelo de estudo para a genética molecular dos organismos superiores.

VI ABREVIATURAS

A:	adenina.
AMP:	ácido adenílico.
4-AS:	4-aminosalicilato de sódio.
C:	citossina.
DNA:	ácido desoxirribonucleico.
	rDNA: DNA que codifica para rRNA.
DNase:	desoxirribonuclease.
EDTA:	ácido etilenodiaminotetracético.
G:	guanina.
GMP:	ácido guanílico.
RNA:	ácido ribonucleico.
	mRNA: RNA mensageiro.
	rRNA: RNA ribossomal.
	sRNA: RNA solúvel.
	tRNA: RNA de transferência.
RNase:	ribonuclease.
RNP:	partícula ribonucleoproteica.
SDS:	dodecil sulfato de sódio.
SSC:	solução de NaCl 0,15M; citrato de sódio 0,015M.
	SSC 6 X: NaCl 0,90M, citrato de sódio 0,090M.
T-0,25:	Tris-HCl 0,05M; NaCl 0,01M; MgCl ₂ 0,001M; sacarose 0,25M; pH 7,4.
TMN-7:	Tris-HCl 0,05M; NaCl 0,05M; MgCl ₂ 0,001M; pH 7,4.
TMN-8:	Tris-HCl 0,05M; NaCl 0,05M; MgCl ₂ 0,001M; pH 8,3.
TRIS:	trishidroximetilaminometano.
U:	uracil.
UMP:	ácido uridílico.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Armelin, H.A. (1969) - RNA nuclear - *Ciência e Cultura*, 21, 30-39.
- Armelin, H.A.; Meneghini, R. e Lara, F.J.S. (1969a) - Extraction and characterization of newly synthesized RNA from whole cells and cellular fractions of *R. angelae* - salivary glands - *Biochim. Biophys. Acta*, 190, 358-367.
- Armelin, H.A.; Meneghini, R. e Lara, F.J.S. (1969b) - Patterns of RNA synthesis in salivary glands of *R. angelae* larvae during development - *Genetics*, 61, suppl. 1, 351-360.
- Attardi, G.; Parnas, H.; Hwang, M.L. e Attardi, B. (1966). Giant size rapidly labelled nuclear RNA and cytoplasmic mRNA in immature duck erythrocytes. - *J. Mol. Biol.* 20, 145-158.
- Attardi, G. e Attardi, B. (1967) - A membrane associated RNA of cytoplasmic origin in HeLa - *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.*, 58, 1051-1056.
- Baserga, R.; Petersen, R.O. e Estensen, R.D. (1966) - RNA synthesis in liver and heart of growing and adult mice *Biochim. Biophys. Acta*, 129, 259-270.
- Beermann, W. (1963) - Cytological aspects of information transfer in cellular differentiation - *Am. Zool.* 3, 23-32.
- Beermann, W. (1956) - Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes - *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 21, 217-232.
- Bernhardt, D. e Darnell, J.E. (1969) - tRNA synthesis in HeLa cells: a precursor to tRNA and the effects of methionine starvation on tRNA synthesis - *J. Mol. Biol.*, 42, 43-56.
- Bianchi, A.G. e Lara, F.J.S. (1969) - Cinética de síntese proteica na glândula salivar de *R. angelae* durante o desenvolvimento larval - *Ciência e Cultura*, 21, 542-543.
- Biling, R.J.; Inglis, A.M. e Smellie, R.M.S. (1969) - The distribution of DNA-like RNA in rat liver cells - *Biochem. J.*, 113, 571-572.

- Birnstiel, M. (1967) - The nucleolus in cell metabolism - Ann. Rev. Plant Physiol., 18,25-58.
- Birnstiel, M.; Speirs, J.; Purdom, I. Jones, K. e Loening, U.F. (1968) - Properties and composition of the isolated rDNA satellite of Xenopus laevis - Nature, 219,454-463.
- Bishop, D.H.L.; Claybrook, J.R. e Spiegelman, S., (1967)- Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrilamide gel - J. Mol. Biol., 26,273-284.
- Blobel, G. e Potter, V.R. (1966) - Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield - Science, 154,1662-1665.
- Bonner, J. e Widholm, J. (1967) - Molecular complementary between nuclear DNA and organ-specific chromosomal RNA - Proc. Natl.Acad. Sc. U.S., 57,1379-1385.
- Bonner, J.; Dahmus, M.E.; Fambrough, D.; Huang, R.C.; Marushige, K. e Tuan, D.Y.H. (1968) - The biology of chromatin - Science,159,47-56.
- Boyd, J.B.; Berendes, H.D. e Boyd, H. (1968) - Mass preparation of nuclei from the larval salivary glands of D. hydei - J. Cell. Biol., 38,369-376.
- Brenner, S.; Jacob, F. e Meselson, M. (1961) - An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis - Nature, 190,576-581.
- Brentani, R. (1968) - On the nucleolar hole in protein synthesis - Rev. Brasil. de Pesquisas Med. Biol., 1,25-27.
- Brentani, R. (1969) - Caracterização de um biopolímero informacional de origem nucleolar - Tese de Livre Docência apresentada a Cadeira de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Breuer, M.E. e Pavan, C. (1955) - Behaviour of polytene chromosomes of R.angelae at different stages of larval development - Chromosoma 7,371-386.

