

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/3862
IB/80581

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1980

SHIRLEY MARIA RECCO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE HETEROCROMATINA EM
Drosophila nebulosa

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do
grau de Mestre em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza S. Mello

T/UNICAMP

R243c

Campinas - S.P.

-1980-

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Classif.	I
Autor	R243 c
V.	Ex.
Ex.	
Tombo BC/	3862
	13/ 434
EM000306567	

13/ 80581
BC/ 3862

À memória de minha mãe;

Ao meu pai, homem do campo, exemplo de
dedicação ao trabalho, honestidade, hu-
mildade e amor à terra;

Ao Edson, companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, que muito tem contribuído para minha formação científica, pela orientação segura e eficiente, pelo estímulo e disposição constantes, pelo exemplo de dedicação ao trabalho e devoção à pesquisa, e pelo carinho e amizade com que me tem distinguido, não só no campo profissional, sou imensamente grata.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, por ter permitido que este trabalho se realizasse no Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelas discussões e sugestões apresentadas no decurso do mesmo, bem como pela amizade, confiança e apoio constantes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido na forma de Bolsa de Mestrado, o qual contribuiu para realização de parte deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia (Genética) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, pelo fornecimento da linhagem de Drosophila nebulosa para início da cultura utilizada neste trabalho, em especial à amiga Marlene K. Hosaki, não só pela coleta das moscas...

Ao técnico Juverlandi Lugli, pela disposição constante em cuidar da esterilização dos vidros utilizados para o meio de cultura.

Ao Dr. H. Loewe, da Hoechst A.G., pela doação do composto Hoechst 33258 à Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello para desenvolvimento de pesquisas em cromatina de vetores de doença de Chagas e outros insetos.

À Profa. Dra. Regina de Castro Bicudo Pisani, pelo fornecimento do soro fetal bovino, utilizado na realização de alguns experimentos deste trabalho.

À srta. Maria de Lourdes Ferreira, pelo esmerado trabalho de datilografia de grande parte dos manuscritos.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela amizade e colaboração constantes.

À Profa. Dra. Hermione E.M.C.Bicudo e ao Prof. Dr. Celso A. Mourão, pelo muito que contribuíram para minha formação em nível de graduação.

Ao Edson Rosa Pimentel, pela colaboração, interesse, paciência e entusiasmo, durante todas as etapas de realização deste trabalho.

Ao meu pai, pela compreensão e incentivo, que mesmo a custas de muitos sacrifícios, proporcionou facilidades ao meu estudo, minha especial gratidão.

A todos, que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho pôde ser realizado graças à doação de equipamentos pela FAPESP, Conselho Nacional de Pesquisas e Fundação Alexander von Humboldt ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP na pessoa dos Profs. Drs. Benedicto de Campos Vidal e Maria Luiza Silveira Mello.

INDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAL	20
III. MÉTODOS	21
1. Para bandeado C e G	21
2. Ação do composto Hoechst 33258 sobre as áreas heterocromáticas	24
3. Basofilia cromossômica	24
4. Espectros de absorção de Feulgen	26
IV. RESULTADOS	27
1. Bandeado C e G	27
1.1. Cromossomos mitóticos	27
1.2. Cromossomos politênicos	35
2. Ação do composto Hoechst 33258 sobre as áreas heterocromáticas	40
3. Basofilia cromossômica	42
4. Espectros de absorção de Feulgen	49
V. DISCUSSÃO	57
1. Bandeado C	57
2. Bandeado G	66
3. Resposta ao tratamento com o composto Hoechst 33258 em cultura	68
4. Basofilia e espectros de absorção de Feulgen.	71
VI. CONCLUSÕES	77
VII. RESUMO	80
VIII. ABSTRACT	82
IX. BIBLIOGRAFIA	84

