

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia Maria  
Machado-Santelli

São Paulo  
2011

## 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.

# **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 publicado<sup>1</sup>

## 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).

<sup>1</sup> 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 (MCP) 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 fosfolípido

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:

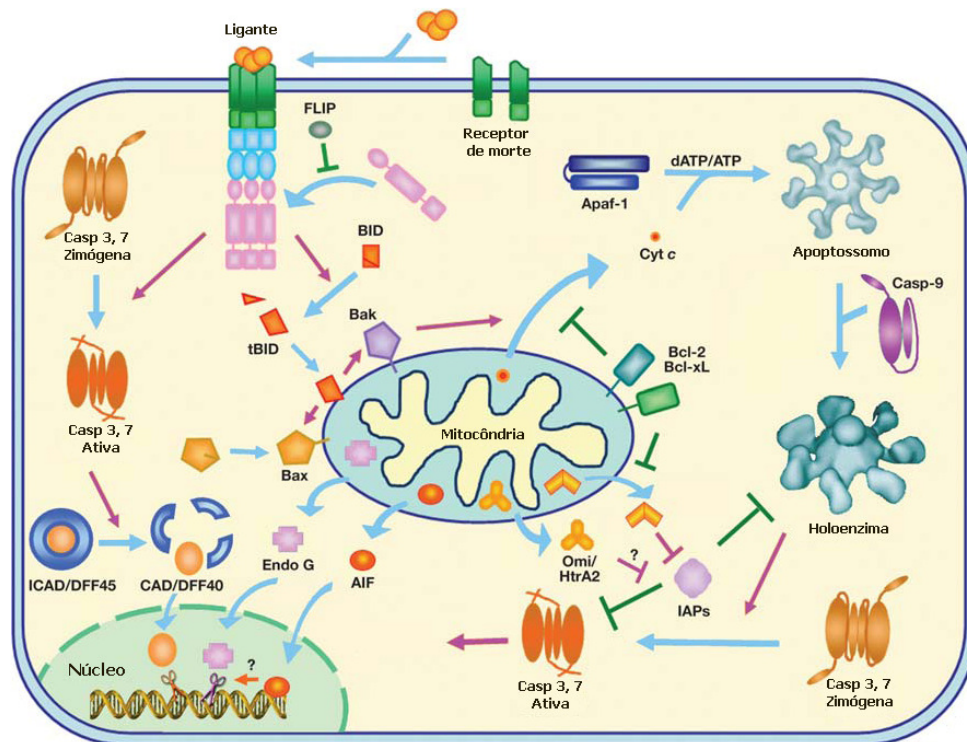
- (1) Caspases iniciadoras ou desencadeantes: são caspases que são ativadas pelos sinais internos ou externos e ativam as caspases executoras. São elas caspases 2, 8, 9 em mamíferos e DCP-2/DREDD, DRONC E DREAM em *Drosophila*.
- (2) Caspases executoras: permanecem inativas na célula até serem clivadas 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<sub>L</sub> (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  $\text{Ca}^{2+}$  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 diferenciou-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).

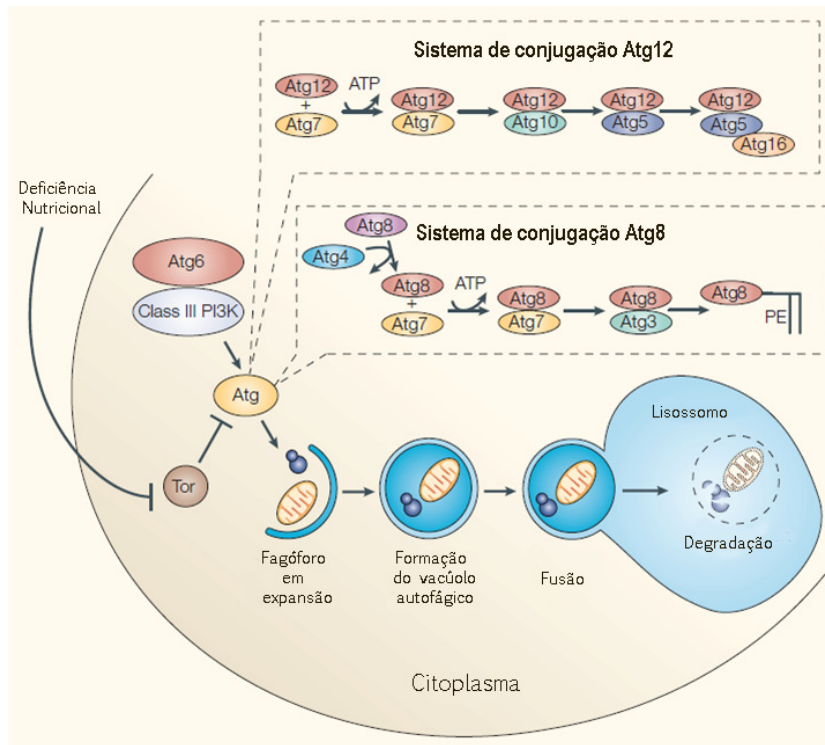
Após a ativação da Classe III PI3K, uma série de eventos ocorre para a correta formação do autofagossomo. A origem da membrana que forma o

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,  $\beta$ 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).

## **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**

## REFERÊNCIAS<sup>2</sup>

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 chromossomes 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.

---

<sup>2</sup> 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. Comparison 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 caspase 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<sup>2+</sup> 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 silkworms. **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 defender 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-specific 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**. 3<sup>rd</sup> 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  $\epsilon$ -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  $\alpha$ -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 screeninig 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.