- Britten, R.J. e Kohne, D.E. (1968) - Repeated sequences in DNA - Science, 161,529-540.
- Britten, R.J. e Davidson, E.H. (1969) - Gene regulation for higher cells: a theory - Science, 165,349-357.
- Brown, D.D. e Gurdon, J.B. (1964) - Absence of rRNA synthesis in the anucleolate mutant of Xenopus laevis - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 51,139-146.
- Brown, D.D. e Gurdon, J. (1966) - The size distribution and stability of DNA-like synthesized during development of anucleolate embryos of Xenopus laevis - J. Mol. Biol. 19, 399-422.
- Brown, D.D. (1967) - The genes for rRNA and their transcription during amphibian development - Current topics in Devel. Biol., 2,47-73 - Eds. Moscona & Monroy.
- Brown, D.D. e DaWid, I.B. (1968) - Specific gene amplification in oocytes - Science, 160,272-280.
- Brown, D.D. e Weber, C.S. (1968a) - Gene linkage by RNA-DNA hybridization I. Unique DNA sequences homologous to 4s RNA, 5s RNA and rRNA - J. Mol. Biol. 34,661-680.
- Brown, D.D. e Weber, C.S. (1968b) - Gene linkage by RNA-DNA hibridization: II. Arrangement of the redundant gene sequences for 28s and 18s rRNA - J. Mol. Biol., 34,681-697.
- Bryan, R.N.; Sugiura, M. e Hayashi, M. (1969) - DNA-dependent RNA directed protein synthesis "in vitro" I. extent of genome transcription - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 62,483-487.
- BSCS (1963) - Biological Science.Molecules to Man by Biological Sciences Curriculum Study - Houghton Mifflin Company.
- Burdon, R.H. (1967) - The effect of thioacetamide on the maturation of high-molecular weight RNA in tumour cells - ~~Biochem.~~ J., 104,186-187.

- Burdon, R.H. e Clason, A.E. (1969) - Intracellular location and molecular characteristics of tumour cell tRNA precursors - J. Mol. Biol., 39, 113-124.
- Cairns, J.; Stent, G.S. e Watson, J.D. editors (1966) Phage and the origins of molecular biology, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Chakravorty, A.K. (1969) - tRNA synthesis in the germinating black eye pea (*Vigna unguiculata*) II. The synthesis and maturation of ribosomes in the later stages of germination - Biochim. Biophys. Acta, 179, 83-96.
- Chambon, P.; Karon, H.; Ramuz, M. e Mandel, P. (1968) - The influence of ionic strength and a polyanion on transcription "in vitro" - II. Effects on the template efficiency of rat liver chromatin for a purified bacterial RNA polimerase - Biochim. Biophys. Acta, 157, 520-531.
- Chambon, P.; Ramuz, M.; Mandel, P. e Doly, J. (1968) - The influence of ionic strength and a polyanion on transcription "in vitro"- I. Stimulation of the aggregate RNA polymerase from rat liver nuclei - Biochim. Biophys. Acta, 157, 504-519.
- Clark-Walker, G.D. e Linnane, A.W. (1966) - "In vivo" differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics - Biochim. Biophys. Res. Comm., 25, 8-13.
- Clever, U. (1965) - Chromosomal changes Associated with differentiation - Brookhaven Symposia in Biology, 18, 242-253.
- Davis, B.D. (1961) - Opening address: the teleonomic significance of biosynthetic control mechanisms - Sympos. Quant. Biol., 26, 1-10.
- Davis, B.D. (1964) - Theoretical Mechanisms of differentiation - Medicine, 43, 639-649.
- De Duve, C. (1964) - Principles of Tissue Fractionation - J. Theoret. Biol., 6, 33-59.