I. INTRODUÇÃO

A espécie Drosophila nebulosa possui 3 pares de cromossomos, dois dos quais são metacêntricos (cromossomos X e II) e um par acrocêntrico (cromossomo III). Também o cromossomo Y é metacêntrico. Pavan (1946a) verificou que os cromossomos X e II mitóticos desta espécie possuem praticamente a mesma quantidade de heterocromatina centromérica (em termos de área ou volume). Já nos cromossomos politênicos da mesma espécie, observou que o cromocentro representa quase que totalmente a heterocromatina centromérica do cromossomo II, enquanto as heterocromatinas dos cromossomos X, Y e III estão reduzidas a uns poucos grânulos heterocromáticos. Esta distribuição desigual da heterocromatina em cromossomos politênicos contrastaria, portanto, com o que acontece em cromossomos mitóticos. Tal descrição se baseou em características morfológicas e análise de translocações recíprocas. Existiriam, portanto, dois tipos de heterocromatina: um que sofreria relativamente pouca redução quando passasse da condição de cromossomo mitótico para politênico (heterocromatina centromérica do II), e outro que se reduziria consideravelmente em condições idênticas (heterocromatina dos cromossomos III, X e Y). Esta "redução" de área de heterocromatina é definida em comparação com a área ocupada pela eucromatina em ambos os tipos de cromossomos.

Casos semelhantes ao de D. nebulosa em relação a tipos de heterocromatina foram verificados em D. melanogas-

ter por Müller e colaboradores (1937), os quais mostraram que longas secções do cromossomo X mitótico são reduzidas a uma simples banda em cromossomos politênicos de glândula salivar, e por Hinton (1942), que comparou o cromossomo II mitótico e politênico, mostrando que a região heterocromática que constitui 1/5 do braço esquerdo do segundo cromossomo em metafase mitótica é reduzida a uma simples banda em cromossomos politênicos. Cavalcanti (1948), estudando cromossomos de várias linhagens de D. prosaltans, encontrou a mesma distribuição de heterocromatina nessas espécies, como reportado por Pavan em D. nebulosa. Da mesma forma, Hsiang (1949) mostrou que D. tumiditarsus possui também esses dois tipos de heterocromatina. Ward (1949) encontrou diferenças muito bem ilustradas comparando duas espécies de Drosophila; em D. carbonaria, uma massa expandida de heterocromatina está presente adjacente ao centrômero em cada um dos cromossomos mitóticos maiores e D. nanoptera tem quatro braços heterocromáticos de tamanhos variados, em cromossomos mitóticos. No entanto, nos cromossomos politênicos de glândula salivar mesmo dos machos, não há cromocentro e nenhuma banda heterocromática óbvia. Essas observações todas foram baseadas em análise de cromossomos preparados por esmagamento e corados comorceína acética.

Heitz (1933, 1934), cujos trabalhos sobre heterocromatina propiciaram que seu estudo ganhasse especial impulso, analisou diversos tipos de material, incluindo preparações de cromossomos mitóticos e politênicos de várias espécies de Drosophila. Descrevendo a heterocromatina de cromossomos politênicos de glândula salivar de Drosophila virilis,

propôs, em 1934, a distinção entre a heterocromatina densamente compactada, situada no local de confluência de centrômeros, daquela que circunda a primeira e que seria representada por uma área vesiculada, menos densamente compactada. Denominou a primeira de α - heterocromatina e a segunda de β - heterocromatina. Tal aspecto de α e β - heterocromatina foi confirmado por estudos ao microscópio eletrônico por Sorsa (1969). Enquanto o tipo α , em Drosophila virilis, forma apenas uma pequena parte do cromocentro, o tipo β forma grande parte desta estrutura e as bases dos cromossomos. A questão, se ou não, os dois tipos de heterocromatina encontrados em D. nebulosa corresponderiam aos tipos α e β descritos por Heitz em D. virilis foi deixada em aberto por Pavan (1946a). Segundo este autor, em D. virilis é difícil localizar esses dois tipos de heterocromatina em cromossomos mitóticos e compará-los com a condição descrita para os politênicos. No entanto, segundo o próprio Pavan (1946a), dos dois tipos de heterocromatina presentes em D. nebulosa, o do cromossomo II em estado politenizado (cromocentro) é aquele que apresenta maior nível de replicação. A heterocromatina dos cromossomos III, X e Y apresenta-se extremamente reduzida em relação às eucromatinas respectivas. Nestes termos, poder-se-ia tentar classificar a primeira como uma β - heterocromatina, levando-se em consideração as descrições de Heitz (1933, 1934) (heterocromatina que retém propriedade de endoreplicação) e principalmente com base em resultados mais recentes envolvendo experimentos de ultracentrifugação e hibridização "in situ" para outras espécies de Drosophila (Gall et al., 1971). Quanto à heterocroma-

