AMANDA DOS SANTOS BRANDÃO

ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DAS GLÂNDULAS SALIVARES
E DO CORPO GORDUROSO DE *RHYNCHOSCIARA AMERICANA* DURANTE
O DESENVOLVIMENTO

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção de Título
de Doutor em Biotecnologia

São Paulo
2011

AMANDA DOS SANTOS BRANDÃO

ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DAS GLÂNDULAS SALIVARES
E DO CORPO GORDUROSO DE *RHYNCHOSCIARA AMERICANA* DURANTE
O DESENVOLVIMENTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção de Título
de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Gláucia Maria
Machado-Santelli

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Brandão, Amanda dos Santos.

Aspectos celulares e moleculares das glândulas salivares e do corpo gorduroso de *Rhynchosciara americana* durante o desenvolvimento / Amanda dos Santos Brandão. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Gláucia Maria Machado Santelli.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Morte celular programada em insetos.

Versão do título para o inglês: Cellular and molecular aspects of salivary glands and fat body of *Rhynchosciara americana* during development.

Descritores: 1. *Rhynchosciara americana* 2. Glândula salivar 3. Corpo gorduroso 4. Morte celular programada 5. Autofagia 6. Genes antiapoptóticos I. Machado-Santelli, Gláucia Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB018/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Amanda dos Santos Brandão.

Título da Tese: Aspectos celulares e moleculares das glândulas salivares e do corpo gorduroso de *Rhynchosciara americana* durante o desenvolvimento.

Orientador(a): Gláucia Maria Machado Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*Dedico aos meus heróis, às
pessoas que Deus me dá o
privilégio de conviver: minha
querida mãe Alzira e meu irmão
Leonardo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, sempre, pela dádiva da vida.

Ao meu noivo Hugo, pelo imenso amor, respeito, companheirismo e por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma. Sem você teria sido muito mais difícil.

À minha família, meu pai Armando, meus irmãos, Luiz Armando, Sandro, Flavia, Armandinho, Diego e meu sobrinho João Pedro, por todo carinho e amor que sempre tiveram por mim.

À família Kill, que me acolheu com muito carinho, agradeço à Cleo, Shmith (obrigada pela força no delivery), Walber, Vanessa e Ingrid por todos os momentos muito agradáveis.

À Profa Gláucia Santelli, a nossa chefe, por tudo que me ensinou, por me acolher no BioCeM, pela confiança nesse trabalho e pela amizade.

Ao Prof Fábio Siviero, que foi o primeiro que acreditou em mim, agradeço todos os ensinamentos moleculares, também pela confiança nesse trabalho e paciência.

Aos fiéis escudeiros da ordem da mosca preta: Paula, por que me ensinou muito e por ter muita paciência comigo todos esses anos e Alê, que me ajudou muito no início dessa jornada e com os papers de última hora. Obrigada pela amizade.

Ao Jônatas, por ser tão boa gente, apesar de amaleque, por ter me ajudado tanto, por ter compartilhado seus conhecimentos morfológicos comigo, por ter me suportado tanto tempo e pelos bons papos intermináveis. Você é um grande amigo.

Ao Prof Ciro Ferreira, por ter me ajudado em um momento muito difícil da minha vida.

À Camila, por quem guardo uma imensa admiração, agradeço os conselhos, meu sorriso exclusivo, os abraços, a alegria com a qual me recebia todos os dias no laboratório, você é especial.

À Marina, por ser tão meiga e compreensiva, sempre disposta a ajudar, sem dúvida um dos sorrisos mais cativantes e por partilhar os mesmos gostos que eu.

À Raquel, minha irmãzinha mais nova, por essa amizade tão especial. Você sempre me ajudou desinteressadamente, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por tudo.

Ao Evandro pelo otimismo e boas risadas; à Profa Marisa Ionta, por ser meu exemplo de perseverança, sinto sua falta; à Michelle por tornar nosso lab um lugar mais bonito e ser sempre tão amável; à Nati (Peruana) pela companhia em diversos momentos e sempre estar de bom humor; à Vivian por ter me ensinado muito, não ciência, mas sim como me tornar uma pessoa melhor e por disseminar sua luz por onde quer que passe. Vocês são amigos incríveis, que quero guardar para sempre.

Aos muitos colegas do BioCeM: Beatriz, por sempre ver o lado bom das coisas; Mingau, meu companheiro de bancada, por trazer maravilhosas tortas de sua mãe para a gente comer; Marcel, por nos mostrar o lado refinado da vida; Stefânia, por sua calma; e tantos outros, Ísis, Luciana, Luana, Humberto, Marco Aurélio, Profa Marisa Rangel por estarem sempre dispostos a bater um bom papo e por tornarem o BioCeM um lugar único de se trabalhar.

Aos colegas do LBDI, Cris, Renan, Bruno, Edilberto. E claro, ao Adam, por sua sinceridade.

À Profa Vanessa e ao Prof Ruy Jaeger pelo auxílio no experimento de Time Lapse e tantas outras dicas e conselhos.

Ao Prof Klaus Hartfelder pelas análises dos títulos hormonais.

Ao Roberto Cabado por sempre estar disposto a ajudar e participar da arte dessa tese.

À D. Nancy, por sua paciência quase de mãe com a gente e por deixar nossa bagunça sempre em ordem. Vamos sentir sua falta.

À FAPESP, ao CNPq e à Capes pelo suporte financeiro.

“(...) E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse Amor, nada seria. (...)”

Paulo de Tarso

RESUMO

BRANDÃO, A. S. **Aspectos celulares e moleculares das glândulas salivares e do corpo gorduroso de *Rhynchosciara americana* durante o desenvolvimento.** 2011. 130 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A morte celular programada (MCP) tem importante papel na eliminação de células obsoletas, danificadas ou até mesmo de órgãos inteiros. No desenvolvimento de insetos holometábolos alguns tecidos são eliminados durante a metamorfose, dando lugar a outros importantes para a vida adulta. A autofagia atua nesse processo degradando os componentes citoplasmáticos, que são envolvidos por uma dupla membrana. Essa estrutura chamada autofagossomo se funde ao lisossomo e tem seu teor degradado pelas hidrolases lisossomais. Contudo, algumas características da morte celular apoptótica podem estar presentes nesse processo, como a participação de caspases e a fragmentação nuclear. Em *Rhynchosciara americana*, durante a metamorfose, vários órgãos sofrem MCP, e os exemplos mais notáveis são a glândula salivar e o corpo gorduroso. A morfologia desses órgãos foi largamente analisada nesse estudo, enriquecida por diferentes técnicas, utilizando-se as microscopias de luz e eletrônica de transmissão, além de marcadores fluorescentes em microscopia confocal de varredura a laser. Durante a histólise nota-se morfologia fragmentada e condensada do núcleo, confirmada pela quebra internucleossomal com o ensaio de TUNEL. Ambos tecidos apresentam a formação de autofagossomos no período de pupa, contudo a glândula salivar termina o processo de MCP ainda na metamorfose, enquanto o corpo gorduroso somente o completa na fase adulta. Diversos genes que desempenham importante função na MCP foram caracterizados nesse inseto. Dad1 e Bax inhibitor-1 que são genes antiapoptóticos mostraram que possuem função nesse sistema, prevenindo a MCP em ambos os órgãos. Entretanto, Atg1, que é um gene autofágico, atua em todo o desenvolvimento do animal, mas seus níveis mostram-se mais elevados durante a MCP do corpo gorduroso. Os dados apresentados no presente trabalho mostram que em *R. americana* a morte celular programada ocorre com a cooperação dos processos de autofagia e apoptose. Esses resultados são uma nova perspectiva no estudo dos aspectos morfológicos nesse inseto e na elucidação do processo de morte celular programada.

Palavras-chave: *Rhynchosciara americana*. Morte celular programada. Apoptose. Autofagia. Glândula salivar. Corpo gorduroso. Genes antiapoptóticos.

ABSTRACT

BRANDÃO, A. S. **Cellular and molecular aspects of salivary glands and fat body of *Rhynchosciara americana* during development.** 2011. 130 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Programmed cell death (PCD) plays an important role in eliminating obsolete and damaged cells or even an entire organ. In development of holometabolous insects, some tissues are eliminated during metamorphosis giving way to other tissues, more important to adult life. Autophagy acts in this process by degrading cytoplasm contents, which are initially surrounded by a double membrane. This structure called autophagosome fuses with lysosome and its contents are degraded by lysosomal hydrolases. However, some features of apoptotic cell death may be present in this process, such as the involvement of caspases and nuclear fragmentation. In *Rhynchosciara americana*, during metamorphosis, some tissues suffer PCD, and the most notable examples are the salivary gland and fat body. The morphology of these organs was widely analyzed in this work, it was enriched by light and transmission electron microscopy, in addition to fluorescent markers in confocal laser scanning. During the removal of these organs, nuclei present fragmented and condensed morphology, confirmed by TUNEL assay. Both tissues show the formation of autophagosomes, but the salivary gland completes the process of PCD during metamorphosis, while the fat body only completes the process in adult individuals. Several genes that play important function in the PCD were characterized in this insect. Dad1 and Bax inhibitor-1, that are antiapoptotic genes, appear to have a function in this system, preventing PCD in both tissues. Nevertheless, Atg1, which is an autophagic gene, acts during the whole *R. americana* development, but its levels are more elevated during the PCD. The data in this present work shows that *R. americana* programmed cell death occurs with the cooperation of autophagy and apoptosis features. These results provide new perspective on the study of morphology in this insect and the elucidation of the programmed cell death.

Key words: *Rhynchosciara americana*. Programmed cell death. Apoptosis. Autophagy. Salivary gland. Fat body. Antiapoptotic genes.

LISTA DE ABREVIATURAS

2P – 2º período do 4º estágio do desenvolvimento larval

ATG1 – Autophagic Related Gene 1

B2 – Pufe da região 2 do cromossomo B

BI-1 – Bax inhibitor-1

C3 – Pufe da região 3 do cromossomo C

C8 – Pufe da região 8 do cromossomo C

cDNA – DNA Complementar

CG – Corpo Gorduroso

DAD1 – Defender Against Apoptotic Cell Death 1

EST – Expressed Sequence Tag

IR – Início da construção do casulo comunal

LC3 – Microtubule associated light chain – 3

MDC – Monodansilcadaverina

OST – Oligossacaril transferase

PAS – Preautophagosomal structure

pb – Pares de bases

PCR – Polymerase Chain Reaction

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RT-PCR – Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

TOR – Target of Rapamycin

TUNEL – Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin – dUTP Nick End Labeling

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 RHYNCHOSCIARA AMERICANA – MODELO DE ESTUDO	15
1.2 MORTE CELULAR PROGRAMADA	18
1.2.1 TIPO I: APOPTOSE	19
1.2.2 TIPO II: MORTE CELULAR AUTOFÁGICA	24
1.2.3 MORTE CELULAR PROGRAMADA NO DESENVOLVIMENTO	27
1.2.4 REGULAÇÃO HORMONAL: HORMÔNIO ECDISONA	29
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 RHYNCHOSCIARA AMERICANA	34
3.2 SEQUENCIAMENTO DE DNA	34
3.3 TUNEL (TERMINAL DEOXUNUCLEOTIDYL TRANSFERASE BIOTIN – dUTP NICK END LABELING)	36
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	36
3.5 CLONAGEM	37
3.6 SOUTHERN BLOTTING	38
3.7 VARREDURA DO BANCO GENÔMICO DE <i>RHYNCHOSCIARA AMERICANA</i>	39
3.8 PREPARAÇÕES CITOLÓGICAS	40
3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	41
3.10 TIME LAPSE	41
3.11 EXTRAÇÃO DE RNA	42
3.12 PCR AMPLIFICAÇÃO	42
3.13 RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	43
3.14 SÍNTESE DE dsRNA E MICROINJEÇÕES	44
3.15 ENSAIO DE MARCAÇÃO DE VACÚOLOS AUTOFÁGICOS COM MONODANSILCADAVERINA	45
3.16 RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL	45
4 RESULTADOS	46
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA GLÂNDULA SALIVAR DE <i>R. AMERICANA</i>	47
4.1.1 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA SALIVAR DE LARVA	47
4.1.2 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA SALIVAR DE NA FASE DE PUPA	50
4.1.3 MICROSCOPIA EM TEMPO REAL	56
4.1.4 ULTRAESTRUTURA DA GLÂNDULA SALIVAR	59
4.1.4 FRAGMENTAÇÃO DA CROMATINA DA GLÂNDULA SALIVAR	65
4.1.5 VACÚOLOS AUTOFÁGICOS NA GLÂNDULA SALIVAR	68
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO CORPO GORDUROSO	74
4.2.1 MORFOLOGIA DO CORPO GORDUROSO	74
4.2.2 ULTRAESTRUTURA DO CORPO GORDUROSO	77

4.2.3 FRAGMENTAÇÃO DA CROMATINA DO CORPO GORDUROSO	80
4.2.4 VACÚOLOS AUTOFÁGICOS NO CORPO GORDUROSO	83
4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES LIGADOS À MCP.....	89
4.3.1 RADAD1.....	90
4.3.2 RABAX INHIBITOR-1	98
4.3.3 RAATG1	100
4.3.4 HORMÔNIO 20-HIDROXI ECDISONA	102
 5 DISCUSSÃO	 104
 6 CONCLUSÃO	 114
 REFERÊNCIAS	 116
 ANEXO A – MICROSCOPIA EM TEMPO REAL (TIME LAPSE) DA GLÂNDULA SALIVAR DE PUPA DE <i>R. AMERICANA</i>.....	 129
 ANEXO B – MICROSCOPIA EM TEMPO REAL (TIME LAPSE) DA GLÂNDULA SALIVAR DE LARVA NO 2^o PERÍODO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>R. AMERICANA</i>	 130

1 INTRODUÇÃO

1.1 RHYNCHOSCIARA AMERICANA – MODELO DE ESTUDO

Rhynchosciara americana é um díptero da família *Sciaridae*, que foi primeiramente descrito em 1821 por Wiedemann. Em 1951, a espécie foi reclassificada como *Rhynchosciara angelae* por Nonato e Pavan e somente em 1969, Breuer et al. notaram que se tratava da mesma espécie e então prevaleceu o primeiro nome.

Desde a década de 1950, *Rhynchosciara americana* tem sido estudada sistematicamente. A espécie tornou-se um interessante sistema para o estudo da fisiologia de cromossomos politênicos (DREYFUS et al., 1951), já que estes aparecem em diferentes órgãos larvais, destacando-se as glândulas salivares, intestinos e túbulos de Malpighi. Foi o primeiro organismo em que foi evidenciada a amplificação gênica, em regiões específicas de seus cromossomos politênicos (FICQ e PAVAN, 1957; BREUER e PAVAN, 1955; MACHADO SANTELLI e BASILE, 1975; GUEVARA e BASILE, 1973; GLOVER et al., 1981) chamadas comumente de pufes de DNA, que são rigidamente reguladas ao longo do desenvolvimento (MACHADO-SANTELLI, 1973).

A utilização dessa espécie em laboratório apresenta algumas vantagens em relação a outros insetos, dentre as quais podemos citar as suas grandes proporções, que facilitam sua manipulação e permitem a obtenção de ácidos nucleicos com o sacrifício de poucos animais; o fato de apresentar um ciclo de vida longo (aproximadamente 60 dias), o que permite maior controle sobre experimentos envolvendo diferentes pontos de desenvolvimento; ótimas preparações citológicas e, finalmente, o que talvez seja sua principal característica, o desenvolvimento sincronizado de indivíduos irmãos, desde a postura dos ovos até a eclosão das imagos, passando pela metamorfose, o que nos permite construir séries de dados com espécimes dos mesmos grupos.

As larvas desse gênero possuem um desenvolvimento sincrônico, As fêmeas copulam apenas uma vez, e seus ovos eclodem ao mesmo tempo, permanecendo no estágio larval por aproximadamente 60 dias. O desenvolvimento larval é dividido em quatro estágios. O quarto estágio, o maior deles, subdivide-se em seis períodos, sendo nesse estágio que as larvas

param de se alimentar e formam o casulo comunal (TERRA et al., 1973). É também no quarto estágio que ocorre a abertura dos grandes pufes, durante a construção do casulo comunal. Acredita-se que os genes amplificados por esses pufes estejam envolvidos no processo de construção do casulo (WINTER et al., 1977b). Na espécie *R. americana*, o padrão de amplificação gênica em algumas regiões específicas, como os pufes de DNA B2 e C3 foi extensivamente caracterizado (SANTELLI et al., 1991; FRYDMAN et al., 1993; PENALVA et al., 1997; SANTELLI et al., 2004), facilitando assim a determinação da fase do desenvolvimento em que os indivíduos “irmãos” se encontram.

Ao final do quarto estágio, quando ocorre a metamorfose, alguns órgãos são eliminados, como a glândula salivar, ou modificados, como o intestino e o corpo gorduroso, envolvendo a morte celular programada (MCP). Esses órgãos são eliminados já que não terão função ou terão sua função modificada nas fases subsequentes e dão lugar a outros órgãos importantes para o adulto. Esse processo foi caracterizado em outros insetos, tais como *Chironomus thummi* (SCHIN e LAUFER, 1973) e *Drosophila melanogaster* (LEE e BAEHRECKE, 2001; MYOHARA, 2003), sendo classificado como autofágico. Seus mecanismos de regulação ainda são pouco conhecidos, mas sabe-se que se distinguem morfológicamente da apoptose, contudo existem estudos que apontam que ambos processos compartilham de algumas vias de regulação (EDINGER e THOMPSON, 2004).

Dentre os órgãos que sofrem modificações durante a metamorfose de diversos insetos, incluindo *R. americana*, daremos destaque neste trabalho à glândula salivar e ao corpo gorduroso.

A glândula salivar de *Rhynchosciara americana* é um órgão de grandes proporções na larva, podendo atingir uma vez e meia seu comprimento. A glândula salivar fica ligada à parte inicial do tubo digestivo por ductos salivares e pode ser dividida morfológicamente em três regiões, sendo a seção proximal ou S1, a seção média ou S2 e a seção distal ou S3. A glândula salivar é responsável pela produção da secreção que dará origem ao casulo comunal. Durante o período de construção do casulo é que se notam as atividades dos principais pufes descritos em *R. americana*, os pufes da região 2 do

cromossomo B (B2), da região 3 do cromossomo C (C3) e da região 8 do cromossomo C (C8) (OKRETIC; PENONI; LARA, 1977).

O corpo gorduroso é um órgão que ocupa quase toda a extensão da larva e perdura até a fase adulta. Durante a fase larval é um órgão longo e achatado de cor marrom alaranjada que modifica-se durante a metamorfose e na fase adulta se torna um órgão de forma granular imerso na hemolinfa. Dentre as funções desse órgão pode-se destacar sua importância na biossíntese e mobilização de reservas energéticas, em forma de gordura e glicogênio. O corpo gorduroso também desempenha fundamental papel no metabolismo intermediário do organismo, como o metabolismo de lipídeos e carboidratos, síntese de proteínas, síntese de aminoácidos e metabolismo de nitrogênio. Além disso, grande parte das proteínas e metabólitos da hemolinfa são sintetizados no corpo gorduroso, sendo também responsável pela produção de vitelo dos ovos desses insetos (ARRESE e SOULAGES, 2010).

O corpo gorduroso é um órgão de extrema relevância para a vida dos holometábolos, pois serve como reserva energética para as etapas em que o organismo está impossibilitado de se alimentar, como durante a metamorfose e as primeiras horas de vida da imago (ARRESE e SOULAGES, 2010).

Esse órgão sofre morte celular programada durante a metamorfose, mas não é eliminado, como sugeriram Aguila et al. (2007) que encontraram células de corpo gorduroso marcadas com GFP (*Green Fluorescent Protein*) em adultos de *Drosophila*, indicando que essas células de corpo gorduroso apresentam-se como importante fonte de nutrientes nos primeiros dias de vida adulta.

Figura 1 – Linha da vida de *Rhynchosciara americana*.