- Ebert, J.D. (1968) - Levels of control: a useful frame of perception in Current topics in Developmental Biology, 3,XV-XXV - Ed. Moscona e Monroy.
- Ebert, J.D. e Kaighn, E.M. (1966) - The key to change: factors regulating differentiation - in Major problems in developmental biology - Ed. Michael Locke, 29-84.
- Edstrom, J.E. e Daneholt, B. (1967) - Sedimentation properties of the newly synthesized RNA from isolated nuclear components of Chironomus tentans salivary gland cells - J. Mol. Biol.,28,331-338.
- Evans, D. e Birnstiel, M. (1968) - Localization of amplified rDNA in the oocyte of Xenopus laevis - Biochim. Biophys. Acta, 166,274-276.
- Fleck, A. e Munro, H.N. (1962) - The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation - Biochim. Biophys. Acta, 55,571-583.
- Fraenkel-Conrat, H.; Singer, B. e Williams, R.C. (1957). Infectivity of viral nucleic Acid - Biochim. Biophys. Acta, 25,87-96.
- Fraenkel-Conrat, H.; Singer, B. e Tsugita, A. (1961) - Purification of viral RNA by means of bentonite - Virology, 14, 54-58.
- Gall, J.G. (1969) - The genes for rRNA during oogenesis - Genetics, 61, suppl. 1,121-132.
- Gallwitz, D. e Mueller, G.C. (1969) - Protein synthesis in nuclei isolated from HeLa cells - European J. Biochem. 9,431-438.
- Gelfand, D.H. e Hayashi, M. (1969) - DNA-dependent RNA-directed protein synthesis "in vitro", II. Synthesis of a ϕ x 174 coat protein component - Proc. Natl. Acad. Sc. 63,135-137.
- Georgiev, G.P. e Mantieva, V.L. (1962) - The isolation of DNA-like RNA and rRNA from the nucleolo-chromosomal apparatus of mammalian cells - Biochim. Biophys. Acta, 61,153,154.

- Georgiev, G.P.; Samarina, O.P.; Herman, M.I.; Smirnov, M.N. e Severtzov, A.N. (1963) - Biosynthesis of messenger and ribosomal RNA in the nucleolo chromosomal apparatus of animal cells - *Nature*, 200,1291-1244.
- Georgiev, G.P. (1967) - The nature and biosynthesis of nuclear RNA - *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 6,259-351.
- Georgiev, G.P. (1969) - On the structural organization of operon and the regulation of RNA synthesis in animal cells. Em publicação.
- Gierer, A. e Schramm, G. (1956) - Infectivity of RNA from tobacco mosaic virus - *Nature*,177,702-703.
- Gilbert, W. (1963) - Polypeptide synthesis in *E. coli*: I Ribosomes and the active complex - *J. Mol. Biol.*, 6, 374-388.
- Gilbert, W. (1963) - Polypeptide synthesis in *E. coli*: II The polypeptide chain and sRNA - *J. Mol. Biol.*,6,389-403.
- Gilbert, L.J. (1967) - Biochemical correlations in insect metamorphosis - Morphogenesis, differentiation and development, *Comprehensive Biochemistry*; Ed. M.Florkin e E.H. Stotz, 28,199-252.
- Giles, K.W. e Myers, A. (1965) - An improved diphenylamine method for the estimation of DNA - *Nature*, 206, 93.
- Gillespie, D. e Spiegelman, S. (1965) - A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane - *J. Mol. Biol.*, 12,829-842.
- Girard, M. e Baltimore, D. (1966) - The effect of HeLa cell cytoplasm on the rate of sedimentation of RNA-*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56,999-1002.
- Granboulan, N. e Scherrer, K. (1969) Visualization in the electron microscope and size of RNA from animal cells-*European J. Biochem.*, 9, 1-20.

- Granick, S. e Gibor, A. (1967) - The DNA of chloroplasts, mitochondria and centrioles - Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 6,143-186.
- Greenberg, H. e Penman, S. (1966) - Methylation and processing of ribosomal RNA in HeLa cells - J. Mol. Biol., 21,527-534.
- Greenberg, J. (1967) - Sedimentation studies on Drosophila virilis salivary gland RNA - J. Cell Biol., 35,49A.
- Greengard, O. (1969) - Enzymic differentiation in mammalian liver - Science, 163,891-895.
- Gros, F.; Gilbert, W.; Hiatt, H.; Kurland, C.; Risebrough, R.W. e Watson, J.D. (1961) - Unstable RNA revealed by pulse labeling of E. coli - Nature, 190,581-585.
- Gross, P.R. (1967) - The control of protein synthesis in embryonic development and differentiation - Current Topics of Developmental Biology, Eds. A.A. Moscona e A. Monroy, 2,1-46.
- Gross, P.R. (1968) - Biochemistry of differentiation - Ann. Rev. Biochem., 37,631-660.
- Guaraciaba, H.L.B. e Toledo, L.F.A. (1967) - Age determination of R. angelae larvae - Rev. Brasil. Biol., 27,321-332.
- Gurdon, J.B. e Brown, D.D. (1965) - Cytoplasmic regulation of RNA synthesis and nucleolus formation in developing embryos of Xenopus laevis - J. Mol. Biol., 12,27-35.
- Hadjivassiliou, A. e Brawerman, G. (1965) - Template and "DNA-like" RNA's as distinct entities in a preparation from rat liver - Biochim. Biophys. Acta, 103,211-218.
- Hadjivassiliou, A. e Brawerman, G. (1967) - Template and ribosomal RNA components in the nucleus and the cytoplasm of rat liver - Biochemistry, 6,1934-1940.
- Hamilton, T.H. (1968) - Control by estrogen of genetic transcription and translation - Science, 161,649-661.