tina dos cromossomos III, X e Y, poderia ser classificada como α - heterocromatina, com base na denominação dada por Heitz (1934) e por Gall e colaboradores (1971), para heterocromatina de D. virilis e D. melanogaster que não se replica, ou se replica muito pouco, durante a politenização. Também estudos de autorradiografia ao nível de microscopia eletrônica, em cromossomos politênicos de D. melanogaster, mostraram incorporação de H^3 - uridina sobre pequenas massas densas de β - heterocromatina, indicando alguma atividade transcritora desta, e nenhuma marcação sobre a α - heterocromatina (Lakhotia e Yacob, 1974). Tem-se verificado ainda que a α - heterocromatina do cromocentro de D. melanogaster não incorpora H^3 - timidina, enquanto que a β sempre se apresenta tão marcada quanto a eucromatina (Lakhotia, 1974). Dados semelhantes foram observados também em D. hydei, porém através de experimentos de hibridização "in situ", verificando-se replicação da β - heterocromatina, ao contrário do que acontece com a α - heterocromatina, a qual não replica e contém DNA altamente repetitivo (Renkawitz, 1978a e b).

Heterocromatina centromérica, como a encontrada nos cromossomos de D. nebulosa e de muitos outros organismos, vem recebendo a denominação de heterocromatina constitutiva. Esta denominação originou-se basicamente na classificação proposta por Brown (1966) para definir dois grandes grupos de heterocromatina: um que ocorreria em porções homólogas do par cromossômico (heterocromatina constitutiva) e outro que estaria restrito a apenas um dos cromossomos do par (heterocromatina facultativa). Atualmente essa classificação foi adiciona

da de um significado funcional, ou seja, a heterocromatina constitutiva é admitida como possuidora de grandes extensões não codificadoras (não codificaria para RNAs mensageiros cujo produto final fosse uma proteína), enquanto que a facultativa seria catalogada como inativa, ou seja, não responderia a estímulos de transcrição por causa de alterações na estrutura "super-coiling" da desoxirribonucleoproteína (revisão em Mello, 1978a). Através de técnicas bioquímicas e autorradio - gráficas, veio-se a determinar que a heterocromatina constitutiva é um tipo cromatínico especial, que apresenta geralmente em sua composição um DNA altamente repetitivo (Arrighi et al., 1970; Yasmineh e Yunis, 1969, 1970, 1971; Yunis et al., 1971). Estudos de hibridização in situ mostraram localização de DNA satélite repetitivo na heterocromatina constitutiva centromérica, bem como em outras regiões heterocromáticas dos cromossomos de Drosophila (Gall et al., 1971; Botchan et al., 1971; Hennig et al., 1970; Jones e Robertson, 1970; Rae, 1970; Perreault et al., 1973) e de Rhynchosciara (Eckhardt e Gall, 1971; Machado - Santelli et al., 1979), para citar apenas dados referentes a alguns dípteros.

Em Drosophila, Hennig e colaboradores (1970), mostraram, através de experimentos utilizando gradiente de densidade, que as espécies hydei, neohydei e pseudoneohydei diferem no número e proporções de DNAs satélites e que essas sequências satélites estão principalmente presentes na α - heterocromatina, e não na β , mas que outras podem estar espalhadas ao longo dos braços cromossômicos. Gall e colaboradores (1971), por outro lado, verificaram que a maioria das sequên-

cias repetitivas em D. virilis e em D. melanogaster estão localizadas na α - e na β - heterocromatina e somente uma pequena porcentagem na eucromatina e estas se encontram amplamente distribuídas nos braços cromossômicos; e que durante a politeniização apenas as sequências repetitivas da β - heterocromatina (ou parte delas) e as da eucromatina replicariam (DNA da banda principal).