Fonte: Machado-Santelli (2004) não publicado¹

1.2 MORTE CELULAR PROGRAMADA

Morte Celular Programada (MCP) desempenha importante papel em diversos processos, como a eliminação de células defectivas ou órgãos obsoletos. O termo “Morte Celular Programada” (do inglês *Programmed Cell Death*) foi primeiramente empregado por Lockshin e Williams, em 1964, para descrever o colapso dos músculos intersegmentais do bicho-da-seda durante a metamorfose. Diferentes mecanismos regem o processo de MCP durante o desenvolvimento, mesmo em diferentes órgãos de um mesmo modelo biológico (BAEHRECKE, 2003, MCPHEE e BAEHRECKE, 2009).

¹ MACHADO-SANTELLI, G. M. Figura Linha da vida de *Rhynchosciara americana*. São Paulo, 2004.

A MCP pode ser classificada em três tipos: **apoptose**, ou **morte celular programada (MPC) tipo I**, caracterizada pela fragmentação ordenada da célula e seu núcleo, deformação da membrana plasmática e consequente formação de vesículas (corpos apoptóticos), que serão fagocitadas e digeridas por células adjacentes ou especializadas; **MCP do tipo II**, ou **autofágica**, envolve a formação de vacúolos envoltos por duplas membranas que englobam várias estruturas celulares para enviar ao lisossomo para sua destruição. Esse tipo de morte pode ser iniciado por fatores sinalizadores do desenvolvimento normal do organismo, ou por eventos deletérios, como, por exemplo, deficiência nutricional ou hipóxia; **MCP do tipo III** é um tipo de morte não lisossomal que ainda não está bem descrito, raramente encontrado em condições fisiológicas, é caracterizado pela turgescência das organelas e formação de espaços vazios em todo o citoplasma.

A seguir são descritos com maior detalhamento os tipos I e II de morte celular programada.

1.2.1 TIPO I: APOPTOSE

A morte celular do tipo I, apoptose, foi primeiramente descrita por Kerr, Wyllie e Currie (1972), e seu nome teve origem no evento das quedas das folhas no outono, que estão programadas para acontecer em determinada época do ano.

Esse tipo de morte é caracterizado pela ativação de uma cascata de sinalização intermediada por importantes proteínas chamadas caspases, cascata esta que, uma vez ativada, é irreversível. Outras características importantes da apoptose são a fragmentação internucleossomal da cromatina, deformação da membrana plasmática, formação de vesículas as quais expulsam os fragmentos celulares, chamadas corpos apoptóticos. Essa série de eventos ocorre sem que haja extravasamento do conteúdo celular e prejuízos para as células vizinhas, que muitas vezes podem absorver os corpos apoptóticos, ou então eles são engolfados por macrófagos. Os macrófagos são capazes de reconhecer células apoptóticas devido ao fato de que o fosfolípídeo

fosfatidilserina, que está em condições normais inserido na camada citosólica da membrana plasmática, é enviado então à camada extracelular da bicamada lipídica.

Para que a apoptose ocorra, existem duas vias de ativação possíveis, sendo a via extrínseca, que é ativada por estímulos externos que se ligam a receptores de morte que fazem iniciar a cascata de sinalização, e a via intrínseca, que ocorre quando um sinal intracelular ativa outra via de sinalização que libera alguns fatores do espaço intermembranas da mitocôndria.

Ambas as vias apoptóticas levam a ativação da classe específica de proteases, as caspases. As caspases (*cystein aspartic acid proteases*) possuem uma cisteína em seu sítio catalítico e clivam suas proteínas-alvo em ácidos aspárticos específicos. As caspases estão presentes na célula em forma zimógena, e são proteoliticamente clivadas e ativadas durante a apoptose. São divididas em duas classes principais:

- (1) Caspases iniciadoras ou desencadeantes: são caspases que são ativadas pelos sinais internos ou externos e ativam as caspases executoras. São elas caspases 2, 8, 9 em mamíferos e DCP-2/DREDD, DRONC E DREAM em *Drosophila*.
- (2) Caspases executoras: permanecem inativas na célula até serem clivadas pelas caspases iniciadoras e têm como alvo diversos componentes celulares, como a lâmina nuclear, DNA, proteínas do citoesqueleto etc. São elas caspases 3, 6 e 7 em mamíferos e DRICE, DCP-1, DECAY, DAYDREAM em *Drosophila*.

Na via extrínseca, quando um ligante de morte encontra seus receptores, eles são recrutados na membrana plasmática e, por sua vez, recrutam caspases iniciadoras que levam a ativação de caspases executoras. As caspases executoras inativam enzimas como a iCAD que tem função de inibir a ação da endonuclease CAD (*Caspase-activated DNase*), que será responsável por clivar o DNA em sequências inespecíficas.

A via intrínseca pode ser ativada, por exemplo, na impossibilidade de reparar danos causados ao DNA por radiações ou erros no processo replicativo. A família Bcl2 tem papel fundamental nesse processo, controlando a liberação de proteínas do espaço intermembranas da mitocôndria. Essa

família possui representantes proapoptóticos, como Bak e Bax, e antiapoptóticos, como Bcl2, BclxL. Quando ocorre a ativação da via, a proteína p53 se acumula, levando à expressão de BH3, que neutraliza a ação de Bcl2 e BclxL, ativando assim Bak e Bax que contribuem para a permeabilização da membrana mitocondrial. No espaço intermembranas da mitocôndria residem diversas proteínas que exercem importante papel na apoptose, como o citocromo C, o qual se une à proteína Apaf-1 para formar o apoptossomo. Essa holoenzima ativa caspases efetoras que vão levar à clivagem do DNA em regiões internucleossomais. A via extrínseca pode também ativar a permeabilização da mitocôndria, usando assim a via intrínseca para levar a celular à morte apoptótica. O processo de apoptose pode ser visto resumidamente na Figura 2.

Entre os diversos fatores que também são liberados do espaço intermembranas da mitocôndria estão proteínas que inativam as IAPs (*inhibitor of apoptosis protein*), outras endonucleases e fatores ligados ao empacotamento do DNA.

Figura 2 – Esquema geral da apoptose.

Fonte: Modificada de revisão de Yan e Shi, 2005.

Outro gene postulado com ação antiapoptótica é o DAD-1, uma proteína hidrofóbica altamente conservada evolutivamente. O gene DAD-1 humano possui 100% de identidade com o mesmo gene de *hamster*. Foi primeiramente identificado por Nakashima et al. (1993) em células tsBN7, derivadas da linhagem celular BHK21 de hamster, que possuíam dupla mutação recessiva nesse gene, susceptível assim à morte por apoptose sob temperaturas restritivas. A mesma mutação que foi caracterizada em células de hamster, apresentou aspectos similares em células humanas. Nesse mesmo trabalho, Nakashima et al. caracterizaram esse gene, o qual continha três exons em sua estrutura. DAD foi caracterizada como uma subunidade do complexo oligossacariltransferase em mamíferos, que se situa na membrana do retículo endoplasmático rugoso, sendo observado que DAD-1 de humanos possui 40% de identidade com a proteína Ost2 de levedura (KELLEHER e GILMORE, 1997). A oligossacariltransferase (OST), como o nome propõe, catalisa a glicosilação n-ligada, que consiste na transferência de um oligossacarídeo rico em manose para resíduos de asparagina e de polipeptídeos nascentes. A OST de *Saccharomyces cerevisiae* compreende seis subunidades não idênticas.

Dad1 está localizada na membrana do retículo endoplasmático, contudo as duas regiões terminais estão posicionadas para a região interna, voltadas para o citoplasma (MAKISHIMA, 1997), embora em pâncreas canino a porção C terminal apareça posicionada dentro da membrana.

Além de DAD1, outra proteína que regula negativamente a apoptose é *Bax inhibitor-1* (BI-1). O gene BI1 foi descrito primeiramente por Walter et al. (1994), clonado de testículos de rato, por isso recebeu o nome TEGT (*testis enhanced gene transcript*). BI-1 é conhecidamente um inibidor de Bax, membro proapoptótico da família Bcl-2, que ativa a apoptose alterando o potencial da membrana mitocondrial, contudo BI-1 age indiretamente, interagindo com outros genes antiapoptóticos como os da família Bcl-2, como o próprio Bcl-2 e Bcl-x_L (HÜCKELHOVEN, 2004).

BI-1 é uma proteína integrante de membrana localizada no retículo endoplasmático, tendo sua porção maior voltada ao lúmen (CHAE et al., 2004). Essa proteína mostra-se bastante conservada entre os eucariotos, sendo que a proteína de humanos é capaz de prevenir a morte celular programada quando expressa em células de leveduras (XU e REED, 1998).

Essa proteína regula os canais de cálcio na membrana do retículo endoplasmático, dependendo do pH e quando superexpressa na célula, diminui a liberação de Ca^{2+} do interior da organela (KIM et al., 2008). Quando está subexpressa, promove a morte celular (KIM et al., 2008). BI-1 é requerida para manter o estresse induzido ou para manter o controle sobre a morte celular programada durante o desenvolvimento (HÜCKELHOVEN, 2004).

1.2.2 TIPO II: MORTE CELULAR AUTOFÁGICA

Autofagia é um processo celular catabólico, que tem por objetivo eliminar componentes citoplasmáticos em condições de estresse, como o jejum e a hipóxia. A autofagia diferencia-se da degradação via proteassomo por não selecionar os componentes a serem eliminados, contudo essa hipótese foi recentemente revista e acredita-se que os conteúdos podem ou não serem enviados de forma seletiva para a degradação autofágica (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010). Existem diversas formas conhecidas de autofagia seletiva, como a pexofagia, que consiste na degradação dos peroxissomos e a mitofagia, que degrada seletivamente as mitocôndrias (KIM e KLIONSKY, 2000; SAKAI et al., 2006; YOULE e NARENDRA, 2011). Diferentemente da apoptose, na morte celular do tipo II a cromatina não é o primeiro alvo da degradação, bem como o citoesqueleto (CUERVO, 2004).

Além da morte celular programada, a autofagia tem sido associada a diferentes processos celulares, e parece ser essencial em vários deles, como o envelhecimento, doenças neurodegenerativas e resposta imunológica (MCPHEE e BAEHRECKE, 2009).

A autofagia pode ser classificada em três formas distintas, sendo microautofagia, que consiste na degradação de componentes citoplasmáticos endereçados diretamente para o lisossomo, internalizados por invaginação ou protrusão da membrana do lisossomo; macroautofagia, que isola o material a ser degradado, como proteínas ou organelas inteiras, em uma dupla membrana formando o autofagossomo, também referido como vacúolo autofágico, que se fundirá ao lisossomo, formando o autolisossomo; e autofagia mediada por chaperonas, em que proteínas malformadas marcadas por chaperonas como hsp70 são enviadas diretamente para o lisossomo (MASSEY; KIFFIN; CUERVO, 2004; KROEMER e JÄÄTELÄ, 2005; HANNIGAN, 2009). Como no processo de morte celular autofágica o tipo predominante é a macroautofagia, nos referimos à macroautofagia como autofagia.

Em condições normais a insulina sinaliza que os níveis de nutrientes estão corretos e a via de TOR (*Target Of Rapamycin*) bloqueia a via autofágica, levando a célula ao crescimento. Contudo, quando essa via é bloqueada, ativa-

se a via de Classe III PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase), que recruta diversas proteínas envolvidas na formação do autofagossomo. Trinta e cinco proteínas relacionadas à autofagia foram descritas em *S cerevisiae*, fazendo parte da família Atg (*autophagic-related genes*) (SUZUKI e OHSUMI, 2007; KANKI e KLIONSKY, 2010; SUZUKI et al., 2010; NAZARKO et al., 2011), que teve a sua nomenclatura unificada por Klionsky et al. (2003). Grande parte dessas proteínas foi descrita apenas nessa espécie de levedura (MIZUSHIMA, 2007), sendo que apenas algumas delas possuem homólogos em mamíferos, porém novas proteínas relacionadas com autofagia foram caracterizadas em *C. elegans*, algumas se mostrando conservadas também em nematoides e mamíferos (TIAN et al., 2010; MCPHEE e BAEHRECKE, 2010).

As proteínas Atg podem ser classificadas em seis grupos funcionais:

- (1) Complexo Atg1 quinase, que compreende as proteínas Atg1, Atg13, Atg17, Atg29, Atg31;
- (2) Atg 9;
- (3) Complexo Classe III PI3K, que compreende as proteínas Atg6, Atg14, Vps15, Vps34;
- (4) PI(3)P que se liga ao complexo Atg2-Atg18;
- (5) Sistema de conjugação Atg12 com as proteínas Atg12, Atg5 e Atg16;
- (6) Sistema de conjugação Atg8 com a proteína Atg8 e a PE (fosfatidiletanolamina) (SUZUKI e OHSUMI, 2007; MIZUSHIMA, 2010).

Atg1 (ULK1 ou 2 em mamíferos) é uma quinase serina/trionina que possui um domínio conservado de quinase na região amino terminal. Atg1 associa-se a numerosas outras proteínas da família Atg para formar o autofagossomo em eucariotos ou Cvt somente em *Saccharomyces cerevisiae*. Diversos trabalhos mostraram que Atg1 pode ter um papel estrutural no recrutamento de outras proteínas na autofagia, e não somente fosforilando outras proteínas (CHEONG et al., 2008; NEZIS et al., 2010). A importância dessa proteína para o processo de morte celular autofágica pode ser evidenciada em trabalhos os quais mostram que a ativação de Atg1 é suficiente para levar a célula à morte programada em *Drosophila* (SCOTT; JUHA'SZ; NEUFELD, 2007; BERRY e BAEHRECKE, 2007).

Após a ativação da Classe III PI3K, uma série de eventos ocorre para a correta formação do autofagossomo. A origem da membrana que forma o

autofagossomo, chamada fagóforo, é controversa. Alguns estudos mostram que a membrana pode ter múltiplas origens, como o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, o endossomo e até mesmo a mitocôndria (DUNN, 1990; TOOZE e YOSHIMORI, 2010; HARLEY et al., 2010; RAMBOLD e LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2010; GEONG e KLIONSKY, 2010).

Dois sistemas de conjugação são requeridos para o alongamento do fagóforo, o sistema Atg12 e o sistema Atg8. No sistema de conjugação Atg12, essa proteína é hidrolisada e ativada pela ubiquitina Atg7 e transferida para Atg10, uma ubiquitina tipo E1. Quando Atg12 se liga a uma lisina de Atg5, possibilita a formação do complexo Atg12-Atg5-Atg16 e outros três complexos como esse se unirão formando um tetrâmero. O outro sistema de conjugação é da proteína Atg8, que é homólogo da proteína LC3 (ou MAP1LC3 - *Microtubule-associated protein light chain 3*) de mamíferos. Atg4 promove a remoção de uma arginina da região carboxiterminal de Atg8, expondo uma glicina que torna acessível à Atg7. Atg7, por sua vez, ativa Atg8 e o transfere para Atg3 que o une a uma fosfatidiletanolamina (PE) por ligação amina. Atg8 então comporta-se como uma proteína de membrana, contribuindo para a nucleação do autofagossomo (KLIONSKY e EMR, 2000). A proteína LC3-PE tem sido largamente utilizada como marcador específico para vacúolos autofágicos, uma vez que sua forma ligada à PE somente está presente na célula ligada ao fagóforo (MIZUSHIMA e YOSHIMORI, 2007; KLIONSKY, 2009).

Após a formação do autofagossomo, ocorre a fusão deste com o lisossomo, para formar o autolisossomo, que posteriormente irá liberar os produtos da degradação para a reutilização em novos processos celulares (Figura 3).

Figura 3 – Esquemática do processo de autofagia.

Fonte: Modificada de revisão de Baehrecke, 2005.

O processo de formação do autofagossomo e posterior degradação dos conteúdos citoplasmáticos que definem a autofagia estão presentes na morte celular autofágica, porém ainda é bastante controversa sua contribuição para a morte celular, pois ainda são desconhecidos os mecanismos que regem esse processo.

1.2.3 MORTE CELULAR PROGRAMADA NO DESENVOLVIMENTO

Trabalhos recentes demonstraram que características específicas de autofagia estão presentes durante a eliminação de diferentes órgãos em *Drosophila*. Alguns marcadores específicos de autofagia podem ser vistos em eventos iniciais da histólise, mas também características de apoptose e de genes apoptóticos, assim como supressores de apoptose, parecem contribuir para esse processo. Algumas caspases participam da morte celular autofágica

e, em alguns casos, o nocaute dessa proteína pode apenas retardar a morte celular nas glândulas salivares, mas eles não são capazes de bloquear esse processo (BERRY e BAEHRECKE, 2007, 2008).

A morte celular programada pode ter diferentes regulações, em diferentes modelos biológicos ou até mesmo dependendo do órgão no mesmo modelo. Os mecanismos autofágicos e apoptóticos podem ou não interferir nesse processo. Em *Drosophila*, caspases podem colaborar na destruição das glândulas salivares e do corpo gorduroso, mas Denton et al. (2009) demonstraram que as caspases não interferiram na histólise do intestino médio nesse modelo, sendo a via utilizada exclusivamente autofágica. Entretanto, Hou et al. (2008) demonstraram que a proteína Bruce da família IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) atua como inibidor da autofagia no ovário de *Drosophila*. Além disso a inibição nas câmaras do ovo de *Drosophila* diminui a marcação para a fragmentação do DNA, indicando que mecanismos apoptóticos trabalham ativamente para a eliminação de células durante a embriogênese de *Drosophila* (HOU et al., 2008). A caspase efetora DCP-1 e os genes autofágicos Atg1 e Atg7 são essenciais para o sucesso da morte celular das células nutridoras do ovócito (HOU et al., 2008). Outro trabalho mostrou que glândulas salivares de mutantes *Dark* de *D. melanogaster* (homólogo Apaf-1) permaneciam intactas após 36 horas de formação do pupário, mostrando o papel essencial das caspases na eliminação desse órgão (AKDEMIR et al., 2006).

A morte celular autofágica compartilha de diversos mecanismos com a autofagia para a sobrevivência celular, contudo muitos desses mecanismos permanecem obscuros.

Quando alguns fatores ligados ao crescimento celular, como PI3K, Akt e Ras, que foram expressos em *Drosophila melanogaster*, preveniram a MCP das glândulas salivares e estas permaneceram ainda 24 horas após a formação do pupário. Portanto, a parada no crescimento celular é um fator limitante para que ocorra a morte celular autofágica. Para que isso ocorra muitos genes são ativados, dentre eles *Wts*, um supressor de tumor que é essencial para morte da glândula salivar de *Drosophila* (DUTTA e BAEHRECKE, 2008). Por outro lado, a expressão de genes relacionados com o ciclo celular como *Myc* ou Ciclina D/ CDK4 não impede a morte celular autofágica na glândula salivar de

Drosophila. As proteínas do ciclo celular são antagonistas à morte celular apoptótica, sendo assim os mecanismos apoptóticos não são fundamentais para a entrada da glândula salivar na MCP (BERRY e BAEHRECKE, 2007). A inibição de caspases não preveniu a MCP, enquanto o bloqueio de diversos genes ATG foi eficiente na prevenção da histólise da glândula (BERRY e BAEHRECKE, 2007).

1.2.4 REGULAÇÃO HORMONAL: HORMÔNIO ECDISONA

Um importante elemento envolvido na regulação do desenvolvimento de insetos é o esteroide ecdisona. O hormônio ecdisona atua ligando um receptor hormonal nuclear heterodimérico, receptor ecdisona (EcR), ao ultraespiráculo (USP) responsáveis pela ativação e/ou inibição de diversos genes (LEE, 2001). Em *Drosophila*, 12 horas após a formação da pupa, um pulso de ecdisona dispara a morte celular programada das células das glândulas salivares, por uma via mediada por caspases (BAEHRECKE, 2003). Diversas evidências indicam que ecdisona pode regular a morte celular através dos genes EcR, USP, β FTZ-F1, E74A, E74B e E93, muitos destes, no entanto, também participam de outros processos biológicos como diferenciação celular. A mutação do gene E74 de *Drosophila melanogaster* (DmE74) mostra-se letal nas fases mais adiantadas da metamorfose (SEKIMOTO; IWAMI; SAKURAI, 2007). As relações entre as vias sinalizadoras disparadas por ecdisona e a ativação de caspases ainda não são claras, mas o mecanismo de morte celular disparado por esse hormônio modula a expressão de genes com atividades proapoptóticas, tais como hid (*head involution defective*), rpr (*reaper*), ark, dronc e Nc (*Nedd-like caspase*) (LEE, 2001).