- Harris, H. (1959) - Turn over of nuclear and cytoplasmic RNA in two types of animal cell, with some further observations on the nucleolus - *Biochem. J.*, 73, 362-369.
- Harris, H. (1963) - Nuclear RNA - *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2, 19-59.
- Hecht, N.B.; Bleyman, M. e Woese, C.R. (1968) - The formation of 5s rRNA in Bacillus subtilis by post-transcriptional modification - *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.*, 59, 1278-1283.
- Henshaw, E.C. (1968) - mRNA in rat liver polyribosomes: evidence that it exists as ribonucleoprotein particles - *J. Mol. Biol.*, 36, 401-411.
- Henshaw, E.C.; Revel, M. e Hiatt, H.H. (1965) - A cytoplasmic particle bearing mRNA in rat liver - *J. Mol. Biol.*, 14, 241-256.
- Hodge, L.D.; Robbins, E. e Scharff, M.D. (1969) - Persistence of mRNA through mitosis in HeLa cells - *J. Cell Biol.*, 40, 497-507.
- Hoover, J.K.; Siekevitz, P. e Palade, G.E. (1969) - Formation of chloroplast membranes in Chlamydomonas reinhardtii y-1 - *J. Biol. Chem.*, 244, 2621.
- Houssais, J. e Attardi, G. (1966) - High molecular weight non ribosomal type nuclear RNA and cytoplasmic mRNA in HeLa cells - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56, 616-623.
- Huang, R.C. (1967) - Dihydrouridylic acid containing RNA from chick embryo - *Fed. Proc.*, 26, 1933.
- Huppert, J. e Semmel, M. (1965) - Suppression de l'activité ribonucléasique par la pronase - *Biochim. Biophys. Acta*, 108, 501-503.
- Infante, A.A. e Nemer, M. (1968) - Heterogeneous ribonucleoprotein particles in the cytoplasm of sea urchin embryos - *J. Mol. Biol.*, 32, 543-565.

- Isawa, M. e Kawashima, K. (1968) - RNA synthesis in the nucleoli of mouse ascites tumor cells in relation to nucleolar components. - Biochim. Biophys. Acta, 155, 51-62.
- Jacob, F. (1966) - Genetics of the bacterial cell - Science, 152, 1470-1478.
- Jacob, F. e Monod, J. (1961). - Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins - J. Mol. Biol., 3, 318-356.
- Jacob, F. e Monod, J. (1963) - Genetic repression, allosteric inhibition, and cellular differentiation - Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis, 30-64 Ed. M. Locke.
- Jeanteur, P.; Amaldi, F. e Attardi, G. (1968) - Partial sequence analysis of rRNA from HeLa cells II. Evidence for sequence of non-ribosomal type in 45 and 32s rRNA precursors - J. Mol. Biol., 33, 757-775.
- Joklik, W.K. e Becker, Y. (1965) - Studies on the genesis of polyribosomes II. The association of nascent mRNA with the 40s subribosomal particle - J. Mol. Biol., 13, 511-520.
- Kafatos, F.C. (1968) - Cytoplasmic particles carrying rapidly labeled RNA in developing insect epidermis - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 59, 1251-1258.
- Katz, S e Comb, D.G. (1963) - A new method for the determination of the base composition of RNA - J. Biol. Chem., 238, 3065, 3067.
- Kedes, L. H. e Gross, P.R. (1969) - Synthesis and function of mRNA during early embryonic development - J. Mol. Biol., 42, 559-575.
- Kedes, L.H. e Stavy, L. (1969) - Structural and functional identity of ribosomes from eggs and embryos of sea urchins - J. Mol. Biol., 43, 337-340.