Nesta última década, com a introdução de novas técnicas citoquímicas para estudos cromossômicos, incluindo -se aquelas usadas para obtenção de bandas cromossômicas, vem -se demonstrando que a heterocromatina constitutiva não representa um tipo cromatínico único. Uma certa heterogeneidade quanto a esta heterocromatina está sendo constatada, uma vez que ela chega a apresentar diferentes respostas a tais métodos, conforme a espécie e/ou o cromossomo em consideração.

Os bandeados são em geral obtidos pela coloração dos cromossomos com giemsa que é uma mistura dos corantes tiazínicos catiônicos azul de metileno, azure A, azure B e azure C (coram em azul) com a eosina Y, corante aniônico (cora em vermelho), após pré-tratamentos extrativos, ou pelo uso de fluorocromos, como quinacrina, acranil, composto Hoechst 33258 e outros. Em 1970, Pardue e Gall notaram que a heterocromatina centromérica de cromossomos de camundongo, rica em DNA satélite, corava mais intensamente com giemsa, após \checkmark tratamento para hibridização in situ. Gall e Pardue (1971) desenvolveram o procedimento de hibridização DNA-RNA para determinação das posições de determinadas sequências de bases do DNA sobre os cromossomos. Este procedimento consiste, entre outras coisas, na desnaturação do DNA

cromossômico pela exposição do mesmo à solução de NaOH 0,07N e reassociação das bases complementares em solução salina de citrato (2SSC) a temperaturas relativamente altas (60 - 65°C) "overnight". Arrighi e colaboradores (1971) também notaram áreas centroméricas pesadamente marcadas, ao tentarem determinar a posição citológica do DNA repetitivo em cromossomos humanos, usando o procedimento de Pardue - Gall. A partir dessas observações, Arrighi e Hsu (1971) adaptaram essa técnica para a coloração de heterocromatina constitutiva. Essa técnica, por sua vez, também sofreu muitas modificações metodológicas, durante os anos que se seguiram, como por exemplo, o uso de soluções mais diluídas de hidróxido de sódio, de outras bases, (por exemplo, hidróxido de bário) como agentes desnaturantes, e pré-tratamento por álcoois ou ácidos. Tais modificações surgiram, principalmente, porque para determinados organismos, forneciam melhores resultados, em termos de melhor preservação da morfologia cromossômica e/ou conservação diferencial da composição cromossômica. Uma vez que esses procedimentos de desnaturação-reassociação, tornavam mais corada a região heterocromática centromérica, o método foi denominado de banda C.

Devido à associação de banda C geralmente com heterocromatina constitutiva rica em DNA satélite, concebeu-se inicialmente que as regiões intensamente positivas ao Giemsa, representavam áreas de DNA reassociado altamente repetitivo (Gagné et al., 1971; Schnedl, 1971; Yunis et al., 1971; de la Chapelle et al., 1971; Yunis e Yasmineh, 1971; Mace et al., 1972). Várias espécies de Drosophila (melanogaster, texana,

ezoana e hydei) foram estudadas, quanto aos padrões de banda C de seus cromossomos prometafásicos e foram confirmadas as observações feitas por Hsu (1971), de que também em Drosophila, a banda C corresponderia à heterocromatina centromérica e que essas regiões se tornariam de fato, àquelas mais condensadas e mais fortemente coradas nos cromossomos metafásicos, contendo DNA altamente repetitivo (Pimpinelli et al., 1976).

Entretanto, a composição molecular das regiões que respondem para banda C nem sempre é homogênea (Jalal et al, 1974a) e segundo Comings (1978) existem várias razões para se acreditar que o método de banda C não apresente um mecanismo tão primário assim, já que algumas heterocromatins banda C positivas não contêm alta repetitividade ou DNA satélite (Comings e Mattoccia, 1972; Arrighi et al., 1974). Por experimentos de hibridização DNA-RNA in situ foi demonstrado que as bandas C dos cromossomos sexuais de hamster contêm pouco, se algum, DNA repetitivo (Arrighi et al., 1974) e o cromossomo Y de D. hydei, que é banda C positivo, não contêm DNA altamente repetitivo no seu total (Hennig, 1973). Além disso, nem toda heterocromatina constitutiva responde positivamente aos métodos de banda C (Ennis, 1974; Arrighi et al., 1974; Mello, 1979b).