No gênero *Rhynchosciara* o hormônio ecdisona foi estudado com o intuito de relacioná-lo com o padrão de amplificação gênica nos cromossomos politênicos. Em *Rhynchosciara hollaenderi*, o hormônio ecdisona é responsável por alterações durante o desenvolvimento, dependendo da concentração de hormônio injetada (STOCKER e PAVAN, 1974). Outros autores demonstraram em *R. americana* que os padrões de amplificação de certos pufes eram

alterados, quando as larvas eram injetadas com ecdisona, não chegando assim à pupação (STOCKER e PAVAN, 1974; BERENDES e LARA, 1975).

Amabis, Amabis e Simões (1977) observaram que ligando a região anterior da larva obstruía-se o fluxo de hemolinfa dessa região para o resto da larva, com isso observavam-se alterações nos padrões de amplificação gênica de alguns pufes. Isso se dá devido ao fato de o hormônio ecdisona ser produzido nas glândulas protorácicas ou na glândula anelar, que se localizam na região anterior da larva, levando assim a um deficit da concentração de ecdisona nas outras regiões.

Já em outros modelos, como em *Drosophila*, em experimento com o enfoque voltado para a morte celular programada, foi possível acompanhar as alterações nos pulsos de ecdisona durante todo o desenvolvimento, e também associá-los à ativação do processo de morte celular programada da glândula salivar (LEE e BAEHRECKE, 2001; LEE; COOKSEY; BAEHRECKE, 2002).

A expressão do hormônio ecdisona em *Drosophila* parece ser regulada, durante a autofagia em corpo gorduroso pelo gene *Dor* (*Deep Orange*) pela via endossômica, bloqueando a via de PI3K, possibilitando a fusão do autofagossomo e do lisossomo (LINDMO et al., 2006; LINDMO e STENMARK, 2006). No entanto, alguns genes associados com morte não parecem ser regulados por esse hormônio, como o *Wts*, supressor tumoral em *Drosophila* (MARTIN et al., 2007).

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é caracterizar morfológicamente a glândula salivar e o corpo gorduroso de *Rhynchosciara americana* em diferentes períodos do desenvolvimento, analisar o processo de morte celular programada nesses órgãos durante a metamorfose e a vida adulta e as características apoptóticas e autofágicas envolvidas nele. Dentro deste contexto caracterizar os genes antiapoptóticos RaDad-1 e RaBax-inhibitor e o gene autofágico RaAtg-1, que estão envolvidos diferentemente com o processo de morte celular programada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 RHYNCHOSCIARA AMERICANA

As larvas de *Rhynchosciara americana* foram coletadas na região de Ubatuba, estado de São Paulo, e são crescidas em laboratório, usando as condições estabelecidas por Lara, Tamaki e Pavan (1965).

3.2 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os clones foram transformados por choque térmico, utilizando bactérias competentes *E. Coli* DH5 α preparadas em cálcio 50mg/L, e placas com meio LB (5g/L NaCl, 5g/L extrato de levedura, 10g/L triptona) contendo ampicilina 100mg/L, 4 μ L IPTG 1M e 40 μ L Xgal 20mg/ml. As colônias selecionadas foram incubadas por um período de 12h em meio LB com ampicilina 100mg/L. Após este tempo as bactérias foram coletadas por centrifugação (5min a 5000g) e a extração do DNA plasmidial foi feita utilizando o kit Concert Mini-prep (GIBCO), ou através de um método denominado Fast Mini Prep, que consiste em adicionar 100 μ L da solução I (50mM glicose, 25mM Tris-HCl pH 8 e 10mM EDTA), homogeneizar em agitador para ressuspender as células, adicionar então 200 μ L da solução II (1% SDS e 0,2M NaOH), solução de lise, misturar por inversão e após 3-5min adicionar 200 μ L da solução III (60mL acetato de potássio 5M, ácido acético glacial 11,5mL e água MilliQ 28,5mL, para que a solução final tenha 3M de potássio e 5M de acetato), solução de neutralização, misturar por inversão e deixar no gelo por 20min. A amostra foi centrifugada por 15min a >14000g a temperatura ambiente. Adicionou-se 300 μ L de isopropanol em tubos limpos. Coletou-se com cuidado 400 μ L do sobrenadante e transferiu-se para o tubo com isopropanol, misturou-se por inversão. Centrifugou-se por 10min a >14000g a temperatura ambiente, drenou-se os tubos. Adicionou-se 500 μ L de etanol 70% gelado, misturou-se por inversão. Centrifugou-se por 5min a >14000g a temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. Secou-se e ressuspendeu-se em água MilliQ ou TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA).

O DNA obtido foi verificado em gel de agarose 0,8% por digestão com enzima de restrição apropriada para checar o inserto e a partir deste DNA preparou-se a reação de PCR de sequenciamento utilizando o modelo de PCR GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) e terminador BigDye v3.1 (Perkin Elmer) e as condições descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros da reação de PCR

Reação	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
2 µL de BigDye 6 µL de Tampão SM 6,5 µL de água 4 µL de DNA 1,5 µL de Primer	1	96	1min
	35	96	20seg
		50	1min
		60	4min
	1	4	∞

O produto de PCR foi precipitado acompanhando o seguinte protocolo; adicionando em cada amostra 25µL de solução gelada de precipitação que continha 23µL de etanol absoluto, 1µL de acetato de sódio 3M pH 5 e 1µL de glicogênio 1g/L, após uma breve agitação em vórtex as amostras permaneceram em gelo por 40min, e são então centrifugadas por 40min a 4000 rpm e 4 °C, após descartar o sobrenadante adicionam-se 50µL de etanol 70% gelado e repete-se o passo de centrifugação, descarta-se o sobrenadante e secam-se as amostras no escuro a temperatura ambiente por 1h, por fim adicionam-se 10µL de tampão de corrida (loading buffer: 10% formamida). Utilizou-se um sequenciador automático de 16 capilares modelo ABI-3100 (PerkinElmer).

As análises dos eletroferogramas gerados a partir da corrida foram realizadas em sistema operacional Linux em que rodavam os programas Phred, Phrap, CrossMatch e Consed 19 (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998), cujas licenças de uso para fins acadêmicos são gratuitas e obtidas diretamente com os autores. Com esses programas foi possível alinhar sequências, separando as que se sobrepõem em "contigs" e as

sequências isoladas em "singlets", além de eliminar das sequências possíveis contaminações de vetores sequenciados.

3.3 TUNEL (TERMINAL DEOXUNUCLEOTIDYL TRANSFERASE BIOTIN – DUTP NICK END LABELING)

As pupas e larvas de *Rhynchosciara americana* foram dissecadas em PBSA (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM KH₂PO₄, 6,5mM Na₂HPO₄) e as glândulas salivares e o corpo gorduroso foram fixados em etanol:ácido acético numa concentração de 3:1, por 30s, e formaldeído numa concentração de 3,7% por cerca de 5min, após lavou-se em PBSA.

As glândulas salivares e o corpo gorduroso foram permeabilizados com Triton 0,1% (X-100) por 10min, e lavou-se 3 vezes com PBSA. Foram colocados, segundo o manual do kit *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche), 45ml da “enzyme solution” e 5ml da “label solution” e foi incubado por 1h a 37 °C em câmara úmida. Após o período de incubação a amostra foi corada com Sytox Green, fechada em lâmina e lamínula onde foi colocada solução protetora de fluorescência (Vecta Shield - Vector) e analisada ao microscópio confocal de varredura a laser (ZEISS- LSM510).

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O método descrito foi utilizado para extrair DNA de moscas. Foram utilizadas de três a cinco moscas em cada procedimento. Em um tubo estéril, já contendo as moscas, adicionaram-se 300µL de TMD (10mM Tris-HCl pH 8, 5mM EDTA e 0,3M cloreto de sódio) e homogeneizou-se com um bastão de vidro (aproximadamente cinco movimentos). Adicionou-se então 12 µL de SDS 20% e 1,5µL de proteinase K 200mg/mL, misturando o tubo por inversão. Incubou-se a reação por cerca de 60min a 65 °C. Em seguida adicionaram-se 300µL de fenol:clorofórmio, agitou-se por inversão durante 3min e centrifugou-

se por 5min a 16000g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo estéril e precipitado o DNA com 600 μ L de etanol 100%. Centrifugou-se por mais 5min a 16000g, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet foi lavado com etanol 70%, mais uma vez centrifugado por 5min a 16000g, o sobrenadante foi retirado com extremo cuidado. O DNA então foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em aproximadamente 40 μ L de TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA) ou água MilliQ.

Para a extração de DNA das glândulas salivares ou corpo gorduroso foi executado o seguinte procedimento: utilizaram-se cerca de cinco pares glândulas de cada período desejado ou corpo gorduroso de cinco indivíduos, e em um tubo de 1,5mL adicionaram-se 300 μ L de solução de digestão (25mM Tris-HCl pH 7,5, 20mM NaCl, 20mM EDTA pH 8 e 4% SDS) mais 1,5 μ L de proteinase K 200mg/mL, incubou-se a 37 °C por cerca de 60min. Fez-se a extração com fenol:clorofórmio 1X, agitou-se por inversão e centrifugou-se por 5min a 16000g. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e precipitou-se com acetato de sódio 3M pH 7 para concentração final de 0,3M e 2,5V etanol absoluto gelado. Centrifugou-se então por 15min a 16000g e o sobrenadante cuidadosamente descartado, o precipitado foi lavado com etanol 70%, novamente centrifugado por 5min a 16000g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco e ressuspenso em cerca de 40 μ L de TE (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA) ou água MilliQ. Os DNAs foram quantificados utilizando o aparelho NanoDrop ND1000 Spectrophotometer.

3.5 CLONAGEM

Nas reações de clonagem o vetor utilizado foi o pBluescriptKS (Stratagene) devidamente clivado com a enzima específica para cada ligação, assim como os fragmentos utilizados na clonagem. Foram gerados subclones para sequenciamento dos recombinantes genômicos ou para utilização como sondas. A enzima ligase utilizada foi a T4 DNA ligase (Invitrogen life Technologies), e as reações de ligação foram realizadas a 16 °C por 12h: 4 μ L

DNA digerido, 1µL vetor KS aberto, 4µL tampão 10X, 1µL T4 DNA ligase e água milliQ para 20µL total de reação.

O produto da ligação foi transformado utilizando a bactéria *E. coli* DH5α em placas com meio LB (5 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona) contendo ampicilina 100 mg/L, 4µL IPTG 1M e 40µL Xgal 20mg/ml. Após a transformação os clones com insertos foram incubados por um período de 12h em meio LB (5 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona) contendo ampicilina 100 mg/L, foram feitas as extrações de DNA plasmidial, verificados e tratados para sequenciamento ou foram utilizados como sonda, de acordo com os protocolos já descritos.

3.6 SOUTHERN BLOTTING

Cerca de 8µg de DNA genômico de *Rhynchosciara americana* foram clivados por cerca de 5h a 37 °C, utilizando enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII*, *XhoI*, *XbaI* e *BamHI* (GIBCO ou Amersham Life Science), então foram colocados por 15min a 65 °C para a inativação das enzimas e aplicado em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo. Após a eletroforese o gel foi tratado com soluções: 15min na solução HCl 0,25M para hidrólise parcial, 15min em NaCl 1,5M/NaOH 0,5M para desnaturação e 30min em 20xSSC para neutralização do DNA. O DNA foi então transferido para uma membrana de Nylon Hybond™-N da Amersham Life Science de acordo com Southern (1975), como descrito em Sambrook et al. (2001), a transferência ocorreu por cerca de 12h e o filtro foi então deixado a 80 °C por 2h, ficando pronto para ser hibridizado.

A sonda foi marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (Amersham) utilizando o kit Nick Translation System da GIBCO/Invitrogen, a reação consistiu de 5µL DNA da amostra, 5µL, mistura de dNTP (ATP, TTP, GTP, menos dCTP), 5µL dCTP $\alpha^{32}\text{P}$, 5µL enzima PolI/DNAseI mix e 30µL água, agitou-se cuidadosamente e incubou-se a 15 °C por 1h. Depois disso foi necessário desnaturar a sonda por aquecimento por 5min. Os filtros incubados em solução 6X SSC, 4X Denhardts, 1% SDS, 200µg/mL DNA de esperma de salmão, primeiramente foram pré-

hibridizados por 1-2h a 65 °C e então adicionou-se a sonda com o DNA marcado aos filtros que foram hibridizados por um período de 12h à mesma temperatura. No dia seguinte, os filtros foram lavados quatro vezes com solução de lavagem 2X SSC, 0,1% SDS e duas vezes com solução 0,2X SSC, 0,1% SDS. Foram analisados após exposição no aparelho phosphoimager Storm (Storm, Molecular Dynamics).

3.7 VARREDURA DO BANCO GENÔMICO DE *RHYNCHOSCIARA AMERICANA*

O banco genômico foi construído a partir de DNA de mosca no bacteriófago lambda DashII (Stratagene). A cada plaqueamento o título do banco era determinado de modo que as placas ficassem com lise quase confluenta para maior aproveitamento da varredura. A infecção era feita a 37 °C por 20min utilizando a bactéria *E. coli* DL 538, cerca de 12 placas quase confluentes eram geradas. As placas de lise eram transferidas para filtros de Nylon Amersham Hibond™-N e tratados com as soluções: NaOH 0,5M / NaCl 1,5M (1min), Tris-HCl 0,5M pH 7,8/NaCl 1,5M (4min) e SSC2X (8min), secos a temperatura ambiente e deixados por 2h na estufa a 80 °C para fixação do DNA na membrana.

Como sondas foram utilizados clones obtidos do banco de ESTs de *Rhynchosciara americana*. A sonda foi marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (Amersham) utilizando o kit Nick Translation System da GIBCO/Invitrogen. A reação consistiu de: 5µL DNA template, 5µL mix dNTP (ATP, TTP, GTP, menos dCTP), 5µL dCTP $\alpha^{32}\text{P}$, 5µL enzima PolI/DNAseI mix e 30µL água, agitou-se cuidadosamente e incubou-se a 15 °C por 1h. Depois disso foi necessário desnaturar a sonda por aquecimento por 5min. Os filtros incubados em solução 6X SSC, 4X Denhardts, 1% SDS, 200µg/mL DNA de esperma de salmão, primeiramente foram pré-hibridizados por 1-2h a 65 °C e então adicionou-se a sonda com o DNA marcado aos filtros que foram hibridizados por 12h à mesma temperatura, sob agitação. Os filtros então foram lavados com as soluções: SSC 2X / SDS 0,1% e SSC 0,2x / SDS 0,1%, cerca de um litro de cada solução,

secos e expostos à placa sensível e escaneados no phosphoimager Storm (Storm, Molecular Dynamics).

Após a hibridização da primeira varredura, os resultados foram impressos em uma transparência, o que possibilita uma fácil sobreposição da transparência contra os filtros e as placas, permitindo uma precisa localização dos pontos positivos. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur, de cabeça para baixo, cada plugue correspondente a cada ponto positivo foi transferido para um tubo contendo 0,5mL lambda buffer (10mM Tris-HCl pH 7,5 e 10mM MgCl₂) e uma gota de clorofórmio. Depois de aproximadamente 2h, 5µL de cada suspensão foi pipetada sob uma placa LB onde já havia sido plaqueada a bactéria competente (DL 538 *E.coli*) e incubada por um período de 12h a 37 °C (REZENDE-TEIXEIRA et al., 2005). O resultado foi uma placa com algumas placas de lise gigantes que foram transferidas para as membranas de nylon e tratadas e hibridizadas como descrita anteriormente. Só depois então de confirmado o plugue como positivo prosseguiram-se as diluições seriadas e hibridizações para obter uma placa de lise isolada e positiva.

3.8 PREPARAÇÕES CITOLÓGICAS

As lâminas foram preparadas a partir de glândulas salivares ou corpo gorduroso de *Rhynchosciara americana*. As larvas foram dissecadas em PBSA (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM KH₂PO₄, 6,5mM Na₂HPO₄), fixadas em etanol:ácido acético numa concentração de 3:1 por aproximadamente 15min. Sobre a lamínula foi colocada uma gota de ácido acético 45% junto com o material e pingou-se orceína acética. Deixou-se o material corar por cerca de 2-3min. O excesso de ácido acético foi retirado e a lâmina fechada e analisada ao microscópio de luz.

O mesmo material foi observado ao microscópio confocal de varredura a laser (ZEISS- LSM510) (CABADO e MACHADO-SANTELLI, 2001), e passou pelo mesmo processo de fixação. Sobre a lamínula foi colocado o material com solução protetora de fluorescência (Vecta Shield - Vector) e corado com iodeto de propídeo.

3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Pupas foram dissecadas em PBSA (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM KH_2PO_4 , 6,5mM Na_2HPO_4), e as glândulas salivares e o corpo gorduroso foram fixados em glutaraldeído.

O material foi lavado com tampão cacodilato 0,1M por aproximadamente 5min, o procedimento foi repetido três vezes e depois lavado com H_2O destilada. Após foi embebido em ósmio 1% durante 1h, em seguida lavado novamente com H_2O destilada e colocada uranila e incubado por um período de 12h. Lavou-se com H_2O destilada, repetindo o procedimento três vezes. Em seguida foram realizadas lavagens com etanol, iniciando com duas lavagens com etanol 70% por 10min, após lavou-se com etanol 95% por 10min, repetindo o procedimento duas vezes, e duas vezes com etanol absoluto por 10min, finalmente adicionou-se óxido de propileno por 5min duas vezes.

O material foi colocado em uma mistura de resina Spurr e óxido de propileno numa proporção de 1:1, durante 5h. Após esse período, para retirar o excesso de óxido de propileno, retirou-se a mistura e adicionou-se resina Spurr pura por mais 5h.

O material embebido em resina foi posicionado corretamente em formas, devidamente identificado com uma etiqueta. A forma foi mantida em uma temperatura de 70 °C durante o período de 72h. Foi realizado o corte ultrafino em ultramicrotomo, e os cortes foram posicionados em grades de cobre, após foram corados com citrato de chumbo e acetato de uranila. Os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010.

3.10 TIME LAPSE

As pupas foram dissecadas em PBSA (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM KH_2PO_4 , 6,5mM Na_2HPO_4), e foram imediatamente posicionadas sobre uma lamínula contendo meio de cultura para insetos Schneider (Sigma). As imagens foram capturadas ao microscópio de fase Axio Mat (Zeiss), em temperatura ambiente (22 °C) e as animações foram obtidas através do software Axio Vision (Zeiss).

3.11 EXTRAÇÃO DE RNA

Para extração de RNA utilizaram-se cinco glândulas e corpo gorduroso de cinco indivíduos de cada período desejado, e em um tubo de 1,5mL adicionaram-se 300µL de solução de digestão (25mM Tris pH 7,5, 20mM NaCl, 20mM EDTA pH 8 e 4% SDS), 1,5µL de proteinase K 200mg/mL e incubou-se a 37 °C por cerca de 60min. Fez-se a extração com fenol:clorofórmio 1X, agitou-se por inversão e centrifugou-se por 5min a 16000g. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e precipitada com acetato de sódio 3M pH 7 para concentração final de 0,3M e 2,5V etanol absoluto gelado.