- Kidson, C.; Kirby, K.S. e Ralph, K.K. (1963) - Isolation characteristics of rapidly labelled RNA from normal rat liver - J. Mol. Biol., 7, 312-315.
- Kiho, Y. e Rich, A. (1965) - A polycistronic mRNA associated with β -galactosidase induction - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 54, 1751-1758.
- Kimura, K.; Tomoda, J. e Sibatani, A. (1965) - Fractionation of RNA's with phenol IV. Chromatographic analysis of a rapidly labelled RNA fraction of the normal rat liver - Biochim. Biophys. Acta, 108, 540-550.
- Kirby, K.S. (1956) - A new method for the isolation of RNA's from mammalian tissue - Biochem. J., 64, 405-408.
- Knight, E. e Darnell, J.E. (1967) - Distribution of 5s RNA in HeLa cells - J. Mol. Biol., 28, 491.
- Kuntzel, H. (1969) - Proteins of mitochondrial and cytoplasmic ribosomes from Neurospora crassa - Nature, 222, 142-146.
- Kuntzel, H. e Noll, H. (1967) - Mitochondrial and cytoplasmic polysomes from Neurospora crassa - Nature, 215, 1340-1345.
- Labrie, F. (1969) - Isolation of an RNA with the properties of haemoglobin messenger - Nature, 221, 1217-1222.
- Lara, F.J.S. e Hollaender, F.M. (1967) - Changes in RNA metabolism during the development of R. angelae - Nat. Cancer Inst. Monogr., 27, 235-242.
- Lara, F.J.S.; Tamaki, H. e Pavan, C. (1965) - Laboratory culture of R. angelae - Amer. Natur., 99, 189-191.
- Laufer, H. e Nakase, Y. (1965) - Salivary gland secretion and its relation to chromosomal puffing in the dipteran Chironomus thommi - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 53, 511-516.
- Lederberg, J. (1966) - in Current topics in developmental Biology 1 , IX-XIII Eds. A. Monroy e A.A. Moscona.

- Liao, S.; Sagher, D.; Lin, A.H. e Fang, S. (1969) - Mg^{2+} specific forms of soluble liver RNA polimerase - Nature, 223, 297-298.
- Lima de Faria, A.; Birnstiel, M. e Jaworska, H. (1969) - Amplification of ribosomal cistrons in the heterochromatin of acheta - Genetics, 61, suppl. 1, 145-159.
- Littauer, U.Z. e Sela M. (1962) - An ultracentrifugal study of the efficiency of some macromolecular inhibitors of RNase - Biochim. Biophys. Acta, 61, 609-611.
- Loening, U.E. (1967) - The fractionation of high-molecular weight RNA by polyacrylamide gel electrophoresis - Biochem. J., 102, 251-260.
- Loening, U.E. (1968) - Molecular weights of rRNA in relation to evolution - J. Mol. Biol., 38, 355-365.
- Loening, U.E.; Jones, K. e Birnstiel, M.L. - Biochem. J. no prelo.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, J.J.; Farr, A.L. e Randall, R.J. (1951) - Protein measurement with the folin phenol reagent - J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Maden, B.E.H. (1968) - Ribosome formation in animal cells - Nature, 219, 685-689.
- Maden, B.E.H. e Vaughan, M.H. (1968) - Synthesis of ribosomal proteins in the absence of ribosome maturation in methionine-deficient HeLa cells - J. Mol. Biol., 38, 431-435.
- Markham, R. e Smith, J.D. (1952) - The structure of RNA 1. Cyclic nucleotides produced by ribonuclease and by alkaline hydrolysis - Biochem. J., 52, 552-557.
- Marmur, J. (1961) - A procedure for the isolation of DNA from micro-organisms - J. Mol. Biol., 3, 208-218.

- Martin, R.B. e Ames, B.N. (1961) - A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application to protein mixtures - J. Biol. Chem., 236,1372-1379.
- Maul, G.G. e Hamilton, T.H. (1967) - The intranuclear localization of two DNA-dependent RNA polimerase - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 57,1371-1378.
- McConkey, E.H. (1967) - The fractionation of RNA's by sucrose gradient centrifugation - In Grossman, L e Moldave, K. - Methods in Enzymology, New York, Academic Press Inc. vol. XII, 620-634.
- McConkey, E.H. e Hopkins, J.W. (1965) - Subribosomal particles and the transport of mRNA in HeLa cells J. Mol. Biol., 14,257-270.
- McConkey, E.H. e Hopkins, J.H. (1969) - Molecular weights of some HeLa ribosomal RNA's - J. Mol. Biol., 39,545-550.
- Melli, M. e Bishop, J.O. (1969) - Hybridization between rat liver DNA and complementary RNA - J. Mol. Biol., 40, 117-136.
- Meneghini, R. (1969) - A biossíntese de DNA nas glândulas salivares de R. angelae. - Tese de Doutorado, F.F.C.L. S.P.
- Meneghini, R.; Armelin, H.A. e Lara, F.J.S. (1968) - Change in patterns of inhibition by Actinomycin D of uridine-H³ incorporation into salivary gland RNA of Rhynchosciara at different larval ages - Biochem. Biophys. Res. Comm., 32,846-851.
- Meneghini, R.; Armelin, H.A.; Balsamo, J. e Lara, F.J.S. (1969) - Gene amplification in Rhynchosciara salivary glands II. Evidence by RNA-DNA hybridization - Submetido à Publicação.
- Miller Jr., O.L. e Beattly, B.R. (1969a) - Extrachromosomal nucleolar genes in amphibian oocytes - Genetics, 61, suppl. 1, 133-143.