Admite-se que uma remoção diferencial de DNA, nos cromossomos, desempenhe papel na obtenção de bandas. Isto se considerarmos que a heterocromatina constitutiva apresenta maior compactação de seu DNA ou porque apresente maior resistência à hidrólise (diferentes interações DNA- proteínas não histônicas) ou ainda porque nessa região ocorre renaturação mais rápida do DNA do que em regiões eucromáticas (Vidal,

1972; Pathak e Arrighi, 1973; Burkholder e Weaver, 1977; Comings et al., 1973, 1977; Matsukuma e Utakoji, 1977; Comings, 1978).

Logo depois que as técnicas de bandas para coloração de heterocromatina constitutiva centromérica foram desenvolvidas, descobriu-se que tratamento dos cromossomos com enzimas proteolíticas como a pronase (Dutrillaux et al., 1971) e tripsina (Seabright, 1971; Wang e Federoff, 1972), seguidos por coloração com Giemsa, produziam bandas, que foram denominadas G. Segundo Comings (1978) a banda G ocorre porque há uma estrutura cromomérica básica nos cromossomos metafásicos, que seria evidenciada pelo tratamento. Porém este mecanismo não se encontra ainda bem esclarecido e acredita-se que o padrão cromomérico se evidencia devido a algum grau de rearranjo das fibras das interbandas (bandas G⁻), com possibilidade de alguma extração de DNA e presença nestas regiões de proteínas não-histônicas, não estando, portanto, este DNA acessível para se ligar ao corante.

Também os padrões diferenciais de fluorescência com quinacrina ao longo dos cromossomos (banda Q) têm sido amplamente estudados. Verificou-se que uma forte fluorescência estaria associada a regiões cromossômicas com DNAs altamente ricos em sequências de bases AT (Comings et al., 1975). Uma fluorescência fraca, por outro lado, poderia significar DNAs com maior riqueza em CG ou mesmo em AT, ou outras variações na composição de bases do DNA ao longo do cromossomo, proteínas não-histônicas interferindo na resposta ao método (Comings et al., 1975).

O composto Hoechst 33258, um derivado bibenzimidazole, também tem sido usado, à semelhança da quinacrina, co

mo um corante fluorescente para regiões heterocromáticas constitutivas especialmente ricas em pares de bases AT (banda H). A fluorescência pelo composto Hoechst, no entanto, não é reduzida pela presença de bases CG de permeio (Hilwig e Groop, 1973). Além disso, quando introduzido em cultura de células por um certo período de tempo, tem a capacidade de tornar descompactadas (alongadas) tais regiões (Hilwig e Groop, 1973; Pimpinelli et al., 1975; Rocchi et al., 1976), ou, segundo Marcus e Sperling (1979) e Marcus et al. (1979), impediria a condensação dessas regiões. Admite-se que durante a fase S do ciclo celular, o composto Hoechst 33258 liga-se preferencialmente com o DNA de regiões cromossômicas particulares, interferindo com a ligação de proteína ao DNA que está replicando, ou competindo com essas proteínas, as quais seriam responsáveis pela condensação de tais regiões (Gatti et al., 1976). O composto Hoechst liga-se especificamente ao DNA rico em AT, externamente à dupla hélice, interagindo com os pares de bases por ligação hidrofóbica (Comings, 1975; Latt e Wohlleb, 1975). Regiões eucromáticas especialmente ricas em AT têm também a capacidade de se alongar quando tratadas em cultura com esse composto (Hilwig e Groop, 1973; Rocchi et al., 1976).

Diferenças de resposta da heterocromatina a esses diversos tipos de bandas acima relatados foram descritas para várias espécies vegetais e animais, incluindo entre estas últimas, algumas do grupo dos dípteros. Bedo (1975) estudou o padrão de banda C de cromossomos politênicos e mitóticos de duas espécies de Simulium. Em S. ornatipes, as regiões centroméricas bem como várias bandas dos cromossomos po

litênicos coravam intensamente. Nos cromossomos mitóticos completamente compactados dessa espécie, no entanto, aparece uma única banda centromérica e nenhuma banda nos braços cromossômicos, e se mais distendidos, aparecem apenas duas bandas intersticiais. Portanto, muitas bandas detectáveis nos cromossomos politênicos por este método, não o foram em mitóticos. Observação semelhante foi constatada em S. melatum, com a diferença que a região centromérica em cromossomos politênicos apresenta uma área central não corada, ladeada por intensa banda C, contrastando com S. ornatipes que mostra profunda coloração da parte central do centrômero ladeada por região periférica não corada (Bedo, 1975).