Os RNAs foram então checados com o método do glioxal-DMSO (GERARD e MILLER, 1997), que consiste em adicionar 30µL da Solução de Glioxal (390µL Glioxal, 450µL DMSO e 90µL tampão fosfato 0,2M) e deixar por 60min a 50 °C. Após o banho, o RNA foi checado em gel agarose 1,2% com tampão fosfato, após a corrida o gel foi corado com azul de metileno. Os RNAs foram quantificados utilizando o aparelho NanoDrop ND1000 Spectrophotometer.

3.12 PCR AMPLIFICAÇÃO

Para amplificar sequências genômicas foram utilizadas informações geradas pelo sequenciamento de um banco de cDNA de *Rhynchosciara americana* (SIVIERO et al., 2006).

Os primers gerados foram (IDT – Integrated DNA Technologies, Inc):

RaDad-1-Right

(5' TAATACGACTCACTATAGGGAGATTGTAGCTTCCTGGC CTAG 3') e

RaDad-1-Left

(5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTACCAAATCCATTCAAAATG 3').

A reação de PCR foi realizada utilizando um par de primer específico, em um termociclador Perkin Elmer 9700 e as seguintes condições: 1µL DNA (10ng), 1,5µL MgCl₂ 50mM, 2µL dNTP Mix (ATP, TTP, GTP, CTP) 20mM, 5µL tampão PCR 10X, 2µL PrimerF 10mM, 2µL PrimerR 10mM, 0,5µL Taq DNA

polimerase (Invitrogen life technologies) e água MilliQ para 50µL final de reação. Os programas utilizados variaram um pouco nas temperaturas de anelamento e tempo de extensão. Para o par de primers foi utilizado o seguinte programa: 94 °C por 30seg, 35 ciclos [94 °C por 30seg; 53 °C por 30seg; 72 °C por 3min] e uma extensão final a 72 °C por 7min. Para os demais primers foi utilizado o seguinte programa: 94 °C por 30s, 35 ciclos [94 °C por 1min; 49 °C por 1min; 72 °C por 1min 30s] e uma extensão final a 72 °C por 7min.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Microcon PCR (Millipore), e clonados utilizando o kit *pGEM-T easy* (Promega) que é ideal para clonagem de produtos de PCR, uma vez que o vetor foi construído com 3' timidina em ambas as extremidades, o que possibilita um aumento na eficiência da ligação, uma vez que a enzima usada nos experimentos também deixa um nucleotídeo não pareado nas extremidades. Após a transformação por choque térmico, os clones selecionados com o inserto foram crescidos para a extração do DNA plasmidial e posterior sequenciamento, utilizando os mesmos protocolos já descritos.

3.13 RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um aparelho da Corbett Research modelo Rotor Gene 6000 real-time cyclers, para cada reação foram adicionados: 10µL SuperMix (contendo a enzima transcriptase reversa); 2µL Primer Mix; 0,5µL RNA e 7,5µL água milliQ (Abgene – Absolute QPCR Sybr Green Mix). As condições dos PCR foram 95 °C por 10min, 40 ciclos [95 °C por 20s; 53 °C por 20s; 72 °C por 40s], seguindo então o melt. A mesma temperatura de anelamento foi utilizada para os três pares de primers. Foram utilizados os seguintes pares de primers:

RaDad-1-Right (5' TTGTAGCTTCCTGGCCTA GC 3') e
RaDad-1-Left (5' CGTTGGAAGTTTCCCGTTTA 3').

RaBI-1-Right (5' TCCGACCAATGCTGTCATAA 3') e
RaBI-1-Left (5' CTGTTGCTCAGCACGACAGT 3').

RaAtg1-Right (5' GTGTGTCAGCCACTTCGAGA 3') e
RaAtg1-Left (5' ACCTCGCGTTCACATTACCC 3').

3.14 SÍNTESE DE DSRNA E MICROINJEÇÕES

Os RNAs dupla fita foram produzidos com o auxílio do kit Megascript RNAi (Ambion), utilizando-se como template para a T7 RNA polimerase a região codificante amplificada com primers contendo a sequência do promotor T7, os primers utilizados para a amplificação de RaDad-1 foram:

RaDad-1-Right (5' TAATACGACTCACTATAGGGAGATTGTAGCTTCCTGGC CTAG 3') e

RaDad-1-Left (5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTACCAAATCCATTCAAATG 3').

A reação de transcrição *in vitro* foi montada conforme manual fornecido pelo fabricante, contendo água livre de nucleases, DNTP (ATP, UTP, GTP, CTP), 1µg de DNA template, tampão e T7 RNA polimerase. A reação é então incubada a 37 °C por um período de 12h. Ao término da reação eleva-se a temperatura a 75 °C por 5min e sobre a bancada a reação resfria a temperatura ambiente por 10min, permitindo assim o anelamento das fitas complementares. A reação é então tratada com DNase e RNase, de forma que o DNA utilizado como amostra e as fitas simples de RNA não aneladas sejam eliminados. O dsRNA é então purificado em coluna de afinidade (fornecida com o Kit) e solução de lavagem de alta força iônica contendo etanol e eluída com solução de baixa força iônica (TE 10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA).

O rendimento foi em média de 550µg/mL, e foram injetados em cada larva 0,15µg de dsRNA durante o segundo período de desenvolvimento larval. Como controle larvas do mesmo grupo foram injetadas com PBS (140mM NaCl; 2,7mM KCl; 1,5mM KH_2PO_4 ; 6,5mM Na_2HPO_4) ou não injetou-se nada. As injeções foram inoculadas com capilares e um injetor automático (Femtojet - Eppendorf).

3.15 ENSAIO DE MARCAÇÃO DE VACÚOLOS AUTOFÁGICOS COM MONODANSILCADAVERINA

As pupas e larvas de *Rhynchosciara americana* foram dissecadas em meio de cultura para inseto Grace (Gibco). As glândulas salivares e o corpo gorduroso foram incubados em meio de cultura contendo 1 μ M do composto Monodansilcadaverina (Sigma), por 30min a temperatura ambiente. Após, lâminas foram montadas com solução protetora de fluorescência (Vecta Shield - Vector) e o material foi corado com iodeto de propídeo. O material foi observado ao microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss- LSM510) (CABADO e MACHADO-SANTELLI, 2001).

3.16 RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL

As preparações citológicas realizadas segundo os detalhes da seção 3.8 dessa tese foram analisadas ao microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510) e utilizadas para as análises *in silico*. Objetiva com aumento de 40X e secções óticas de 0,5-1 mm foram utilizadas para reconstrução 3D no software Imaris 7.1 (Bitplane AG), segundo metodologia estabelecida por Cortez e Machado-Santelli (2008).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA GLÂNDULA SALIVAR DE *R. AMERICANA*

4.1.1 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA SALIVAR DE LARVA

Para iniciar o trabalho foi analisada de forma sistemática a morfologia da glândula salivar durante o período larval. A glândula salivar de *Rhynchosciara americana* é um órgão de grandes proporções na larva, chegando a medir uma vez e meia seu comprimento (Figura 4B). A morfologia da glândula é ilustrada na Figura 4A, em que a três seções estão delimitadas (setas). A região S1 se caracteriza por possuir células de grandes proporções, alinhadas, uma camada delimitando a luz sendo possível identificar ao centro das duas camadas celulares o lúmen da glândula. A região S2 é a mais extensa dentre as três e possui algumas curvas na sua região anterior. A transição entre as regiões S1 e S2 é facilmente distinguida, não somente pela morfologia da glândula propriamente dita, mas também pela organização de suas células, uma vez que as células não estão alinhadas como nas outras regiões. O segmento S3 está localizado na parte posterior da glândula e possui uma curvatura que define seu limite. A organização das células dessa região é bastante peculiar, dispondo-se alternadamente, e o lúmen da glândula forma uma espécie de “zig-zague” (Figura 4A).

As células das diferentes regiões foram observadas comparativamente em dois períodos do desenvolvimento larval, no 2º período e no início da construção do casulo comunal. As células da região S1 estão dispostas de forma regular e possuem polarização bem definida, com a região apical voltada para o lúmen glandular (Figura 5A). Os núcleos das células da região S1 estão localizados próximos à região basal celular e ligado a essa região está o canal salivar que se liga à cabeça da larva. A região S2 é formada por células menores que se organizam ao redor do lúmen da glândula de modo que os núcleos aparecem dispostos em forma de mosaico (Figura 5C). Já na região S3, de glândula extraída de larva em início da construção do casulo, os núcleos estão voltados para o lúmen. Não foi possível notar diferenças morfológicas nos períodos observados (Figura 5).

A glândula salivar tem papel fundamental no desenvolvimento, participando ativamente da construção do casulo comunal nessa espécie. Além de morfologicamente distintas, as três regiões da glândula salivar possuem diferentes níveis de expressão, assim como a atividade dos pufes também tem diferente regulação, dependendo da seção (WINTER, 1977a; SANTELLI et al., 2004).

FIGURA 4 – Glândula salivar de *R. americana*. A: Glândula de larva no 2º período do desenvolvimento, evidenciando suas três regiões: Proximal - S1, Mediana - S2 e Distal - S3. B: Visão geral do par de glândulas salivares de larva em 2º período. As imagens foram obtidas ao microscópio estereoscópico.

FIGURA 5 – Glândulas salivares de *R. americana* no 2º período do quarto estágio (A-C) e início de formação do casulo (D-F), coradas com orceína acética. A: Região S1, com células de grandes proporções alinhadas, núcleos próximos à região basal das células e a região apical voltada para o lúmen (L). B: Visão geral da região S1. C: Região S2 com células com disposição em mosaico. D: Região S3 (seta), células com núcleos voltados para o lúmen, que forma um “ziguezague”. E: Detalhe da região S2. F: Canal salivar. As imagens foram obtidas ao microscópio de luz.

4.1.2 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA SALIVAR DE NA FASE DE PUPA

Durante a metamorfose de *Rhynchosciara americana* severas modificações ocorrem em alguns de seus órgãos. A fase de pupa dura aproximadamente oito dias, sendo que um dia após a formação da pupa inicia-se o processo de autodestruição da glândula salivar, que termina aproximadamente dois dias antes de emergirem os indivíduos adultos.

Para compreender os mecanismos que regem esse processo, as glândulas salivares foram analisadas através de diferentes técnicas de observações morfológicas, possibilitando diferentes dados para comparação.

É possível observar uma drástica diminuição no tamanho e alteração da forma da glândula salivar de *R. americana*, quando comparada com o estágio anterior de seu desenvolvimento, em que ocorria a construção do casulo. A camada externa de cutícula da glândula apresenta ondulações antes não observadas, e não é possível definir precisamente suas regiões (Figura 6A). Durante esse processo é nítido que o tamanho da glândula salivar reduz-se drasticamente em relação ao órgão de larva (Figura 6B).

Para que ocorra a formação do casulo, as larvas irmãs iniciam uma atividade secretora intensa, período que se caracteriza pela atividade de amplificação gênica para construção do casulo comunal. Após aproximadamente dez dias os indivíduos estão separados em unidades no pupário coletivo, o qual possui uma consistência rígida. É nesse período que ocorrem as maiores transformações morfológicas em todo o organismo, inclusive na glândula salivar, pois ela não desempenha mais a função secretora. A fase de pupa perdura por vários dias e o processo de eliminação do órgão em *Rhynchosciara americana* pode ser considerado longo se comparado com o mesmo processo em *Drosophila* que se completa 24 horas após a formação do pupário (LEE et al., 2001). Em alguns dias toda a glândula foi consumida, restando muitas vezes a cutícula que a envolve dispersa na hemolinfa.

A glândula salivar de pupa foi observada ao microscópio de luz em três momentos diferentes. Sendo dois dias após a formação da pupa, quatro dias após a formação do pupário e seis dias após a formação da pupa (Figura 7).

Dois dias após a formação do pupário, a glândula salivar começa a mostrar os primeiros sinais de evolução no processo de morte celular programada, contudo

ainda é possível distinguir as três regiões morfológicas. Quando observamos a região S1, notamos que o citoplasma celular tem seu conteúdo reduzido (Figura 7A). Isso também é observado na região S2, em que se observam espaços entre as células, provavelmente em decorrência da perda de adesão célula-célula (Figura 7B).

FIGURA 6 – Glândula salivar de pupa de *R. americana* durante o processo de degradação. A: Glândula salivar de pupa em processo avançado de morte celular. B: Visão geral do par de glândulas salivares de pupa com seu tamanho bastante reduzido. As imagens foram obtidas ao microscópio estereoscópico.

Na região S3 isso se torna mais evidente, pois as células têm seu volume bastante reduzido, não é possível observar o lúmen glandular e a cutícula que reveste a

glândula perde sua aderência às células (Figura 7C).

Na fase seguinte, quatro dias após a formação do pupário, pode-se observar que o processo de morte progride, tornando a morfologia celular cada vez mais distante da original. Na Figura 7D observa-se que o lúmen da glândula na região S1 está completamente desconectado das duas camadas celulares. As células têm seu volume ainda mais reduzido e todas as regiões passam a ter um aspecto externo rugoso (Figura 7E).

Nota-se também que as células da região S1 estão perdendo a aderência entre si (Figura 7F). E quando esse processo está mais avançado, não é mais possível identificar as seções (Figura 7G). Nessa fase nota-se que os núcleos estão altamente condensados e é possível encontrar núcleos fragmentados (Figura 7H,I).

Ao sexto dia após a formação da pupa, as células apresentam a cromatina fragmentada e condensada (Figura 8), porém em diferentes graus de degradação em diferentes células. Em alguns núcleos os cromossomos conservam os padrões de bandas, quando coradas com orceína acética, sugerindo que este não é um processo totalmente sincrônico (Figura 8A). Muitos núcleos apresentam alto grau de empacotamento da cromatina e diversos fragmentos formando corpos apoptóticos (Figura 8B). Diferentes graus de degradação nas células são esperados, uma vez que este é um processo lento nesse organismo, podendo durar dias.

Glândulas salivares no mesmo período do desenvolvimento foram submetidas à coloração fluorescente, e analisadas ao microscópio confocal de varredura a laser. Os núcleos aparecem corados com iodeto de propídeo em vermelho e em verde a autofluorescência emitida por algumas estruturas principalmente o lúmen da glândula autofluoresce (Figura 10). Este dado mostra-se coerente com o resultado anterior, evidenciando a fragmentação e condensação da cromatina. Destaca-se em verde o lúmen da glândula salivar, que possui sua estrutura alterada, parecendo colabada, devido à perda da função secretora.

Na reconstrução tridimensional de um núcleo da célula glândula observamos os fragmentos que se desprendem do núcleo, evidenciando ainda melhor a formação de corpos apoptóticos (Figura 9)

Quando esse órgão está em processo de morte, as diferenças são muito marcantes, uma vez que essas regiões não são tão bem definidas como anteriormente. Sua superfície, que em indivíduos em estágio precoce do desenvolvimento é uniforme, na glândula em processo de morte apresenta-se

rugosa e a sua massa é muito reduzida.

FIGURA 7 – Glândula salivar de pupas de *R. americana* em diferentes graus de degradação durante a metamorfose, coradas com orceína acética. A-C: Dois dias após a formação do pupário. D-F: Pupas em fase intermediária de degradação da glândula. G-I: pupas em fase final de degradação da glândula salivar. As imagens foram obtidas ao microscópio de luz.

FIGURA 8 – Células da glândula salivar de pupa de *Rhynchosciara americana*, mostrando fragmentação nuclear, coradas com orceína acética. A: Núcleos em diferentes estágios de degradação, mostrando núcleos picnóticos (asterisco), núcleo condensado (seta) e cromossomos politênicos íntegros. B: Núcleos condensados e corpos apoptóticos. As imagens foram obtidas ao microscópio de luz.

FIGURA 9 – Reconstrução em tridimensional de núcleo fragmentado de glândula salivar de *Rhynchosciara americana*. Núcleo: verde. A imagem foi obtida através do software Imaris 7.1.

FIGURA 10 – Fragmentação da cromatina de células da glândula salivar de pupa de *R. americana*. Núcleos: vermelho, Lúmen glandular: autofluorescência em verde. A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser.

4.1.3 MICROSCOPIA EM TEMPO REAL

Outra técnica que está em fase de implantação em nosso laboratório e tem sido de grande valia para elucidação desse processo é a captura de imagens por Time Lapse. As preparações foram realizadas utilizando-se o órgão inteiro, mantido *ex vivo* em meio de cultura para insetos.

A captura de imagens da glândula salivar de pupa foi realizada sob as mesmas condições da amostra controle. Foram obtidas 463 imagens das quais foi selecionada uma amostragem de 12 imagens (Figura 11). Observa-se nas imagens intensa modificação ao longo do tempo. Nas primeiras imagens já é possível notar alterações. Observa-se que no início a cromatina tem aspecto condensado, o envoltório nuclear permanece íntegro e o citoplasma apresenta irregularidades em relação ao controle. Um aspecto que é possível observar novamente nesse experimento é a estrutura deformada da luz da glândula salivar. Nota-se que durante a progressão de aquisição das imagens o envoltório nuclear sofre alterações, e em algumas células observa-se que a membrana nuclear justapõe-se aos cromossomos, sugerindo que esse envoltório nuclear poderá futuramente contribuir para a formação de corpos apoptóticos.

A cromatina dessas células apresenta aspecto modificado em relação às células da glândula de um indivíduo jovem já na primeira imagem. Nas imagens seguintes esse aspecto torna-se ainda mais condensado e aparenta formar algumas protuberâncias, possivelmente caracterizando a fragmentação da cromatina, e indicando que este é um processo extremamente agressivo para a célula. A animação das imagens adquiridas em *Time Lapse* pode ser encontrada nos anexos (ANEXO A)

Como controle, utilizou-se glândula salivar de larva em 2º período do quarto estágio, para analisar se as condições de pressão osmótica e temperatura não interfeririam no resultado. As imagens foram capturadas num intervalo de um minuto, sendo que foram obtidas 120 imagens, das quais foram selecionadas 12 imagens de intervalo de dez minutos de uma imagem para a outra. As imagens evidenciam que não houve alteração na estrutura e morfologia das células, as quais mantiveram ao longo do tempo seu aspecto inicial (Figura 12). As imagens em animação seguem em anexo (ANEXO B).

FIGURA 11 – Observação em tempo real de células da glândula salivar de pupa de *R. americana* durante o processo de morte celular programada. As imagens foram obtidas ao microscópio de contraste de fase.

FIGURA 12 – Observação em tempo real de células da glândula salivar de larva em 2º período do desenvolvimento de *R. americana* utilizada como controle negativo. As imagens foram obtidas ao microscópio de contraste de fase.

4.1.4 ULTRAESTRUTURA DA GLÂNDULA SALIVAR

Para complementar a caracterização morfológica da glândula salivar, foi realizada análise da ultraestrutura da glândula de larvas em 2º período em comparação com pupas em fase avançada do desenvolvimento.

A região S1 é caracterizada pela disposição quase simétrica de suas células ao redor do ducto. Essas células possuem função secretora, portanto observa-se em praticamente todo o citoplasma a abundante presença de retículo endoplasmático rugoso, sendo raramente possível observar outra organela. A Figura 13A mostra uma visão geral das células da glândula. Na região basal as células apresentam numerosas invaginações da membrana citoplasmática (Figura 13B) e a região apical, que possui grande quantidade de microvilosidades. Nota-se que a região apical (Figura 13C), é separada da luz por uma espessa cutícula que possui apenas algumas fenestras para o fluxo do material produzido na célula. Essa cutícula é seguida por longas e abundantes microvilosidades (Figura 13D), sugerindo que o produto da secreção da glândula é assim mais facilmente liberado para o ducto. Na Figura 13E observa-se a presença de parte de um núcleo politênico e grande quantidade de retículo, circundando-o.