- Miller Jr., O.L. e Beatty, B.R. (1969b) - Visualization of nucleolar genes - Science, 164,955-957.
- Mohan,J.; Dunn, A. e Casola, L. (1969) - rDNA in the rat - Nature, 223,295-296.
- Monod, J. e Jacob, F. (1961) - General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation - Symp. Quant. Biol., 26,389-401.
- Moriyama, Y.; Hodnett, J.L.; Prestayko, A.W. e Busch, H. (1969) - Studies on the nuclear 4 to 7s RNA of the Novikoff Hepatoma - J. Mol. Biol., 39,335-349.
- Muramatsu, M. e Busch, H. (1965) - Studies on the nuclear and nucleolar RNA of regenerating rat liver - J. Biol. Chem., 240,3960-3966.
- Muramatsu, M. e Fujisawa, T. (1968) - Methylation of ribosomal RNA precursor and t-RNA in rat liver - Biochim. Biophys. Acta, 157,476-492.
- Muramatsu, M.; Hodnett, J. e Busch, H. (1966) - Base composition of fractions of nuclear and nucleolar RNA obtained by sedimentation and chromatography - J. Biol. Chem., 241,1544-1550.
- Muramatsu, M.; Utakoji, T. and Sugano, H. (1968) - Rapidly labeled nuclear RNA in chinese hamster testis - Exptl. Cell. Res., 53,278-283.
- Nanney, D.L. (1968) - Cortical patterns in cellular morphogenesis - Science, 160,496-502.
- Naono, S. e Gros, F. (1969) - On the mechanism of transcription of the Lambda genome during induction of lysogenic bacteria - J. Mol. Biol., 25,517-536.
- Nass, M.M.K. (1969) - Mitochondrial DNA: advances, problems, and goals - Science, 165, 25-35.
- Noll, H. e Stutz, E. (1968) - The use of sodium and lithium dodecyl sulfate in nucleic acid isolation - Methods in Enzymology XII eds. L. Grossman e K. Moldave, part B, 129-155.

- Ono, H. e Terayama, H. (1968) - Amino acid incorporation into proteins in isolated rat liver nuclei - Biochem. Biophys. Acta, 166, 175-185.
- Oyama, V.I. e Eagle, H. (1956) - Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 91, 305.
- Papaconstantinou, J. e Julku, E.M. (1968) - The regulation of rRNA synthesis and ribosomal assembly in vertebrate lens - J. Cell. Physiol., 72, suppl. 1, 161-179.
- Paul, J. e Hunter, J.A. (1969) - Synthesis of macromolecules during induction of haemoglobin synthesis by erythropoietin - J. Mol. Biol., 42, 31-41.
- Pavan, C. (1959) - Morphological and physiological aspects of chromosomal activities - Proc. of the X International Congress Genetic, 321-336.
- Pavan, C. (1965) - Nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and the problem of differentiation - Brookh. Symp. Biol., 18, 222-241.
- Penman, S. (1966) - RNA metabolism in the HeLa cell nucleus - J. Mol. Biol., 17, 117-130.
- Penman, S.; Smith, I. e Holtzman, E. (1966) - rRNA synthesis and processing in a particulate site in the HeLa cell nucleus - Science, 154, 786-789.
- Penman, S.; Vesco, C. e Penman, M. (1968) - Localization and kinetics of formation of nuclear heterodisperse RNA, cytoplasmic heterodisperse RNA and polyribosome associated mRNA in HeLa cells - J. Mol. Biol., 34, 49-65.
- Pene, J.J.; Knight, E. e Darnell, J.E. (1968) - Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa cell ribosomes - J. Mol. Biol., 33, 609-623.
- Perkowska, E.; MacGregor, H.C. e Birnstiel, M. (1968) - Gene amplification in the oocyte nucleus of mutant and wild-type Xenopus laevis - Nature, 217, 649-650.

- Perry, R.P. (1962) - The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4s RNA - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 48,2179-2184.
- Perry, R.P. (1967) - The nucleolus and the synthesis of ribosomes - Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 6,220-257.
- Perry, R.P. e Kelley, D.E. (1966) - Buoyant densities of cytoplasmic ribonucleoprotein particles of mammalian cells: distinctive character of ribosome subunits and the rapidly labelled components - J. Mol. Biol., 16,255-268.
- Perry R.P. e Kelley, D.D. (1968) - mRNA- Protein complexes and newly synthesized ribosomal subunits: analysis of free particles and components of polyribosomes - J. Mol. Biol., 35,37-59.
- Plagemann, P.G.W. (1969) - RNA synthesis in exponentially growing rat hepatoma cells I. A caution in equating-pulse-labelled polyribosomal RNA with mRNA - Biochim. Biophys. Acta, 182,46-56.
- Prescott, D.M. (1964) - Cellular sites of RNA synthesis - Progress in Nuc. Ac. Research and Mol. Biol., 3, Eds. Davidson e Cohn, 33-57
- Prestayko, A.W. e Busch, H. (1968) - Low molecular weight RNA of the chromatin fraction from Novikoff Hepatoma and rat liver nuclei - Biochim. Biophys. Acta, 169, 327-337.
- Revel, M.; Herzberg, M.; Becarevic, A. e Gros, F. (1968) Role of a protein factor in the functional binding of ribosomes to natural mRNA - J. Mol. Biol., 33,231-249.