Várias espécies de Chironomus foram estudadas quanto aos padrões de banda C de seus cromossomos politênicos, por Hägele (1977). Este autor introduziu o pré-tratamento por isopropanol ao método de banda C. Em quase todas as espécies analisadas, as regiões cromocêntricas dos cromossomos politênicos apareceram coradas intensamente e os braços cromossômicos corados palidamente. Exceção foi a espécie C. Thummi, que apresentou algumas bandas intersticiais positivas, além das regiões centroméricas. Esses resultados foram discutidos pelo autor, tendo ele sugerido que material cromossômico é perdido durante o procedimento de banda C (o autor notou que os braços cromossômicos coram fracamente e algumas bandas chegam mesmo a desaparecer) e que há maior resistência à remoção das áreas heterocromáticas banda C positivas, do que o restante do cromossomo.

Em 1971, Hsu verificou que a heterocromatina centromérica dos cromossomos mitóticos metafásicos de Drosophila melanogaster responde ao procedimento de banda C de maneira semelhante ao observado em células de mamíferos por Arrighi e Hsu (1971).

Também os cromossomos mitóticos do díptero Culiseta longiareolata foram objeto de estudo quanto à resposta aos métodos de bandas C e Q. Foram detectadas 3 classes de heterocromatina: a primeira, caracterizada por áreas Q brilhantes e C intermediária em intensidade de coloração; a segunda por serem Q pouco brilhantes e C muito intensamente corada; e a terceira por ser fracamente fluorescente e apresentar pouca ou nenhuma resposta para banda C. Com base nesses dados, os autores sugeriram que a composição em bases do DNA é uma condição necessária, mas não suficiente, para explicar o significado estrutural dessas bandas, já que, se admite que regiões Q fluorescentes, revelam polinucleotídeos ricos em AT, e no entanto, estas mesmas áreas mostram diferentes intensidades de coloração à banda C. Sugeriram ainda o grau de empacotamento das fibras cromatínicas como o principal fator determinante de banda C (Mezzanotte et al., 1979).

Já em cromossomos politênicos de Rhynchosciara, as respostas aos métodos C, Q e H não diferiram quando se efetuou comparação da região do cromocentro com inúmeras bandas ao longo dos braços cromossômicos (Stocker et al., 1978).

Um número considerável de espécies tem sido examinado quanto aos padrões de bandas fluorescentes de seus cromossomos. (Vosa, 1970; Ellison e Barr, 1971; Barr e Ellison,

1971; Holmquist, 1975a; Pimpinelli et al., 1975; Gatti et al., 1975; Lee e Collins, 1977; Wheeler e Altenburg, 1977) e em to das as espécies analisadas, alguns dos segmentos heterocromáticos banda C positivos, apresentam fluorescência não uniforme com o composto Hoechst ou com a quinacrina.

Em D. melanogaster e D. simulans, o padrão de fluorescência após tratamento com quinacrina foi estudado em cromossomos politênicos e mitóticos e diferenças foram encontradas (Ellison e Bar, 1971).

Em D. nasutoides, verificou-se que o padrão de bandas C e Q de um grande cromossomo mitótico heterocromático difere, sendo que, as bandas C negativas, apresentam-se Q positivas (Lee e Collins, 1977) e H positivas (Hoechst 33258) (Wheeler e Altenburg, 1977), embora os centrômeros dos outros cromossomos metacêntricos que eram banda C positivos, fossem também Q e H positivos. Baseando-se nas diferentes res postas aos métodos para obtenção de bandas, Wheeler e Altenburg, descrevem quatro classes de heterocromatina, três das quais presentes no cromossomo considerado heterocromático (bandas C^+H^+ ; C^+H^- ; C^-H^+) e um tipo para os outros cromossomos (que são sempre C^+H^+ ou C^-H^-). Os autores sugerem que as várias classes de heterocromatina encontradas correspondam à localização cromossômica de diferentes DNAs satélites.