As diferenças entre três as regiões da glândula são sutis, contudo dignas de nota. A região S2 (Figura 14A-C) apresenta aspecto diferenciado na região apical, já as microvilosidades são ainda maiores, e voltadas diretamente para a luz da glândula (Figura 14A). Outras estruturas também são notadas, como a presença de grânulos de secreção (Figura 14B), a demasiada quantidade de retículo endoplasmático rugoso no citoplasma e ao redor do núcleo (Figura 14C). A região distal da glândula, S3 (Figura 14D-F) diferencia-se morfológicamente da região S2 por apresentar menor quantidade de microvilosidades e cutícula. Na Figura 14D observamos uma visão geral de célula da região S3, evidenciando a polarização típica de células secretoras e o núcleo com cromossomos politênicos. A Figura 14F mostra o detalhe de um grânulo de glicogênio encontrado próximo à região apical em meio às invaginações da membrana plasmática, limitadas por uma lâmina basal.

FIGURA 13 – Ultraestrutura da região S1 da glândula salivar de larva de *R. americana* no 2º período. A: visão geral da glândula, B: região basal, C: região apical, D: detalhe das microvilosidades e grânulos de secreção, E: transição núcleo-citoplasma, Mb: membrana basal, C: cutícula, Mv: microvilosidade, N: núcleo. As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão.

FIGURA 14 – Ultraestrutura da região S2 (A-C) e S3 (D-F) da glândula salivar de larva de *R. americana* em 2º período: A: Região apical da região S2 e secreção no lúmen (L). B: Microvilosidades e a ausência de cutícula. C: transição núcleo-citoplasma e abundante presença de retículo endoplasmático rugoso. D: Visão geral de célula da região S3, mostrando a região apical, o lúmen da glândula e a região basal e núcleo com cromossomos politênicos. E: Citoplasma repleto de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (M). F: Região basal e a presença de grânulo de glicogênio. Imagens obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão.

Observou-se também a ultraestrutura da glândula salivar quando a construção do casulo comunal é iniciada (Figura 15). Nesse período todas as lavas irmãs cessam suas atividades em busca de alimento e iniciam intensa produção de secreção que formará o casulo. A presença de retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido nas células secretoras aponta para intensa síntese proteica acompanhada pela presença de vesículas revestidas na base das microvilosidades (Figura 15A). Observam-se também a cutícula que limita o lúmen glandular e as células. A região basal das células secretoras destacou-se pela presença de maior quantidade de mitocôndrias (Figura 15B).

Durante o processo de construção do casulo comunal, as larvas permanecem algum tempo com o corpo dobrado ao meio, período em que ocorre a abertura do

pufe C3.

FIGURA 15 – Ultraestrutura da glândula salivar de larva no início da formação do casulo comunal (IR). A: Região apical com microvilosidades voltadas para o lúmen, limitadas por córtica (seta), citoplasma repleto de retículo endoplasmático rugoso. Granulos de secreção revestidos formando-se na base da microvilosidade (detalhe). B: Abundância de mitocôndrias próximas à lâmina basa (MB). Imagens obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão.

Durante o processo de construção do casulo comunal, as larvas permanecem algum tempo com o corpo dobrado ao meio, período em que ocorre a abertura do pufe C3. Após esse período, as larvas se posicionam de forma ereta individualizadas em celas e iniciam a ecdise. Nesse período, conhecido como pré-pupa, os indivíduos têm seu tamanho bastante reduzido e permanecem nessa posição vertical até emergirem os adultos.

Na Figura 16 observamos a ultraestrutura da glândula salivar em indivíduos no estágio de pré-pupa. Apesar de o citoplasma estar repleto de retículo endoplasmático rugoso, temos o início da formação de alguns vacúolos autofágicos (Figura 16A). Nota-se que em todo citoplasma a formação de focos de degradação que se iniciam antes mesmo da formação completa do pupário (Figura 16B).

FIGURA 16 – Ultraestrutura da glândula salivar de pré-pupa. A: Visão geral de célula da glândula salivar de pré-pupa mostrando o início da formação de vacúolos autofágicos (seta). B: Detalhe da formação dos vacúolos autofágicos e parte do núcleo (N). As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão.

Em poucos dias, aproximadamente dois, a pré-pupa dá origem à pupa. A ultraestrutura da glândula salivar de pupa revela uma intensa formação de vesículas em todo o citoplasma. Na Figura 17A é possível observar que a membrana basal da célula secretora apresenta-se contorcida, e em algumas regiões não se nota sua íntima ligação com a membrana basal. Ainda na mesma figura observamos formações de autofagossomos, que ocupam toda a extensão do citoplasma em grande número com diferentes morfologias, indicando que possuem diferentes graus de degradação. Nota-se também que o núcleo dessa célula está bastante elétron denso, possivelmente devido à alta condensação da cromatina (Figura 17A).

Os autofagossomos presentes na glândula salivar de pupa apresentam morfologia típica por estarem revestidos por dupla membrana, além de possuir organelas inteiras em seu interior (Figura 17C). Portanto, a reabsorção dos componentes do retículo endoplasmático rugoso mostrou-se bastante intensa, devido à presença dessas estruturas em diferentes estágios de degradação em grande número no interior dos autofagossomos (Figura 17B). As vesículas possuem

Figura 17 – Ultraestrutura da glândula salivar de pupa. A: Visão geral de célula da glândula salivar durante o processo de morte celular, lâmina basal retraída (Lb), núcleo elétron denso (N). B: Diferentes tipos de vacúolos autofágicos (Au) com diferentes conteúdos, como RER e corpos multilamelares e citoplasma ainda repleto de retículo endoplasmático rugoso (RER). Presença de autolisossomos (Al). C: Detalhe de um autofagossomo (Au), que possui parte de um RER em seu interior. As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão.

diferentes morfologias e algumas se mostram em estágio inicial de degradação, sendo possível ainda identificar organelas dentro do vacúolo autofágico, como os RERs (Figura 17C). Já em outras, o estágio de degradação é avançado, formando estruturas muito elétrons densas, possivelmente se tratam de autolisossomos (Al) (Figura 17B).

4.1.4 FRAGMENTAÇÃO DA CROMATINA DA GLÂNDULA SALIVAR

A morte celular programada apresenta diferentes mecanismos para sua atuação durante o desenvolvimento. Apoptose e autofagia podem trabalhar de forma cooperativa para eliminar órgãos e estruturas obsoletas. Um dos eventos mais tardios da apoptose é a quebra do DNA em regiões internucleossomais. Esse evento pode ocorrer também durante a MCP.

Uma vez que as observações morfológicas permitiram evidenciar a fragmentação da cromatina, formando corpos apoptóticos, fez-se necessário investigar a natureza dessas fragmentações. Para tal, foi realizado ensaio de TUNEL, que permite detectar quebras no DNA, evento típico do processo de morte celular programada. O método utilizado mostrou-se mais eficiente para esse tipo de órgão delicado. Essa técnica tem por objetivo marcar as extremidades 3' OH livres derivadas de clivagens ao longo do DNA pela atuação de enzimas, como, por exemplo, a CAD (*Caspase-Activated Desoxinuclease*). Esse parâmetro é comumente utilizado para detectar células em apoptose.

Para a detecção da quebra de DNA foi utilizada glândula salivar de pupa, cuja cromatina apresentava morfologia condensada e fragmentada. Observou-se que ao longo de toda a glândula salivar, a cromatina apresentou quebras, detectadas pelo marcador fluorescente (Figura 18).

A Figura 19 mostra o controle negativo, que foi obtido a partir de glândula salivar de larvas em 2º período do desenvolvimento, período este que antecede a morte celular programada, em que a cromatina ainda está íntegra, submetida ao kit e contracorada com Sytox green, e como esperado, não houve marcação para a fragmentação do DNA.

FIGURA 18 – Glândula salivar de pupa *R. americana*, marcada com o teste de TUNEL. A: Núcleo (verde); B: marcação de TUNEL (vermelho); C: sobreposição dos canais. As imagens foram obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser

FIGURA 19 – Glândula salivar de larva de *R. americana* em 2º período, utilizadas como controle negativo para o teste de TUNEL. Onde se observa a sobreposição dos canais, sendo TUNEL (vermelho) e núcleos (verde). A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser

4.1.5 VACÚOLOS AUTOFÁGICOS NA GLÂNDULA SALIVAR

Vacúolos autofágicos têm importante papel na degradação do conteúdo citoplasmático. Em 1995, Biederbick, Kern e Elsässer mostraram em linhagem celular de adenocarcinoma pancreático (PaTu 8902) que a substância autofluorescente Monodansilcadaverina (MDC) marcava especificamente os vacúolos autofágicos. Desde então esse marcador é utilizado em diversos modelos para localização e descrição desse processo de morte. Sabe-se que MDC é uma base fraca, e sua capacidade de marcar vacúolos autofágicos depende do mecanismo de aprisionamento de íons (NIEMANN; TAKATSUKI; ELSÄSSER, 2000). MDC tem afinidade com compartimentos ricos em lipídeos, no entanto não é conhecida com clareza a razão pela qual ocorre a diferenciação entre vacúolos autofágicos, lisossomos e corpos lamelares (NIEMANN; BALTES; ELSÄSSER, 2001).

Glândulas salivares em diferentes estágios foram expostas a esse composto em uma concentração de 1 μM e o órgão foi mantido *ex vivo* durante 30 minutos em temperatura ambiente. Foram observadas diversas estruturas esféricas positivas para o corante MDC (verde), pequenas em relação aos fragmentos nucleares, em todo o citoplasma da célula (Figura 20). Esse resultado mostra-se coerente quando comparado com as imagens observadas em microscopia eletrônica de transmissão, em que se observa grande quantidade de granulações nas estruturas que possivelmente são vacúolos. Outra constatação é que não há a presença de material genético envolvido pelos vacúolos, o que seria outra evidência que a morte autofágica tem o papel de eliminar o material citoplasmático durante a metamorfose de *R. americana*. Quando foram submetidas glândulas salivares de larvas em 2º período ao composto MDC, não se observou nenhuma marcação para os vacúolos autofágicos (Figura 21).

Outra metodologia vem se destacando para a determinação da presença de vacúolos autofágicos em diferentes modelos. A proteína LC3 faz parte da família de proteínas que participa da formação do vacúolo autofágico. LC3 pode estar na célula de duas formas: LC3-I, que está presente na célula antes do início da autofagia, e LC-II que é uma associação de LC3-I e uma fosfatidiletanolamina. A proteína LC3-II

FIGURA 20 – Glândula salivar de pupa *R. americana* com vacúolos autofágicos marcados com Monodansilcadaverina (MDC). A: Núcleos (Vermelho). B: marcação MDC (Verde). C: sobreposição dos canais. As imagens foram obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

FIGURA 21 – Glândula salivar de larva *R. americana* coradas com Monodansilcadaverina, utilizada como controle negativo . Onde observa-se a sobreposição dos canais, sendo MDC (verde) e núcleos (vermelho). A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser.

participa ativamente do alongamento da dupla membrana que reveste o vacúolo autofágico. LC3 é a única proteína que permanece associada ao vacúolo até o final a formação do autolisossomo.

Outro aspecto importante é que o padrão de marcação para LC3-I observado é difuso, enquanto LC3-II forma aglomerados, isso se deve ao fato de LC3-II estar associado à dupla membrana dos vacúolos autofágicos.

Na Figura 22, glândulas salivares de pupas foram submetidas à imuno-histoquímica onde se utilizou o anticorpo anti-LC3, que possui afinidade com ambas as formas dessa proteína. Durante o processo de morte celular programada nesse órgão verificou-se a presença de ambas as formas de LC3, uma vez que na Figura 22 observam-se marcações pontuadas e marcações difusas em todo o citoplasma celular.

FIGURA 22 - Imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-LC3 em glândula salivar de pupa. A: Anticorpo anti-LC3 (vermelho), que possui marcação pontual em todo o citoplasma. B: Núcleos (verde). C: Sobreposição dos canais. A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser.

Em contrapartida, no grupo controle, em 2º período do desenvolvimento, nenhuma marcação foi encontrada (Figura 23).

FIGURA 23 – Imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-LC3 em glândula salivar de larva como controle negativo. Onde observa-se a sobreposição dos canais, sendo anti-LC3 (vermelho) e núcleos (verde). A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO CORPO GORDUROSO

4.2.1 MORFOLOGIA DO CORPO GORDUROSO

Outro órgão de suma importância para a biologia do inseto, o corpo gorduroso, também fez parte das análises deste trabalho. O corpo gorduroso é um órgão de grande magnitude na larva, e está intimamente ligado a diversos outros órgãos, como, por exemplo, o intestino, as gônadas e a própria glândula salivar.

A morfologia do corpo gorduroso, durante a fase larval, é de um órgão longilíneo, como longas “folhas de papel”, apresentando uma única camada celular. Nessa fase as células possuem forma poligonal, achatada e estão intimamente ligadas entre si (Figura 24).

Durante todo o desenvolvimento e a vida adulta de *R. americana* o corpo gorduroso passa por diversas transformações. Ao longo de toda a fase larval a o corpo gorduroso ocupa praticamente toda a extensão da larva. Durante a metamorfose, esse órgão inicia uma transformação na sua estrutura, que tem início nos primeiros dias desse processo. Em poucos dias o corpo gorduroso está dissociado e forma pequenos grupos de células ou até mesmo células individualizadas (Figura 24B). Na pupa, o citoesqueleto de actina dessas células se torna condensado e com sua organização alterada.

Contudo, esse panorama é totalmente modificado na fase adulta. Na mosca o corpo gorduroso forma pequenos arranjos com poucas células e os filamentos de actina apresentam aspecto pontuado e não contínuo.

Esses resultados mostram que durante o desenvolvimento de *R. americana* o corpo gorduroso passa por diversas modificações, dissociando-se na pupa e podendo até se rearranjar na fase adulta.

FIGURA 23 – Reconstrução tridimensional de células do corpo gorduroso de *Rhynchosciara americana* no 2º período, evidenciando a rede de actina (verde), os núcleos (vermelho). A imagem foi obtida através do software Imaris 7.1.

FIGURA 24 – Citoesqueleto de células do corpo gorduroso em diferentes períodos do desenvolvimento. A: Actina do corpo gorduroso de larva. B: Actina do corpo gorduroso de pupa. C: Actina do corpo gorduroso de mosca. Actina (Verde) e núcleos (vermelho). As imagens foram obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

4.2.2 ULTRAESTRUTURA DO CORPO GORDUROSO

Foi realizada também a análise da ultraestrutura do corpo gorduroso em duas fases distintas, durante a metamorfose quando o indivíduo está na fase de pupa e no indivíduo adulto. Para as fases precedentes não foi possível realizar a ultraestrutura, pois não se encontrou fixação compatível com o mesmo órgão de larvas.

Durante a metamorfose, período no qual o corpo gorduroso passa por severas modificações, forma-se diferentes tipos de vesículas, todas em grande quantidade no citoplasma celular (Figura 25A). Dentre os diferentes tipos de vesículas, encontram-se vesículas elétrons lúcidas em grande quantidade no corpo gorduroso da pupa (Figura 25A). Nota-se também a existência de vesículas elétrons densas com regiões elétrons lúcidas, possivelmente resultado do sequestro de partículas do citoplasma (Figura 25). Algumas vesículas são elétrons densas, contudo possuem grânulos elétrons lúcidos em seu interior, sugerindo que esses grânulos são resultado da degradação dos corpos elétrons lúcidos antes engolfados. Além disso, observam-se diversas gotas lipídicas, ao contrário da glândula salivar, em que predomina o RER no citoplasma, uma vez que esse órgão possui, entre as várias funções, função de armazenar gordura (Figura 25A).

Esses resultados indicam uma possível atividade autofágica no corpo gorduroso de pupa, todavia essa hipótese somente pode ser atestada com o auxílio de outras técnicas, que serão abordadas posteriormente.

FIGURA 25 – Ultraestrutura do corpo gorduroso de pupa. A: célula do corpo gorduro repleta de vesículas elétron densas com granulos elétron lúcidos (seta) e vesículas életron lúcidas (seta larga) e lipídeos (L). No detalhe vesícula engolfando outra vesícula. B: Detalhe do núcleo (N) e vesículas elétron densas com regiões elétron lúcidas em seu interior. As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão.

FIGURA 26 – Ultraestrutura do corpo gorduroso de mosca. A: Célula do corpo gorduroso de mosca com predominância de vesículas elétron densas com minúsculos fragmentos elétron lúcidas em seu interior (seta). N: Núcleo. B: Citoplasma repleto de mitocôndrias (M). As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão.

Na imago também existe abundância de vesículas no citoplasma, porém o panorama se modifica, uma vez que predominam vesículas elétron densas com grânulos elétron lúcidos em seu interior. Grande quantidade de mitocôndrias também se observa nesse período. Possivelmente os corpúsculos elétron lúcidos são provenientes da fragmentação das vesículas elétron lúcidas observadas em pupas, pois observamos a internalização destas em vesículas elétron densas. Essa alteração na variedade de vesículas sugere que tal predominância é fruto da degradação que ocorre desde a metamorfose. Assim sendo, pode-se classificá-las como um estágio tardio da autofagia.

4.2.3 FRAGMENTAÇÃO DA CROMATINA DO CORPO GORDUROSO

Analisou-se também a clivagem internucleossomal do DNA, evento que é parte do processo da morte celular programada, em corpo gorduroso de pupa. Para tal fim, utilizou-se a técnica de TUNEL.

Durante a metamorfose, em que o corpo gorduroso se dissocia na pupa, pode-se observar a fragmentação da cromatina em diversos pontos do núcleo, quando submetido ao ensaio de TUNEL (Figura 27). Com esse resultado podemos concluir que a apoptose tem participação no processo de morte celular programada do corpo gorduroso.

Em corpo gorduroso de larva, porém não foi encontrada marcação para TUNEL (Figura 28), portanto esse processo tem início na metamorfose de *R. americana*. Com a comparação dos núcleos de células do corpo gorduroso de pupa e de larvas em 2º período, podemos notar que na Figura 27 os núcleos estão fragmentados e condensados em relação aos núcleos da Figura 28.

FIGURA 27 – Corpo gorduroso de pupa *R. americana*, marcada com o teste de TUNEL. A: Marcação de TUNEL (vermelho). B: Núcleos (verde). C: sobreposição dos canais. As imagens foram obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

FIGURA 28 – Corpo gorduroso de larva de *Rhynchosciara americana* em 2º período, utilizadas como controle negativo para o teste de TUNEL. Onde se observa a sobreposição dos canais, sendo TUNEL (vermelho) e núcleos (verde). A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser

4.2.4 VACÚOLOS AUTOFÁGICOS NO CORPO GORDUROSO

Utilizou-se o composto Monodansilcadaverina (MDC) para a detecção de vacúolos autofágicos no corpo gorduroso de larva e pupa.

O corpo gorduroso de pupa, quando submetido ao ensaio com MDC, apresentou diversas marcações esféricas em todo o citoplasma celular (Figura 29). Isso mostra que existe a formação de vacúolos autofágicos no corpo gorduroso durante a metamorfose de *R. americana*. A ultraestrutura desse órgão corrobora esse resultado, indicando que tais vesículas correspondem a vacúolos autofágicos.

Em corpo gorduroso de larva submetido ao composto MDC, não se observou a formação de vacúolos autofágicos (Figura 30).

Para confirmar a existência de vacúolos autofágicos no corpo gorduroso, utilizou-se o anticorpo anti-LC3 em diferentes períodos do desenvolvimento nesse órgão.

Em corpo gorduroso de pupa observamos a presença dessa proteína em todo o citoplasma celular, de forma pontuada, porém sem a formação de aglomerados e em algumas regiões difusas (Figura 31). Esse resultado mostra que, como proposto anteriormente, a proteína LC3 está associada em sua forma fosforilada à dupla membrana do vacúolo autofágico, formando assim essa marcação pontuada.

No corpo gorduroso de mosca, observa-se marcação mais intensa e numerosa. Existe também a formação de aglomerados em algumas regiões, devido à maior quantidade de vacúolos autofágicos (Figura 32).