- Ris, H. e Chandler, B.L. (1963) - The ultrastructure of genetic systems in prokaryotes and eukaryotes - Sympos. Quant. Biol., 28, 1-8.
- Ristow, H. e Arends, S. (1968) - A system "in vitro" for the synthesis of RNA and protein by isolated salivary glands and by nuclei from *Chironomus*. - Biochim. Biophys. Acta, 157, 178-185.
- Ritossa, F.M.; Atwood, K.C.; Lindsley, D.L. e Spiegelman, S. (1966) - On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA - Nat. Cancer Inst. Monogr., 23, 449-472.
- Ritossa, F.M. e Spiegelman, S. (1965) - Localization of DNA complementary to rRNA in the nucleolus organizer region of *D.melanogaster* - Proc. Natl. Acad. Sci., 53, 737-742.
- Rosset, R. e Monier, R. (1963) - A propos de la présence d'acid ribonucleique de faible poids moléculaire dans les ribosomes d'*E. coli* - Biochim. Biophys. Acta, 68, 653-656.
- Samarina, O.P.; Lukanidin, E.M. e Georgiev, G.P. (1967). - On the structural organization of the nuclear complexes containing mRNA - Biochim. Biophys. Acta, 142, 561-564.
- Samarina, O.P.; Lukanidin, E.M.; Molnar, J. e Georgiev, G.P. (1968) - Structural Organization of nuclear complexes containing DNA-like RNA - J. Mol. Biol., 33, 251-263.
- Schmidt, G. (1957) - Preparation of RNA from yeast and animal tissues - In Colowick, S.P. e Kaplan, N.O., Methods in Enzymology, New York, Academic Press Inc. vol. III, 687-692.
- Scherrer, K. e Darnell, J. (1969) - Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells - Biochem. Biophys. Res. Comm., 7, 486.

- Scherrer, K.; Latham, H. e Darnell, J.E. (1963) - Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to rRNA in HeLa cells - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 49, 240-245.
- Scherrer, K. e Marcaud, L. (1968) - mRNA in avian erythroblasts at the transcriptional and translational levels and the problem of regulation in animal cells - J. Cell. Physiol., 72, suppl. 1, 181-212.
- Scherrer, K.; Marcaud, L.; Zajdela, F.; Breckenridge, B. e Gros F. (1966) - Étude des RNA nucléaires et cytoplasmiques a marquage rapide dans les cellules érythrocytaires aviaires différenciées. - Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 1037-1075.
- Scherrer, K.; Marcaud, L.; Zajdela, F.; London, I.M. e Gross, F. (1966) - Patterns of RNA metabolism in a differentiated cell: a rapidly labelled, unstable 60s RNA with messenger properties in duck erythroblasts - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 56, 1571-1576.
- Shearer, R.W. e McCarthy, B.J. (1967) - Evidence for RNA molecules restricted to cell nucleus - Biochemistry, 6, 283-289.
- Shin, D. e Moldave, K. (1966) - Effect of ribosomes on the biosynthesis of RNA "in vitro" - J. Mol. Biol., 21, 231-240.
- Shortman, K. (1962) - Studies on cellular inhibitors of RNase II. Some properties of the inhibitor from rat liver - Biochim. Biophys. Acta, 55, 88-96.
- Sibatani, A.; Yamana, K.; Kimura, K. e Takahashi, T. (1960) - Fractionation of two metabolically distinct classes of RNA in animal cells and its bearings on cancer - Nature, 186, 215-217.
- Singer, M.F. e Leder, P. (1966) - Messenger RNA: an evaluation - Ann. Rev. Biochem., 35, 195-230.