Por outro lado, em D. nasuta, com exceção do cromossomo Y, todos os segmentos heterocromáticos fluorescem igualmente com o composto Hoechst e com a quinacrina, sugerindo uma certa homogeneidade com respeito a composição de bases do DNA dessas regiões (Lakhotia e Kumar, 1979), de modo

semelhante, ao que foi encontrado na heterocromatina centromérica dos cromossomos do vegetal Lachenalia tricolor (Mogford, 1978).

Quando o composto Hoechst 33258 é adicionado ao meio de cultura de gânglios cerebrais de D. melanogaster, tem-se verificado que as heterocromatinas desses cromossomos se comportam diferentemente. Puderam, assim, ser divididas em 3 tipos, em função do grau de alongamento que estas apresentam após o tratamento: um tipo insensível ao composto; um de descondensação intermediária e outro drasticamente descondensado (Pimpinelli et al., 1975). Para esses pesquisadores as áreas sensíveis ao tratamento com o composto Hoechst, contêm DNA rico em AT. Em favor disto, citam o caso da heterocromatina centromérica de camundongo que descondensa pelo composto Hoechst (Hilwig e Groop, 1973), heterocromatina esta onde sabidamente se localiza DNA satélite rico em AT (Jones, 1970; Pardue e Gall, 1970). Discutem também o fato de que todas as áreas heterocromáticas dos cromossomos de Drosophila que descondensam pelo tratamento com o composto Hoechst, correspondem às áreas que fluorescem brilhantemente após coloração com quinacrina (Adkisson et al., 1971; Dolfini, 1974; Vosa, 1970) ou mesmo com o composto Hoechst 33258 (Holmquist, 1975a), ambos usados para evidenciação de DNAs ricos em AT (Ellison e Barr, 1972; Weisblum e Haenssler, 1974; Holmquist, 1975a; Comings, 1975; Comings et al., 1975). Com base nessas evidências, Pimpinelli et al. (1975) consideram que o grau de descondensação dessas regiões heterocromáticas depende da relativa concentração de AT nas mesmas. Resultados comparativos da resposta à descon -

densação e fluorescência por Hoechst e quinacrina, permitiram dividir a heterocromatina constitutiva de Drosophila em vários subtipos citológicos. Foram estudadas seis espécies de Drosophila (melanogaster, simulans, virilis, texana, hydei e ezoana), constatando-se a presença de 14 subtipos e dentre esses, de 4 a 7 estavam simultaneamente presentes no mesmo genoma (Gatti et al., 1976).

De posse dos dados da literatura acima relatados, pareceu-nos de interesse determinar se os diferentes tipos heterocromáticos de Drosophila nebulosa relatados por Pavan (1946a) estariam associados a diferenças em composição química detectáveis pelos métodos de banda C e G e/ou ocorrência ou não de descompactação (ou falha de compactação) com a ação do composto Hoechst 33258. Nesse respeito, seriam os diferentes cromossomos mitóticos comparados entre si e com os politênicos. Da mesma forma, os dados levantados para D. nebulosa poderiam ser tentativamente comparados aos de outras espécies do mesmo gênero.

Além disso, caberia uma outra questão. Se admitirmos que o cromocentro em D. nebulosa é grandemente constituído pela heterocromatina do cromossomo II e que esta heterocromatina sofre replicação durante o processo de politenização (o que é altamente sugestivo de uma β -heterocromatina), teria ela características citoquímicas semelhantes à eucromatina, ou não? Sabe-se que no caso de Drosophila melanogaster há semelhança da heterocromatina β com bandas eucromáticas, em termos de ocorrência de DNA repetitivo replicador. Estas semelhanças são detectáveis por hibridização in situ associa-

da a ensaios bioquímicos (Gall et al., 1971) e também através de perfis espectrais de Feulgen (Mello e Recco, 1980). Os espectros de Feulgen para tipos heterocromáticos e eucromáticos de outro díptero, Rhynchosciara americana, no entanto, apresentam notáveis diferenças entre si (Mello, 1980a). Estas diferenças dizem respeito ao grau de proeminência de um pico secundário ou ombro que ocorre ao redor de $\lambda = 520-530\text{nm}$, quando o material em estudo é totalmente depurinado (Mello, 1978b e 1980a). Tal ombro surgiria pela ocorrência de maior frequência de moléculas Schiff di-substituídas com aldeídos vicinais do ácido apurínico de acordo com a composição do substrato corado (Mello, 1978b e 1980a). A análise do perfil de absorção de Feulgen em D. nebulosa seria, portanto, um dado importante a se levantar com relação à heterocromatina predominante do cromocentro.