Esses dados, juntamente com os obtidos com o ensaio de MDC, sugerem que as vesículas que estão abundantemente presentes no corpo gorduroso de mosca, quando analisada sua ultraestrutura, correspondem a vacúolos autofágicos.

Quando se submeteu o corpo gorduroso de larva à mesma imunomarcação, observou-se que nesse dado período não ocorre a formação de vacúolos associados à morte celular autofágica (Figura 33).

Figura 29 – Corpo gorduroso de pupa de *R. americana* vacúolos autofágicos marcados com Monodansilcadaverina (MDC). A: Núcleos (Vermelho). B: marcação MDC (Verde). C: sobreposição dos canais. As imagens foram obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

Figura 30 – Corpo gorduroso de larva de *Rhynchosciara americana* marcada com Monodansilcadaverina utilizada como controle negativo. Onde se observa a sobreposição de canais, sendo MDC (verde) e núcleos (vermelho). A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser.

FIGURA 31 – Imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-LC3 em corpo gorduroso de pupa. A: Núcleos (vermelho). B: Anticorpo anti-LC3 (verde) mostrou marcação pontual em todo o citoplasma. C: Sobreposição dos canais. A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser.

FIGURA 32 – Imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-LC3 em corpo gorduroso de mosca. A: Núcleos (vermelho). B: proteína LC3 (verde) possui marcação pontual e forma diversos aglomerados em todo o citoplasma. C: Sobreposição dos canais. A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser

FIGURA 33 – Imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-LC3 em corpo gorduroso de larva como controle negativo. Onde se observa sobreposição de canais, sendo anti-LC3 (verde) e núcleos (vermelho). A imagem foi obtida ao microscópio confocal de varredura a laser.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES LIGADOS À MCP

Com o intuito de melhor conhecer os mecanismos de morte que as células desses dois órgãos utilizam para serem eliminadas ou reorganizadas, iniciou-se neste trabalho a caracterização molecular de genes envolvidos no processo de morte celular programada. Diversos fatores estão envolvidos nessa via de degradação, incluindo genes proapoptóticos e autofágicos, genes antiapoptóticos e outros genes que regulam negativamente a autofagia.

Para realizar este estudo, foi utilizado como ponto de partida a busca numa biblioteca de cDNA construída em nosso laboratório. Essa biblioteca foi construída a partir de glândulas salivares de *Rhynchosciara americana*, no início do quarto estágio do desenvolvimento larval. Pretendia-se detectar genes envolvidos nos fenômenos de politenização e amplificação gênica dessa espécie, uma vez que nesse período as larvas iniciam a construção do casulo comunal, momento em que ocorrem os grandes pufes (SIVIERO et al., 2006). Após a análise dos EST, diversos genes foram encontrados, e entre eles Dad1(Defender Against Cell Death), Bax inibitor-1, IAP1, estão entre os genes antiapoptóticos e também um gene envolvido com a autofagia, Atg1 (Figura 34).

Neste trabalho foram caracterizados os genes antiapoptóticos Dad1 e Bax inibitor-1 e o gene autofágico Atg1. A escolha dos genes possibilitou ainda mais compreender a morte celular programada nesse modelo e relacionar a participação da autofagia e apoptose nesse processo.

FIGURA 34 – Frequência de alguns transcritos obtidos na biblioteca de cDNA de *Rhynchosciara americana*, em destaque Dad1.
 Fonte: Modificado de Siviero et al., 2006.

4.3.1 RADAD1

O gene Dad1 foi primeiramente relacionado à apoptose, sendo descrito como uma gene antiapoptótico quando células eram levadas à morte apoptótica quando não possuíam o gene em questão. Mais tarde, Kelleher e Gilmore (1997) notaram que a proteína Dad1 de mamíferos era equimolar a oligossacariltransferase de leveduras, sugerindo que Dad1 seria uma subunidade dessa proteína e estaria localizada na membrana do retículo endoplasmático rugoso na porção citoplasmática.

Através do sequenciamento realizado a partir do banco de cDNA, obteve-se uma única sequência de 499 pb, que está representado na Figura 35 com seu mapa de restrição.

Por meio das sequências de aminoácidos dos homólogos de Dad1

estabelecidos na literatura, foi possível montar uma árvore filogenética comparando com a sequência de aminoácidos traduzida de RaDad1 (Figura 36). O gene RaDad1 aparece agrupado com sequências da mesma proteína de outros insetos.

FIGURA 35 – Mapa de restrição do cDNA RaDad1 de *Rhynchosciara americana*.

FIGURA 36 – Análise filogenética do cDNA do gene RaDad-1 de *Rhynchosciara* com o mesmo gene de outras espécies. A análise foi baseada nas sequências de aminoácidos através do software BioEdit e do método Neighbour joining.

FIGURA 37 – Alinhamento das seqüências de aminoácido da proteína RaDad-1 de *Rhynchosciara americana*, em comparação com outras espécies filogeneticamente próximas. Em preto mostram aminoácidos idênticos e em cinza substituições conservativas.

A Figura 37 apresenta o alinhamento de seqüências de aminoácidos de outras espécies em relação a *R. americana*, que mostra alta conservação dessa proteína ao longo dos filis. A proteína que se mostra mais próxima de *Rhynchosciara americana* é a de *Anopheles gambiae*, tendo 80% de identidade e 91% de similaridade, a de *Drosophila melanogaster* compartilha 77% de identidade e 90% de similaridade.

O clone de 499 pb foi utilizado com sonda para Southern blotting de DNA genômico extraído de moscas de *R. americana* clivado com diversas enzimas de restrição, em que se observa marcação fraca, contudo este resultado pode ser esperado já que o gene homólogo em *D. Melanogaster* tem cópia única no genoma. Acredita-se que em *R. americana* esse gene possua poucas cópias (Figura 38).

A mesma sonda foi utilizada para realizar uma varredura em um banco genômico de *Rhynchosciara americana*, que foi construído em bacteriófago Lambda Dash II. O fago que possuía o gene correspondente a Dad1 (Figura 39).

FIGURA 38 – Southern Blot genômico clivado com diversas enzimas de restrição, utilizando como sonda o cDNA de RaDad1. 1- *Bam*HI; 2- *Xba*I; 3- *Hind*III; 4- *Eco*RI; PM: 1 kb ladder plus (Invitrogen).

FIGURA 39 – Southern Blot do fago RaDad1, utilizado como sonda o cDNA de RaDad-1. 1- *Xba*I; 2- *Bam*HI; 3- *Xho*I; 4- *Hind*III; 5- *Eco*RI; PM: 1 kb ladder plus (Invitrogen).

FIGURA 40 – Esquema da amplificação gênica de DNA total de *R. americana* resultante de duas isoformas: Isoformas 1 e Isoforma 2 de RaDad-1

A partir da sequência de cDNA foi possível desenhar primers para amplificação de regiões genômicas desse gene em *R. americana*. A amplificação resultou em duas isoformas do gene RaDad1, sendo a isoforma 1 representada por apenas um exon, na região flanqueada pelos primers, e a isoforma 2 em que se observou a presença de um intron de 65bp entre os exons 1 e 2. A sequência contida nos exons da isoforma 2 corresponde exatamente à sequência do exon único da isoforma 1 (Figura 37). Nessa região intrônica presente na isoforma 2 há presença de sítios canônicos de “splicing” 5’ GT e AG 3’, respectivamente, sendo outra evidência da presença desse intron.

Para determinar o perfil de expressão relativa de RaDad1 em glândulas salivares e no CG, foi realizado RT-PCR quantitativo em tempo real em diferentes períodos do desenvolvimento. Essa técnica possibilita determinar o quão expresso é determinado gene em diferentes situações, como, por exemplo, diferentes órgãos. A quantificação foi normalizada pela massa de RNA, pois nenhum gene com expressão supostamente constitutiva se mostrou eficiente como controle interno, sendo que a massa de RNA total tem sido utilizada com sucesso por diversos autores (BUSTIN, 2000, 2002; SINDELKA; FERJENTSIK; JONÁK, 2006). O 2º período do desenvolvimento foi utilizado como referência para calcular a expressão dos demais períodos em todas as quantificações apresentadas neste trabalho.

O resultado exibido no gráfico da Figura 41 mostra que não há grande variação na expressão de RaDad1 em diferentes períodos do desenvolvimento em glândula salivar. Durante os estágios de 2º período, início de construção do casulo e amplificação do pufe da região 2 do cromossomo B, a expressão foi quase constante, levando em conta a sobreposição das barras de erro. Nos estágios seguintes, de

amplificação do pufe C3 e pupa, observa-se uma ligeira diminuição na expressão de RaDad1 em relação ao 2º P, sendo coerente, uma vez que nesse estágio a glândula inicia e completa, respectivamente, o processo de morte celular programada.

FIGURA 41 – Gráfico da expressão relativa de RaDad-1 por qRT-PCR em glândula salivar de *R. americana* durante diferentes fases do desenvolvimento. 2P= 2º período do estágio larval, IR= início da construção do casulo comunal, B2= durante a abertura do pufe da região 2 do cromossomo B, C3= durante a abertura do pufe da região 3 do cromossomo C, PP= pré-pupa.

O mesmo não ocorre com a expressão de RaDad1 no CG em diferentes fases do desenvolvimento. As mensagens no início do desenvolvimento entre o 2º P e o pufe B2 se mostraram constantes, contudo no pufe C3 ocorre uma ligeira queda na expressão de RaDad1 em corpo gorduroso. Essas mensagens voltam ao padrão inicial em pré-pupas e em pupas ocorre um pico da expressão de RaDad1 em CG (Figura 42). Sendo RaDad1 um gene antiapoptótico, seria incoerente sua alta expressão num período em que foi observada intensa atividade de fatores ligados à morte celular programada nesse órgão. Porém, o corpo gorduroso exerce importante papel na manutenção das proteínas e outros fatores associados à hemolinfa, e seu papel na glicosilação pode acarretar a grande expressão nesse período.

FIGURA 42 – Gráfico da expressão relativa de RaDad1 por qRT-PCR em corpo gorduroso de *R. americana* durante diferentes fases do desenvolvimento. 2P= 2º período do estágio larval, IR= início da construção do casulo comunal, B2= durante a abertura do pufe da região 2 do cromossomo B, C3= durante a abertura do pufe da região 3 do cromossomo C, PP= pré-pupa.

FIGURA 43 – Mapa da região codificante de RaDad1, evidenciando a região onde foi construído o dsRNA.

Para melhor compreender o mecanismo de ação desse gene durante o ciclo de vida desse inseto, utilizou-se a técnica de silenciamento gênico ou RNA de interferência (RNAi).

Um RNA dupla fita (dsRNA) foi sintetizado a partir da região codificante de RaDad-1, gerando um dsRNA de 331 bp (Figura 43). Para isso, os seguintes primers foram utilizados: Direito (R)-5' TAATACGACTCACTATAGGGAGATTGTAGCTTCCTGGCCTAG 3' e Esquerdo (L)-5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTACCAAATCCATTCAAATG 3'.

A técnica foi aplicada utilizando microinjeções em larvas em 2º período e o mesmo grupo foi dividido em dois. Um dos grupos foi injetado com o dsRNA e o outro usado como controle, em que não se injetou nada, uma vez que testes anteriores demonstraram que injeções de solução salina em larvas controle não alteravam o resultado.

O que se observou é que o silenciamento de RaDad1 em *R. americana* acelerou o desenvolvimento em relação ao grupo controle. Após 20 dias de experimento observa-se que, enquanto as larvas do grupo controle permanecem no 2º período, o grupo injetado já havia construído o casulo comunal (Figura 44). Ambos os grupos chegaram até o final do ciclo de desenvolvimento, gerando moscas adultas com aparência normal.

FIGURA 44 – Experimento de silenciamento gênico por RNAi do gene RaDad1 após 20 dias de experimento. A: grupo controle, B: grupo injetado, casulo (seta).

4.3.2 RABAX INHIBITOR-1

Realizou-se a análise da expressão relativa do gene antiapoptótico Bax inibitor-1 (BI-1) em glândula e corpo gorduroso de *Rhynchosciara americana*. As análises foram realizadas nos diferentes períodos. A expressão relativa de BI-1 em glândula salivar, em relação ao 2º período, mostrou-se constante nos primeiros períodos observados, IR e B2. Durante a abertura do pufe C3 a expressão diminui e esse decréscimo continua no período posterior, PP. Na pupa não ocorre expressão desse gene.

FIGURA 45 – Gráfico da expressão relativa de RaBax inibitor-1 por qRT-PCR em glândula salivar durante diferentes fases do desenvolvimento. 2P= 2º período do estágio larval, IR= início da construção do casulo comunal, B2= durante a abertura do pufe da região 2 do cromossomo B, C3= durante a abertura do pufe da região 3 do cromossomo C, PP= pré-pupa.

No corpo gorduroso a expressão relativa de BI-1 diminui no IR, B2 e C3 em relação ao 2º período. No período de pupa, entretanto, sua expressão é quase quatro vezes maior do que no 2P.

FIGURA 46 – Gráfico da expressão relativa de RaBax inhibitor-1 por qRT-PCR em corpo gorduroso durante diferentes fases do desenvolvimento. 2P= 2º período do estágio larval, IR= início da construção do casulo comunal, B2= durante a abertura do pufe da região 2 do cromossomo B, C3= durante a abertura do pufe da região 3 do cromossomo C, PP= pré-pupa.

4.3.3 RAATG1

O gene autofágico Atg1 é essencial para a formação do autofagossomo, e suas mensagens foram analisadas na glândula salivar e no corpo gorduroso também em diferentes períodos. A expressão de Atg1 em glândula salivar foi muito maior nos primeiros períodos analisados do que durante a histólise. O maior pico se observa no início da construção do casulo comunal e no segundo período essa expressão também é alta. Contudo, nos períodos seguintes, o nível de mensagens diminui consideravelmente, sobretudo na fase de pupa, a expressão é muito menor do que no 2P.

FIGURA 47 – Gráfico da expressão relativa de RaAtg1 por qRT-PCR em glândula salivar durante diferentes fases do desenvolvimento. 2P= 2º período do estágio larval, IR= início da construção do casulo comunal, B2= durante a abertura do pufe da região 2 do cromossomo B, B2 – 24h= 24h após a abertura do pufe da região 2 do cromossomo B, C3= durante a abertura do pufe da região 3 do cromossomo C, PP= pré-pupa.

No corpo gorduroso o panorama é inverso. Nos primeiros períodos analisados a expressão em relação ao segundo período é basal, como em B2, e diminui em C3. No entanto, na pré-pupa a expressão é quase duas vezes e meia maior que no 2P. E na pupa a expressão é ainda 16 vezes maior do que no segundo período.

FIGURA 48 – Gráfico da expressão relativa de RaAtg1 por qRT-PCR em corpo gorduroso de *R. americana* durante diferentes fases do desenvolvimento. 2P= 2º período do estágio larval, IR= início da construção do casulo comunal, B2= durante a abertura do pufe da região 2 do cromossomo B, C3= durante a abertura do pufe da região 3 do cromossomo C, PP= pré-pupa.

4.3.4 HORMÔNIO 20-HIDROXI ECDISONA

FIGURA 49 – Titulação do hormônio Ecdisona (em pg/μl) ao longo do desenvolvimento de *R. americana*. As imagens representam, respectivamente, os cromossomos politênicos utilizados como marcadores citológicos de cada período do desenvolvimento. Estágios do desenvolvimento: 2º Período (2º P), Início da construção do casulo (IR), um dia após início da construção do casulo (IR+1d), abertura do pufe da região 2 do cromossomo B (B2), começo da abertura do pufe da região 3 do cromossomo C (C3 inicial), abertura do pufe da região 3 do cromossomo C (C3), um dia após a abertura do pufe da região 3 do cromossomo C (C3+1d), 1ª muda, pupa.

O hormônio 20-hidroxi ecdisona (ecdisona) é um ecdisteroide com papel fundamental da biologia dos insetos, regulando a muda (ecdise) desses indivíduos. Produzido pela glândula anelar, o ecdisona participa de eventos importantes durante a metamorfose, incluindo a histólise da glândula salivar e do corpo gorduroso.

Em *Drosophila melanogaster* sabe-se que o ecdisona possui picos de atividade durante o desenvolvimento, e um desses picos coincide com o disparo da histólise da glândula salivar (LEE, 2001; BAEHRECKE, 2003).

Foi analisada, em *R. americana*, a titulação do hormônio ecdisona, com o intuito de avaliar se, como em *Drosophila*, existe uma possível participação do hormônio na morte celular programada. Obteve-se os dados observados na Figura 1, em que o primeiro pico (discreto) a ser considerado ocorre no início da construção do casulo comunal (IR+1d), período que precede a abertura do pufe da região 2 do cromossomo B (B2). Após esse estágio, ocorre constante aumento no nível desse hormônio, desde a abertura do pufe da região 3 do cromossomo C até a pupa. O maior pico de dosagem de ecdisona observou-se em pupa, período em que ocorrem diversas alterações morfológicas no indivíduo.

5 DISCUSSÃO

A morte celular programada tem sido extensivamente estudada e relacionada com a morfogênese em diferentes modelos biológicos (REGINATO e CRUZ-LANDIM, 2002; MARTIN et al., 2007; MCPHEE e BAEHRECKE, 2009). A eliminação de tecidos, órgãos ou parte deles é peça fundamental no desenvolvimento embrionário. Em insetos a morte celular programada do tipo II, autofágica, tem sido constantemente associada a esse processo, atuando na degradação dos componentes citoplasmáticos, e possivelmente tornando-os acessíveis a outras células (BAEHRECKE, 2003; DENTON, 2009).

A autofagia é um processo fundamental para a manutenção da homeostase celular, reciclando nutrientes em momentos de privação (LEVINE e KLIONSKY, 2004). Durante esse processo ocorre o isolamento de componentes citoplasmáticos, como proteínas e organelas, que são digeridos por enzimas e devolvidos ao citoplasma para a construção de novos componentes (XIE e KLIONSKY, 2007). Tais componentes, em condição de estresse, são devidamente selecionados pela célula para suprir a demanda prioritária para a sobrevivência.

Nos últimos anos esse papel duplo da autofagia, na sobrevivência e na morte celular, tem sido alvo de muitas discussões (DEBNATH; BAEHRECKE; KROEMER e JÄÄTELLÄ, 2005; KROEMER e LEVINE, 2008; RYOO e BAEHRECKE, 2010). Alguns trabalhos apontam a autofagia como processo essencial para que a morte celular programada ocorra corretamente, sendo dispensável a via apoptótica (BERRY e BAEHRECKE, 2007, 2008). Já outros indicam que é possível que haja colaboração das mortes do tipo I e II na eliminação de células (HOU et al., 2008; HOU et al., 2009; ROST-ROSZKOWSKA et al., 2010). Contudo, ainda não está clara a participação da autofagia no processo de morte celular programada, nem mesmo quais mecanismos levam a célula a distinguir as vias de sobrevivência e de morte celulares (RYOO e BAEHRECKE, 2010).

A glândula salivar e o corpo gorduroso de larvas de insetos são exemplos notáveis de órgão que sofre morte programada durante a metamorfose. A glândula salivar de *Rhynchosciara americana* está presente na larva e é um órgão de grandes proporções. A morfologia de suas células se modifica, dependendo da região analisada. Muitas diferenças são notadas quando as observamos em microscopia de luz, tanto no formato das células quanto no arranjo que adquirem, dependendo da região.

A ultraestrutura dessas três regiões apresentou algumas diferenças: as células da região S1 apresentam maior quantidade de microvilosidades que as demais e abundantes dobramentos na membrana basal. Essas diferenças entre as regiões podem sugerir diferentes funções dentro desse órgão. Em outro sciarídeo, *Trichosia pubescens*, as regiões da glândula salivar também são morfologicamente distintas e durante o desenvolvimento as alterações morfológicas que ocorrem nas regiões da glândula acompanham os padrões de amplificação gênica dos cromossomos politênicos (RIBEIRO, 1989).