- Slater, D.W. e Spiegelman, S. (1968) - Template capabilities and size distribution of echinoid RNA during early development - Biochim. Biophys. Acta, 166,82-93.
- Smith, A.E. e Marcker, K.A. (1968) - N-Formylmethionyl tRNA in mitochondria from yeast and rat liver - J. Mol. Biol., 38, 241-243.
- Soeiro, R.; Birnboim, H.C. e Darnell, J.E. (1966) - Rapidly labelled HeLa cell nuclear RNA: II Base composition and cellular localization of a heterogeneous RNA fraction - J. Mol. Biol., 19,362. 372.
- Spirin, A.S. (1964) - Macromolecular structure of RNA - Reinhold Publishing Corporation (1964) - New York.
- Spirin, A.S. (1966) - On "Masked" forms of mRNA in early embryogenesis and in other differentiating systems - Current Topics in Developmental Biology, Eds. A.Monroy e A.A. Moscona, 1, 1-38.
- Spirin, A.S. (1969) - Informosomes - European J. Biochem., 10,20-35.
- Spirin, A.S. e Nemer, M. (1965) - Messenger RNA in early sea urchin embryos: cytoplasmic particles - Science, 150,214-217.
- Srinivassan, P.R. e Boreck, E. (1966) - The methylation of nucleic acids - An. Rev. Biochem., 35,275-298.
- Stanley Jr., W.M. e Bock, R.M. (1965) - Isolation and physical properties of the rRNA of E. coli - Biochemistry, 4, 1302-1311.
- Stavy, L. e Gross, P. (1969a) - Protein synthesis "in vitro" with fractions of sea urchin eggs and embryos - Biochim. Biophys. Acta, 182,193-192.
- Stavy, L. e Gross, P. (1969b) - Availability of mRNA for translation during normal and transcription- blocked development - Biochim. Biophys. Acta, 182,203-213.

- Steele, W.J. (1968) - Localization of DNA complementary to rRNA and preribosomal RNA in the nucleolus of rat liver - J. Biol. Chem., 243, 3333-3341.
- Steiner, D.F. e King, J. (1966) - Insulin-stimulated RNA synthesis and RNA polymerase activity in alloxan-diabetic rat liver - Biochim. Biophys. Acta, 119, 510-516.
- Stent, G.S. (1964) - The operon: on its third anniversary- Science, 144, 816-820.
- Stent, G.S. (1966) - Genetic transcription - Proc. Royal Soc., 164, 181-197.
- Stent, G.S. (1968) - That was the molecular Biology that was - Science, 160, 330-395.
- Stévenin, J.; Mandel, P. e Jacob, M. (1969) - Relationship between nuclear giant-size dRNA and microsomal dRNA of rat - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 62, 490-497.
- Stévenin, J.; Samec, J.; Jacob, M. e Mandel, P. (1968) - Determination de la fraction du génome codant pour les RNA ribosomiques et messagers dans le cerveau du rat adulte - J. Mol. Biol., 33, 777-793.
- Tata, J.R. (1968) - Hormonal regulation of growth and protein synthesis - Nature, 219, 331-337.
- Vaughan, M.H., Soeiro, R.; Warner, J.R. e Darnell, J.E. (1967) - The effects of methionine deprivation on ribosome synthesis in HeLa cells - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 58, 1572-1534.
- Vaughan, M.; Warner, J. e Darnell, J. (1968) - Ribosomal precursor particles in the HeLa cell nucleus - J. Mol. Biol., 25, 235-251.
- Wagner, R.P. (1969) - Genetics and phenogenetics of mitochondria - Science, 163, 1026-1031.

- Wagner, E.K.; Penman, S. e Ingram, V.M. (1967) - Methylation patterns of HeLa cell rRNA and its nucleolar precursors - J. Mol. Biol., 29, 371-387.
- Wallace, H. e Birnstiel, M.L. (1966) - Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer - Biochim. Biophys. Acta, 114, 296-310.
- Warner, J.R.; Knoff, P.M. e Rich, A. (1963) - A multiple ribosomal structure in protein synthesis - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 49, 122-128.
- Warner, J.; Soeiro, R.; Bimboim, C.; Girard, M. e Darnell, J. (1966) - Rapidly labelled HeLa cell nuclear RNA: I. Identification by zone sedimentation of a heterogeneous fraction separate from ribosomal precursor RNA. - J. Mol. Biol., 19, 349-361.
- Waters, L.C. e Dure, L.S. (1966) - RNA synthesis in germinating cotton seeds - J. Mol. Biol., 19, 1-27.
- Watson, J.D. (1963) - Involvement of RNA in the synthesis of proteins - Science, 140, 17-26.
- Watson, J.D. (1965) - Molecular Biology of the gene W.A. Benjamin, Inc.
- Weinberg, R.A.; Loening, U.; Willems, M. e Penman, S. (1967) - Acrylamide gel electrophoresis of HeLa cell nucleolar RNA - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 58, 1088-1095.
- Weinberg, R.A. e Panman, S. (1968) - Small molecular weight monodisperse nuclear RNA - J. Mol. Biol., 38, 289-304
- Widnell, C.C. e J.R. Tata (1966) - Studies on the stimulation by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of the DNA-dependent RNA polymerase of isolated rat-liver nuclei - Biochim. Biophys. Acta, 123, 478-492.
- Wigglesworth, V.B. (1960) - Metamorphosis and body form Harvey lectures, (1958-1959) pg 40-59 - Academic Press,
- Zalta, J.P.; Rozenwajg, R.; Carasso, N. e Favard, M.P. (1962). Isolation d'une fraction de noyaux cellulaires dont la pureté est contrôlée au microscope électronique - C.R. Acad. Sci. Paris, 255, 412, 416.