Além de morfologicamente distintas, as regiões da glândula salivar apresentam diferentes níveis de expressão gênica e de amplificação dos principais pufes de *Rhynchosciara americana* (OKRETIC; PENONI; LARA, 1977, SANTELLI et al., 2004), podendo significar diferentes funções dentro dessas regiões. Durante a construção do casulo comunal foi possível observar grânulos de secreção na base das microvilosidades, e grânulos de secreção sendo exportados para o lúmen. As células de toda a glândula, independente da região, tanto no 2º período do desenvolvimento quanto no início da construção do casulo comunal, apresentam-se repletas de retículo endoplasmático rugoso. Fica claro, como já observado em outros trabalhos, que a glândula salivar tem papel fundamental na produção da secreção que irá construir o casulo comunal (WINTER et al., 1977a, b; 1980).

Após a construção do casulo, cessam-se as atividades de amplificação gênica e a larva posiciona-se ereta e individualizada em celas no casulo comunal. Durante a metamorfose, antes de adquirir forma de pupa, na pré-pupa a glândula salivar já começa a apresentar os primeiros sinais da degradação. Tanto nas imagens de microscopia de luz como nas micrografias eletrônicas, observa-se que a morfologia da glândula de pré-pupa ou nos primeiros dias após a formação do pupário já apresentam sinais de degradação. Em *R. americana* a histólise e a metamorfose podem ser consideradas processos longos, quando comparados com outros dípteros, como *Drosophila*, que completa a histólise da glândula salivar em 24 horas (LEE e BAEHRECKE, 2001).

A ultraestrutura da glândula salivar de pré-pupa revela que nessa fase inicia-se a formação de focos de degradação no citoplasma celular. A glândula salivar, logo após a formação do pupário, tem seu volume diminuído em todas as regiões e as células se desprendem da cutícula que as envolve. E seis dias após a formação do pupário a glândula salivar está completamente colapsada, com seu tamanho

diminuído e suas células apresentam cromatina fragmentada e condensada. Estas características puderam ser confirmadas na microscopia em tempo real (Time Lapse), em que foram observados o citoplasma com deformidades e os núcleos condensados.

As micrografias eletrônicas mostraram que nessa fase as células da glândula salivar apresentam formação de vacúolos autofágicos em todo o citoplasma, que isolam componentes citoplasmáticos como organelas (e.g. retículo endoplasmático rugoso). A análise da morfologia da glândula salivar nos deu os primeiros indícios de que o processo de morte celular programada nesse órgão apresenta características das mortes do tipo I e II.

Para confirmar a origem dos mecanismos que regem esse processo, utilizou-se o ensaio de TUNEL, que foi positivo para a glândula salivar de pupa. Outros trabalhos também demonstraram que a via apoptótica de fragmentação e condensação do DNA é utilizada para eliminar células durante o desenvolvimento de insetos (HOU, 2009; SIMOM e ALMEIDA, 2004). Portanto, mecanismos apoptóticos são requeridos para eliminar a glândula salivar de *Rhynchosciara americana*.

Foi determinado também que a morte celular nesse órgão conta com a participação da autofagia para sua eliminação. Duas abordagens específicas, a imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti LC3/Atg8 e o corante Monodansilcadaverina (MDC), que são conhecidos marcadores para vacúolos autofágicos, confirmaram a presença dessas estruturas durante a histólise da glândula salivar. A numerosa presença de marcações resultantes das duas técnicas se mostra coerente com a ultraestrutura da glândula salivar de pupa, que apresentava muitos focos de formação de vacúolos autofágicos.

Jurand e Pavan (1975) analisaram a ultraestrutura da glândula salivar de *Rhynchosciara hollaenderi*, antes da abertura dos pufes no final do quarto estágio, durante a abertura dos pufes B2 e C3 e após o fechamento dos pufes. O trabalho propõe que os primeiros sinais de aparecimento de vacúolos autofágicos se dão antes da formação dos pufes, assim como degradação das mitocôndrias, não tendo relação com o processo de amplificação. Outra constatação daquele trabalho foi a ação da enzima fosfatase ácida associada com o complexo de Golgi, com os vacúolos autofágicos e também no citoplasma. A fosfatase ácida já havia sido relacionada com a morte da glândula salivar de outros Sciarídeos, como *Chironomus thummi* (SCHIN e LAUFER, 1973). Ao contrário do que propuseram Jurand e Pavan,

em *R. americana* o início da formação de vacúolos autofágicos se dá muito após a atividade dos grandes pufes, na fase de pré-pupa.

Shen e Codogno (2011) propuseram que a nomenclatura utilizada, erroneamente, em diversos trabalhos para determinar o tipo de morte celular programada deveria ser unificada. Segundo esses autores, a MCP somente é considerada do tipo II, autofágica, se independe dos mecanismos apoptóticos, como a fragmentação internucleossomal e a ação de caspases (SHEN e CODOGNO, 2011). Portanto, se tais preceitos forem adotados, o processo que rege a morte celular na glândula salivar, segundo a leitura dos dados citados anteriormente, não se enquadra em um único tipo de MCP, e sim compartilha vias das MCP do tipo I e II.

Em *Bombix mori* e *Drosophila* nota-se que diversos órgãos, não só a glândula salivar, sofrem morte celular programada como o corpo gorduroso (RUSTEN et al., 2004) e o intestino médio (LEE; COOKSEY; BAEHRECKE, 2002), que interessantemente são substituídos pelo órgão que terá a função no adulto (TETTAMANTTI et al., 2007).

No presente trabalho realizou-se a análise dos mecanismos de morte do corpo gorduroso durante as fases de pupa e adulta de *R. americana*. O corpo gorduroso de *R. americana* é um órgão longo e achatado, que se situa disperso na hemolinfa. Sua íntima ligação com a hemolinfa se dá justamente por esse órgão ser responsável por enviar-lhe metabólitos.

Durante a metamorfose o corpo gorduroso passa por intensa transformação. Sua morfologia que antes se assemelhava a “folhas de papel” passa a ser granulada dispersa na hemolinfa. Muitas vezes formam pequenos grupos de células ou até mesmo células individualizadas. Esse fenômeno acontece um ou dois dias após a formação do pupário, quando foi analisada sua ultraestrutura. Observou-se intensa formação de vesículas em todo o citoplasma celular. As vesículas apresentaram diferentes morfologias, possivelmente representando diferentes estágios de maturação. Três tipos predominantes de vesículas foram observados: (1) vesículas elétron lúcidas, (2) vesículas elétron densas, que em algumas situações apresentavam regiões elétron lúcidas, e (3) vesículas elétron densas com grânulos elétron lúcidos.

Na fase posterior, no indivíduo adulto, as micrografias eletrônicas do corpo gorduroso revelam que o terceiro tipo de vesícula, vesículas elétron densas com

grânulos elétron lúcidos, é predominante. Tal característica sugere que durante a fase de pupa ocorre formação de vesículas que engolfam conteúdos citoplasmáticos p(vesículas do tipo 2) e na fase adulta os grânulos observados nas vesículas do tipo 3 são resultado da degradação das regiões elétron lúcidas das vesículas do tipo 2.

Para confirmar a natureza desse processo de morte, também foram realizados o ensaio com o corante MDC e a imunofluorescência com o anticorpo anti LC3/Atg8. Observou-se que a formação de vacúolos autofágicos se dá na fase de pupa no corpo gorduroso quando observamos as diversas marcações esféricas para o agente lisossomotrópico MDC.

A proteína LC3 também é encontrada na fase de pupa no corpo gorduroso. Ela apresenta marcações pontuadas, típica característica de sua associação com a fosfatidiletanolamina e a membrana do vacúolo autofágico. Não obstante, durante a fase adulta, quando o corpo gorduroso persiste e sofre algumas alterações morfológicas, observa-se que a proteína LC3 encontra-se em aglomerados maiores que na fase anterior. Esses resultados mostram que a autofagia age no processo de morte celular programada do corpo gorduroso, que se inicia na pupa e perdura até a fase adulta.

A fragmentação da cromatina também foi analisada no corpo gorduroso, em que se evidenciou através do ensaio de TUNEL quebras internucleossomais do DNA durante a fase de pupa. Esse dado mostra que, assim como na glândula salivar, mecanismos apoptóticos atuam na morte celular programada do corpo gorduroso.

O corpo gorduroso é um órgão que desempenha diferentes funções na larva de insetos, entre elas armazenar nutrientes e administrar sua disponibilidade para o organismo (ARRESE e SOULAGES, 2010). Outros trabalhos também evidenciaram a dissociação do corpo gorduroso durante a metamorfose. Em *Drosophila*, logo após a formação do pupário, o tecido inicia sua dissociação e permanece até os primeiros dias do adulto e logo após é removido através da morte celular programada (NELLIOT et al., 2006; AGUILA et al., 2007). Essa dissociação quando inibida no corpo gorduroso no período de pupação leva à morte precoce do indivíduo adulto, sugerindo que esse é um processo essencial nessa fase (CHERBAS et al., 2003). Os mecanismos que regem o processo de dissociação do corpo gorduroso são desconhecidos, contudo o trabalho de Nelliott et al. (2006) demonstrou que essa dissociação independe de fatores ligados aos hemócitos, como se acreditava.

É possível que o corpo gorduroso desempenhe a função de fornecer nutrientes nos primeiros dias da imago, devido à incapacidade de busca pelo alimento nas primeiras horas após a emergência. O fato é que o corpo gorduroso é essencial para o correto desenvolvimento da pupa e a formação do adulto (AGUILA et al., 2007).

Diversos são os genes que regulam a morte celular durante o desenvolvimento, principalmente quando se leva em conta que fatores apoptóticos e autofágicos estão presentes nesse processo. Neste trabalho foram analisados alguns genes com ação antiapoptótica e genes relacionadas à autofagia.

No trabalho de Siviero et al. (2006) diversos genes foram encontrados, sendo expressos durante a construção do casulo comunal, durante a abertura dos grandes pufes, momento que antecede a metamorfose. Dentre esses genes foram encontrados alguns com ação antiapoptótica como o Dad1, Bax inibitor-1 e IAP-1 e gene autofágico Atg1.

Foram apresentados neste trabalho diversos aspectos relacionados ao desenvolvimento que envolviam o gene Dad-1 de *R. americana* (RaDad1). Esse gene mostrou-se bastante conservado, como demonstrado em outros organismos, dentre os quais mamíferos (NAKASHIMA, 1993), organismos unicelulares (MOHARIKAR; D'SOUZA; RAO, 2007) e mesmo em outras espécies de insetos, como *Mayetiola destructor*, em que Dad1 mostrou prevenir a morte celular programada, prevenindo a ação de fatores de resistência de ação predatória em trigo (MITTAPALLI e SHUKLE, 2008). Em *R. americana* foram encontradas duas formas distintas desse gene, que foram denominadas isoformas 1 e 2 respectivamente. A isoforma 1 possui um único exon, já a isoforma 2 possui dois exons e um intron de 65 pares de base.

Foi realizado experimento de silenciamento gênico em larvas de *Rhynchosciara americana* em 2º período do desenvolvimento, em que se silenciou o gene RaDad1 utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi). O grupo injetado com o RNAi desenvolveu-se mais rapidamente, levando o grupo de larvas a construir precocemente o casulo comunal. Esse resultado mostra que esse gene pode ser essencial para a prevenção da entrada da larva na metamorfose.

Na análise da expressão gênica desse gene em glândula salivar e corpo gorduroso, através de RT-PCR quantitativo, observa-se que RaDad1 é diferentemente expresso nesse dois órgãos ao longo do desenvolvimento. Todas as

análises de expressão foram feitas com a expressão relativa dos genes em relação na 2º período larval. Em glândula salivar, RaDad1 mostra expressão aproximadamente constante com ligeira diminuição durante a abertura do pufe C3 e na pupa. Já em corpo gorduroso, RaDad-1 tem um pico de expressão durante a fase de pupa, enquanto nas demais fases a expressão mostra-se constante. Os dados apresentados sugerem que possivelmente RaDad1, tendo função no controle pós-traducional, um processo fundamental para a célula, pode ser necessário durante a fase em que ocorre a histólise. Outro trabalho, realizado com *S. cerevisiae* indicou que talvez a mutação do gene OST2 (homólogo de Dad1 em leveduras) leva à perda da glicosilação n-ligada, e a morte apoptótica seria causada por danos secundários a essa perda (SUGIRA e TAKAGI, 2006). Além disso, como demonstraram outros trabalhos, nem todos os marcadores apoptóticos são encontrados durante a morte celular programada (BERRY e BAEHRECKE, 2007, 2008).

Uma hipótese que se formulou foi que, durante a fase de pupa, o pico de expressão de RaDad1 em corpo gorduroso pode representar um mecanismo de escape da morte celular, uma vez que esse tecido irá terminar esse processo somente na fase adulta.

Observa-se o mesmo padrão de expressão no gene antiapoptótico Bax inibitor-1 em corpo gorduroso, em que entre as fases de 2ºP e B2 observa-se diminuição da expressão e em pupa RaBI-1 está três vezes mais expresso que no 2ºP. Quando analisada a expressão de RaBI-1 em glândula salivar, tem-se uma diminuição constante da expressão desse gene em relação ao 2º. Período. Interessantemente, em pupa não houve expressão do gene antiapoptótico RaBI-1, o que reforça a hipótese de que a morte celular apoptótica participa do processo de eliminação da glândula salivar e que RaDad-1 pode ter uma função além da prevenção da MCP.

O gene autofágico RaAtg1 também teve sua expressão analisada nos dois órgão em diferentes períodos. Em glândula salivar, RaAtg1 surpreendentemente apresentou maior expressão no início da construção do casulo em relação ao 2P. Nos períodos de pré-pupa e pupa quando se esperaria uma maior expressão, os níveis de transcritos diminuíram consideravelmente em relação aos períodos referências à fase larval. Durante a construção do casulo comunal, as larvas deixam de se alimentar, e talvez esses altos níveis de expressão ocorram no processo de

autofagia para a sobrevivência, e não morte celular, entretanto nas micrografias não foram observados autofagossomos.

Em corpo gorduroso o gene *RaAtg1* está 16 vezes mais expresso no período de pupa do que na larva. Esse aumento mostra-se coerente quando correlacionamos com os dados da ultraestrutura desse tecido, pois no período de pupa observa-se intensa formação de autofagossomos, sendo *Atg1* um gene essencial para o recrutamento de fatores para a formação de tal estrutura.

Dentro desse contexto, na eliminação de tecidos durante a metamorfose, os picos no título do hormônio ecdisona mostraram ligação com o início da metamorfose e, conseqüentemente, disparo da morte celular programada em *Drosophila*.

No gênero *Rhynchosciara* foi descrito previamente que o hormônio ecdisona é responsável por alterações durante o desenvolvimento (STOCKER et al., 1984). Na espécie *R. americana*, o padrão de amplificação gênica de algumas regiões específicas, como os pufes de DNA B2 e C3, foi extensivamente caracterizado (SANTELLI et al., 1991; FRYDMAN et al., 1993; PENALVA et al., 1997; SANTELLI et al., 2004). Alvarenga et al. (1991) induziram em *R. americana*, através de injeções de ecdisona, a amplificação precoce do pufe B2, contudo os indivíduos não resistiram após o oitavo dia de injeção. Em *Trichosia pubescens* o hormônio ecdisona também mostrou ser regulador do padrão de amplificação dos pufes (AMABIS e AMABIS, 1984 a, b).

Em *R. americana* a titulação do hormônio ecdisona mostrou que o maior pico ocorre durante a fase de pupa, em que ocorre a histólise de diversos tecidos. Esses resultados mostram que, como em *Drosophila* (LEE e BAEHRECKE, 2001), em *R. americana* o hormônio ecdisona apresenta maior título durante as fases finais do desenvolvimento, e seu maior pico se dá durante a fase pupal. Provavelmente nas fases que antecedem o início da morte celular programada em alguns órgãos. Além disso, a dissociação do corpo gorduroso de pupa também já foi relacionado com esse pico do hormônio ecdisona, o que coincide com os dois eventos em *R. americana*.

Esse trabalho apresentou uma perspectiva antes não explorada na espécie *Rhynchosciara americana*. O estudo da morte celular programada nesse modelo trouxe detalhamentos dos aspectos morfológicos, somente possíveis pelo longo ciclo de vida desta espécie. Os aspectos ligados à autofagia e apoptose, fortalecem a

hipótese de que ambas as vias podem cooperar com a histólise da glândula salivar e do corpo gorduroso. Além disso, os genes antiapoptóticos RaDad1 e Bax inhibitor-1 e o gene autofágico Atg1 parecem, em algumas situações, estarem envolvidos na eliminação e dissociação desses órgãos.

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados apresentados permitem concluir que:

- A morte celular programada é requerida para a eliminação da glândula salivar e do corpo gorduroso de *R. americana*;
- Fatores relacionados com a morte apoptótica, como a fragmentação do DNA e a condensação cromatina e com a autofagia, como a formação de autofagossomos, se fazem presentes na histólise de ambos os órgãos;
- A glândula salivar inicia a formação de vacúolos autofágicos já na pré-pupa, contudo na fase de pupa esse processo autofágico se intensifica e quase todo o citoplasma fica repleto de vacúolos;
- O corpo gorduroso inicia sua dissociação na pupa, apresentando aspectos ligados à MCP. Contudo, ele persiste até a fase adulta, período em que tais aspectos se apresentam intensificados;
- O gene RaDad1 parece ter função protetora para a MCP na glândula salivar, apesar de possuir expressão basal em todos os períodos observados;
- Os genes antiapoptóticos RaDad1 e RaBax inhibitor-1 estão superexpressos no corpo gorduroso de pupa. Ao contrário, na glândula salivar de pupa, BI-1 não é expresso;
- O gene autofágico RaAtg1 está superexpresso no corpo gorduroso e pouco expresso na glândula de pupa.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS²

AGUILA, J. R.; SUSZKO, J.; GIBBS, A. G.; HOSHIZAKI, D. K. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 956-963, 2007.

AKDEMIR, F.; FARKAS, R.; JUHASZ, G.; MEDVED'OVÁ, L.; SASS, M.; WANG, L.; WANG, X.; CHITTARANJAN, S.; GORSKI, S. M.; RODRIGUEZ, A.; ABRAMS, J. M. Autophagy occurs upstream or parallel to the apoptosome during histolytic cell death. **Development**, v. 133, p. 1457-1465, 2006.

ALVARENGA, C. A. S.; WINTER, C. E.; STOCKER, A. J.; PUEYO, M. T.; LARA, F. J. S. *In vivo* effects of ecdysterone on puff formation and RNA and protein synthesis in the salivary glands of *Rhynchosciara americana*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 985-1002, 1991.

AMABIS, D. C.; AMABIS, J. M. Effects of ecdysterone in polytene chromosomes of *Trichosia pubescens*. **Dev. Biol.**, v. 102, p. 1-9, 1984a.

AMABIS, D. C.; AMABIS, J. M. Hormonal control of gene amplification and transcription in the salivary gland chromosomes of *Trichosia pubescens*. **Dev. Biol.**, v. 102, p. 10-20, 1984b.

AMABIS, D.; AMABIS, J. M.; SIMÕES, L. C. G. Puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Rhynchosciara americana* under experimental conditions. **Chromosoma**, v. 62, p. 139-154, 1977.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 55, p. 207-225, 2010.

BAEHRECKE, E. H. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. Review. **Cell Death and Differ.**, v. 10, p. 940-945, 2003.

BAEHRECKE, E. H. Autophagy: dual role in life and death? **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 6, n. 6, p. 505-510, 2005.

BERENDES, H. D.; LARA, F. J. RNA synthesis: a requirement for hormone-induced DNA amplification in *Rhynchosciara americana*. **Chromosoma**, v. 50, n. 3, p. 259-274, 1975.

² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERRY, D. L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy functions in programmed cell death. **Autophagy**, v. 4, n. 3, p. 1-2, 2008.

BERRY, D. L.; BAEHRECKE, E. H. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. **Cell**, v. 131, p. 1137-1148 2007.

BIEDERBICK, A.; KERN, H. F.; ELSÄSSER, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. **European Journal of Cell Biol.**, v.66, p. 3-14, 1995.

BREUER, M. E. Revision of the genus *Rhynchosciara* *Rubsaamen* (Diptera, Sciaridae) in neotropical region. **Arq. Zool.**, v. 17, n. 4, p. 167-198, 1969.

BREUER, M. E.; PAVAN, C. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. **Chromosoma**, v. 7, p. 371-386, 1955.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. **Journal of Mol. Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Mol. Endocrinology**, v. 29, p. 23-39, 2002.

CABADO, R.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Analysis and three- dimensional reconstruction of microscope images: an innovating methodology. **Acta Microscópica**, p. 103-104, 2001. Suppl.

CHAE, H. J.; KIM, H. R.; XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; KRAJEWSKA, M; KRAJEWSKI, S. et al. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. **Molecular Cell**, v. 15, n. 3, p. 355-366, 2004.

CHEONG, H.; NAIR, U.; GENG, J.; KLIONSKY, D. J. The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Sccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 19, n. 2, p. 668-681, 2008.

CHERBAS, L.; HU, X.; ZHIMULEV, I.; BELYAEVA, E.; CHERBAS, P. EcR isoforms in *Drosophila*: testing tissue-specific requirements by targeting blockade and rescue. **Development**, v. 130, p. 271-284, 2003.

CORTEZ, B. A.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Chrysotile effects on human lung cell carcinoma in culture: 3-D reconstruction and DNA quantification by image analysis. **BMC Cancer**, v. 8, p. 1-10, 2008.

CUERVO, A. M. Autophagy: in sickness and in health. **Trends in Cell Biol**, v. 14, n. 2, p. 70-77, 2004.

DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death?. **Autophagy**, v. 1, n. 2, p. 66-74, 2005.

DENTON, D.; BHUPENDRA, S.; SIMIM, R.; MILLS, K.; BERRY, D. L.; BAEHRECKE, E. H.; KUMAR, S. Autophagy, not apoptosis is essential for midgut cell death in *Drosophila*. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 1-6, 2009.

DREYFUS, A.; NONATO, E.; BREUER, M. E.; PAVAN, C. Cromossomos politênicos em vários órgãos de *Rhynchosciara angelae*. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 11, p. 439-450, 1951.

DUNN, W. A. J. Studies on the mechanism of autophagy: formation of the autophagic vacuole. **J. Cell Biol.**, v. 110, p. 1923-1933, 1990.

DUTTA, S.; BAEHRECKE, E. H. Warts is requires for PI3K-regulated growth arrest, autophagy, and autophagic cell death in *Drosophila*. **Current Biology**, v. 18, p. 1466-1475, 2008.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 663-669, 2004.

EWING, B.; GREEN, P. Based-calling of automated sequencer traces using phred, 2. Error probabilities. **Genome Res.**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; JILLIER, L. D.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred, 1. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FICQ, A.; PAVAN, C. Autoradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. **Nature**, v. 180, n. 4593, p. 983-984, 1957.

FRYDMAN, H. M.; CADAVID, E. O.; YOKOZAWA, J.; SILVA, F. H.; NAVARRO-CATTAPAN, L. D.; SANTELLI, R. V.; JACOBS, L. M.; GRAESSMANN, A.; GRAESSMANN, M.; STOCKER, A. J.; LARA, F. J. S. Molecular characterization of

the C-8 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*. **J. Mol. Biol.**, v. 233, p. 799-803, 1993.

GEONG, J.; KLIONSKY, D. J. The Golgi as a potential membrane source for autophagy. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 950-951, 2010.

GERARD, G. F.; MILLER, K. Comparision of glyoxal and formaldehyde gels for sizing rRNAs. **Focus**, v. 19, n. 1, p. 17-18, 1997.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J. Pathol.**, v. 221, p. 3-12, 2010.

GLOVER, D. M.; ZAHA, A.; STOCKER, A. J.; SANTELLI, R. V.; PUEYO, M. T.; TOLEDO, S. M.; LARA, F. J. S. Gene amplification in *Rhynchosciara* salivary gland chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 2947-2951, 1981.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consedi a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GUEVARA, M.; BASILE, R. DNA and RNA puffs in *Rhynchosciara*. **Caryologia**, v. 26, n. 2, p. 275-295, 1973.

HANNIGAN, A. M.; GORSKI, S. M. Macroautophagy. **Autophagy**, v. 5, n. 2, p. 140-151, 2009.

HARLEY, D. W.; RAMBOLD, A. S.; SATPUTE-KRISHNAN, P.; MITRA, K.; SOUGRAT, R.; KIM, P. K.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, v. 141, p. 656-667, 2010.

HOU, Y. C. C.; CHITTARANJAN, S.; BARBOSA, S. G.; MCCALL, K.; GORSKI, S. M. Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during *Drosophila melanogaster* oogenesis. **J. Cell Biol.**, v. 182, n. 6, p. 1127-1139, 2008.

HOU, Y. C. C.; HANNIGAN, A. M.; GORSKI, S. M. An executioner capase regulates autophagy. **Autophagy**, v. 5, n. 4, p. 530-533, 2009.

HÜCKELHOVEN, R. Bax inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. **Apoptosis**, v. 9, p. 299-307, 2004.

JURAND, A.; PAVAN, C. Ultrastructural aspects of histolytic process in the salivary gland cells during metamorphic stages in *Rhynchosciara hollaenderi* (Diptera, Sciaridae). **Cell Differ.**, v. 4: p. 219-236, 1975.

KANKI, T.; KLIONSKY, D. J. The molecular mechanisms of mitochondria autophagy in yeast. **Mol. Microbiol.**, v. 75, p. 795-800, 2010.

KELLEHER, D. J.; GILMORE, R. DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 4994-4999, 1997.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KIM, H. R.; LEE G. H.; HA, K.C., AHN, T.; MOON, J. Y.; LEE, B. J. et al. Bax inhibitor-1 a pH-dependent regulator of Ca^{2+} channel activity in the endoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 23, p. 15946-15955, 2008.

KIM, J.; KLIONSKY, D. J. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and peroxiphagy in yeast and mammalian cells. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 303-342, 2000.

KLIONSKY, D. J. Crohn disease and autophagy. **Autophagy**, v. 5, n. 2, p. 139, 2009.

KLIONSKY, D. J.; CREGG, J. M.; DUNN JR, W. A.; EMR, S. D.; SAKAI, Y.; SANDOVAL, I. V.; et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. **Dev. Cell**, v. 5, p. 539-545, 2003.

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, p. 1717-1721, 2000.

KROEMER, G.; JÄÄTTELÄ, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nature**, v. 5, p. 886-897, 2005.

KROEMER, G.; LEVINE, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 12, p. 1004-1010, 2008.

LARA, F. J. S.; TAMAKI, H.; PAVAN, C. Laboratory culture of *Rhynchosciara angela*. **Am. Nature**, v. 99, p. 189-191, 1965.

LEE, C. Y.; BAEHRECKE, E. H. Steroid regulation of programmed cell death during development. **Development**, v. 128, p. 1443-1455, 2001.

LEE, C. Y.; COOKSEY, B. A. K.; BAEHRECKE, E. H. Steroid regulation in midgut cell death during *Drosophila* development. **Develop. Biol.**, v. 250, p. 101-111; 2002.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by selfdigestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Dev. Cell**, v. 6, p. 463-477, 2004.

LINDMO, K.; SIMONSEN, A.; BRECK, A.; FINLEY, K.; RUSTEN, T. E.; STENMARK, H. A dual function for Deep orange in programmed autophagy in *Drosophila melanogaster* fat body. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 2018-2027, 2006.

LINDMO, K.; STENMARK, H. How a RING finger protein and a steroid hormone control autophagy. **Autophagy**, v. 2, n. 4, p. 321-322, 2006.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death. II. Endocrine potential of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. **J. Insect Physiol.**, v. 10, p. 643-649, 1964.

MACHADO-SANTELLI, G. M. Aspectos da fisiologia dos cromossomos politênicos. **Ciência e Cultura**, v. 26, p. 648-656, 1973.

MACHADO-SATELLI, G. M.; BASILE, R. DNA replication and DNA puffs in salivary chromosomes of *Rhynchosciara*. **Ciência e Cultura**, v. 27, p. 167-174, 1975.

MAKISHIMA, T.; NAKASHIMA, T.; NAGATA-KUNO, K.; FUKUSHIMA, K.; IIDA, H.; SAKAGUCHI, M.; IKEHARA, Y.; KOMIYAMA, S.; NISHIMOTO, T. The highly conserved DAD1 protein involved in apoptosis is required for N-linked glycosylation. **Genes to Cell**, v. 2, p. 129-141, 1997

MARTIN, D. N.; BALGLEY, B.; DUTTA, S.; CHEN, J.; RUDNICK, P.; CRANFORD, J.; KANTARTZIS, S.; DEVOE, D. L.; LEE, C.; BAEHRECKE, E. H. Proteomic analysis of steroid-tiggered autophagic programmed cell death during *Drosophila* development, **Cell Death and Differ.**, v. 14, n. 5, p. 1-8, 2007.

MASSEY, A.; KIFFIN, R.; CUERVO, A. M. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 2420-2434, 2004.

MCPHEE, C. K.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy in *Drosophila melanogaster*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 9, p. 1452-1460, 2009.

MCPHEE, C. K.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy shows its animal side. **Cell**, v. 141, p. 922-924, 2010.

MITTAPALLI, O.; SHUKLE, R. H. Molecular characterization and responsive expression of a defender against apoptotic cell death homologue from the Hessian fly, *Mayetiola destructor*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149, pt. b, p. 517-523, 2008.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes Dev.**, v. 21, p. 2861-2873, 2007.

MIZUSHIMA, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 132-139, 2010.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T. How to interpret LC3 immunoblotting. **Autophagy**, v. 3, n. 6, p. 542-545, 2007.

MOHARIKAR, S.; D'SOUZA, J. S.; RAO, B. J. A homologue of the defenfer against the apoptotic death gene (dad1) in UV-exposed *Chlamydomonas* cells is downregulated with the onset of programmed cell death. **J. Biosci.**, v. 32, p. 261-270, 2007.

MYOHARA, M. Real-time observation of autophagic programmed cell death of *Drosophila* salivary glands in vitro. **Dev. Genes Evol.**, v. 214, p. 99-104, 2004.

NAKASHIMA, T.; SEKIGUCHI, T.; KURAOKA, A.; FUKUSHIMA, K.; SHIBATA, Y.; KOMIYAMA, S.; NISHIMOTO, T. Molecular cloning of a Human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in Hamster BHK21 cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 10, p. 6367-6374, 1993.

NAZARKO, V. Y.; NAZARKO, T. Y.; FARRE, J. C.; STASYK, O. V.; WARNECKE, D.; ULASZEWSKI, S.; CREEG, J. M. et al. Atg35, a micropexophagy-especific protein that regulates micropexophagy apparatus formation in *Pichia pastoris*. **Autophagy**, v. 7, 2011. In press.

NELLIOT, A.; BOND, N.; HOSHIZAKI, D. K. Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. **Genesis**, v. 44, p. 396-400, 2006.

NEZIS, I. P.; SHRAVAGE, B. V.; SAGONA, A. P.; LAMARK, T.; BJORKOY, G.; JOHANSEN, T. et al. Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late *Drosophila melanogaster* oogenesis. **J. Cell Biol.**, v. 109, n. 4, p. 523-531, 2010.

NIEMANN, A.; BALTES, J.; ELSÄSSER, H. P. Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent Monodansylcadaverine. **The Journal of Histochem. & Cytochem.**, v. 49, p. 177-185, 2001.

NIEMANN, A.; TAKATSUKI, A.; ELSÄSSER, H. P. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. **The Journal of Histochem. & Cytochem.**, v. 48, p. 251-258, 2000.

NONATO, E.; PAVAN, C. A new species of *Rhynchosciara Rubsaamen*, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). **Rev. Brasil Biol.**, v. 11, p. 435-437, 1951.

OKRETIC, M. C.; PENONI, J. S.; LARA, F. J. S. Messenger-like RNA synthesis and DNA chromosomal puffs in the salivary glands of *Rhynchosciara americana*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 178, p. 158-165, 1977.

PENALVA, L. O. F.; YOKOZAWA, J.; STOCKER, A. J.; SOARES, M. A. M.; GRAESSMANN, M.; ORLANDO, T. C.; WINTER, C. E.; BOTELLA, L. M.; GRAESSMANN, A.; LARA, F. J. S. Molecular characterization of the C-3 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*. **Gene**, v. 193, p. 163-172, 1997.

RAMBOLD, A.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Starved cells use mitochondria for autophagosome biogenesis. **Cell Cycle**, v. 9, n. 18, p. 3633-3634, 2010

REGINATO, R. D.; CRUZ-LANDIM, C. Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honey bee. **Cell Biology International**, v. 26, n. 3, p. 243-251, 2002.

REZENDE-TEIXEIRA, P.; ANDRADE, A.; SIVIERO, F.; SANTELLI, R. V. A shortcut in phage screening technique. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 150-151, 2005.

RIBEIRO, A. F. Developmental changes in the fine structure of the salivary gland of *Trichosia pubescens* (Morgante) (Diptera: Sciaridae) in relation to puffing activity. **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.**, v. 18, n. 4, p. 185-198, 1989.

ROST-ROSZKOWSKA, M. M.; POPRAWA, I.; CHACHULSKA-ZYMELKA, A. Apoptosis and autophagy in midgut epithelium of *Acheta domesticus* (Insecta. Orthoptera, Gryllidae). **Zoological Science**, v. 27, p. 740-745, 2010.

RUSTEN, T. E.; LINDMO, K.; JUHÁSZ, G.; SASS, M.; SEGLEN, P. O.; BRECH, A.; STENMARK, H. Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. **Developmental Cell**, v. 7, p. 179-192, 2004.

RYOO, H. D.; BAEHRECKE, E. H. Distinct death mechanisms in *Drosophila* development. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 889-895, 2010.

SAKAI, Y.; OKU, M.; VAN DER KLEI, I. J.; KIEL, J. A. K. W. Pexophagy: Autophagic degradation of peroxisomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 1767-1775, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning – Laboratory Manuals**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTELLI, R. V.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; PUEYO, M. T.; NAVARRO-CATTAPAN, L. D.; LARA, F. J. S.; Replication and transcription in the course of DNA amplification of the C3 and C8 DNA puffs of *Rhynchosciara americana*. **Mech Dev.**, v. 36, p. 59-66, 1991.

SANTELLI, R. V.; SIVIERO, F.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; LARA, F. J. S.; STOCKER, A. J. Molecular characterization of the B-2 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*. **Chromosoma**, v. 113, p. 167-176, 2004.

SCHIN, K.; LAUFER, H. Studies of programmed salivary gland regression during larval-pupal transformation in *Chironomus thummi*. **Experimental Cell Res.**, v. 82, p. 335-340, 1973.

SCOTT, R. C.; JUHA'SZ, G.; NEUFELD, T. P. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. **Curr. Biol.**, v. 17, p. 1-11, 2007.

SEKIMOTO, M.; IWAMI, M.; SAKURAI, S. 20-Hydroxyecdysone regulation of the Ets transcription factor E74 gene in programmed cell death in silkworm anterior silk gland. **Insect Mol. Biol.**, v. 16, p. 581-590, 2007.

SHEN, H. M.; CODOGNO, P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? **Autophagy**, v. 7, n. 5, p.1-9, 2011.

SIMON, P. R.; ALMEIDA, C. A. Programmed cell death in *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae) salivary glands presents apoptotic features. **Genesis**, v. 40, p. 22-31, 2004.

SINDELKA, R.; FERJENTSIK, Z.; JONÁK, J. Developmental expression profiles of *Xenopus laevis* reference genes. **Develop. Dynamics**, v. 235, p. 754-758, 2006.

SIVIERO, F.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; ANDRADE, A.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; SANTELLI, R. V. Analysis of expressed sequence tags from *Rhynchosciara americana* salivary glands. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, p. 109-118, 2006.

STOCKER, A. J.; PAVAN, C. The influence of ecdysone on gene amplification, DNA synthesis, and puff formation in the salivary gland chromosomes of *Rhynchosciara hollaenderi*. **Chromosoma**, v. 45, n. 3, p. 295-319, 1974.

SUGIRA, M.; TAKAGI, H. Yeast cell death caused by the OST2 gene encoding the ϵ -subunit of *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, n. 5, p. 1234-1241, 2006.

SUZUKI, K.; KONDO, C.; MORIMOTO, M.; OHSUMI, Y. Selective transport of α -mannosidase by autophagy pathway. Identification of a novel receptor, Atg34p. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 30019-30025, 2010.

SUZUKI, K.; OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 581, p. 2156-2161, 2007.

TERRA, W. R.; DE BIANCHI, A. G.; GAMBARINI, A. G.; LARA, F. J. S. Haemolymph amino acids and related compounds during cocoon production by the larvae of the fly *Rhynchosciara americana*. **J. Insect Physiology**, v. 19, p. 2097-2106, 1973.

TETTAMANTI, G.; GRIMALDI, A.; CASARTELLI, M.; AMBROSETTI, E.; PONTI, B.; CANGIU, T.; FERRARESE, R.; RIVAS-PENA, M. L.; PENNACCHIO, F.; EGUILEOR, M. Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. **Cell Tissue Res.**, v. 330, p. 345-359, 2007.

TIAN, Y.; LI, Z.; HU, W.; REN, H.; TIAN, E.; ZHAO, Y. et al. *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. **Cell**, v. 141, p. 1042-1055, 2010.

TOOZE, S. A.; YOSHIMORI, T. The origin of the autophagosomal membrane. **Nat. Cell Biol.**, v. 12, n. 9, p. 831-835, 2010.

WALTER, L.; DIRKS, B.; ROTHERMEL, E.; HEYENS, M.; SZPIRER, C.; LEVAN, G.; GÜNTHER, E. A novel, conserved gene of the rat that is developmentally regulated in the testis. **Mammalian Genome**, v. 4, p. 216-221, 1994.

WIEDEMANN, C. R. W. **Diptera exotica**. p. 244, 1 fig., 2 pls. Kiliae [=Kiel], 1821.

WINTER, C. E.; DE BIANCHI, A. G.; TERRA, W. R.; LARA, F. J. S. Protein synthesis in salivary glands of *Rhynchosciara americana*. **Developmental Biology**, v. 75, p. 1-12, 1980.

WINTER, C. E.; DE BIANCHI, A. G.; TERRA, W. R.; LARA, F. J. S. Relationships between newly synthesized protein and patterns in salivary glands of *Rhynchosciara americana*. **Chromossoma**, v. 61, p. 193-206, 1977a.

WINTER, C. E.; DE BIANCHI, A. G.; TERRA, W. R.; LARA, F. J. S. the giant GNA puffs of *Rhynchosciara americana* code for polypeptides of the salivary glands secretion. **J. Insect. Physiol.**, v. 23, p. 1453-1459, 1977b.

XIE, Z.; KLIONSKY, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 1102-1109, 2007.

XU, R.; REED, J. C. Bax Inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor indentified by function screening in yeast. **Molecular Cell**, v. 1, p. 337-346, 1998.

YAN, N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 36-56, 2005.

YOULE, R. J.; NARENDRA, D. P. Mechanisms of mitophagy. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2011.

ANEXOS

**ANEXO A – MICROSCOPIA EM TEMPO REAL (TIME LAPSE) DA GLÂNDULA
SALIVAR DE PUPA DE *R. AMERICANA*.**

O anexo A pode ser encontrado no CD na página seguinte.

ANEXO B – MICROSCOPIA EM TEMPO REAL (TIME LAPSE) DA GLÂNDULA SALIVAR DE LARVA NO 2º PERÍODO DO DESENVOLVIMENTO DE *R. AMERICANA*.

O anexo B pode ser encontrado no CD encartado.