Também, com relação a esta, o estudo de características de basofilia poderia informar se diferenças drásticas em complexos DNP aí ocorrem, quando em comparação com dados da eucromatina.

A basofilia nuclear detectada com soluções de azul de toluidina a pH 4,0 e 3,4 admite-se que seja devida à presença de ácidos nucleicos, pela ligação eletrostática de moléculas desse corante aos grupos fosfatos do DNA ou RNA, grupos esses não ligados a proteína (Lison e Mutsaars, 1950; Lison, 1955 e 1960; Davison e Butler, 1956). A basofilia metacromática, no caso do azul de toluidina, é aquela verificada quando há deslocamento do pico principal da curva de absorção espectral correspondente ao cromóforo ($\lambda = 630\text{nm}$) para um λ

mais curto, como 546nm (metacromasia γ) ou ao redor de 590nm (metacromasia β) e um conseqüente hipocromismo do pico em $\lambda = 630\text{nm}$ (Bergeron e Singer, 1958; Toepfer, 1970). Este fenômeno de metacromasia acha-se intimamente ligado ao empilhamento de moléculas do corante bem como à proximidade entre elas (Davison e Butler, 1956; Bergeron e Singer, 1958; Toepfer, 1970). Quanto mais próximas entre si e mais bem empilhadas estiverem as moléculas de corante, mais o pico de absorção se deslocará para λ mais curtos. Se as moléculas de azul de toluidina se tornarem muito distantes umas das outras, o máximo de absorção se deslocará para λ mais longos.

Um exemplo do papel dos grupos fosfatos do DNA em achados de basofilia, pôde ser mostrado na espermatogênese de rato e na do gafanhoto Staurorhectus longicornis (Lison, 1955; Mello e Vidal, 1977; Vidal et al., 1978). Nestes casos há um bloqueio maior dos grupos do DNA por proteínas ricas em arginina, que substituem as histonas somáticas durante a espermiogênese. Como conseqüência, há uma alteração sensível nos padrões de basofilia nuclear detectáveis após coloração com corantes tiazínicos. Nas fases que precedem a substituição do tipo de proteína básica a cromatina se cora em violeta (metacromasia γ), enquanto a partir dessa substituição a cromatina aparece esverdeada (pico de absorção ao redor de $\lambda = 630\text{nm}$). O conteúdo de DNA, no entanto, permanece constante (Lison, 1955; Mello e Vidal, 1977). Já, nas abelhas, os espermatozoides apresentam uma proteína nuclear rica em lisina, complexada ao DNA, permitindo que muitos fosfatos livres do DNA permaneçam disponíveis para se ligarem ao azul de toluidi

na e, portanto, os padrões de basofilia nuclear não se apresentam alterados nestes espermatozoides (Mello e Vidal, 1973).

Em cromossomos politênicos de Rhynchosciara americana, após coloração com azul de toluidina a pH 4,0, medidas citofotométricas da basofilia têm revelado que diferentes regiões de um mesmo cromossomo, na mesma fase, podem apresentar variações do pico de absorção de sua curva espectral (Vidal, 1975). Isto é um reflexo da diferença em termos de disponibilidade dos grupos fosfatos hábeis em ligarem moléculas do corante, mostrando, indiretamente, que diferentes tipos de complexos DNP e RNP aí ocorrem. A zona 8/A, medida em 2 áreas diferentes, mostrou 2 picos nas curvas correspondentes à sua parte mais compactada ($\lambda = 550\text{nm}$ e 600nm) e à menos compactada ($\lambda = 560\text{nm}$ e 600nm); a região heterocromática 11/A exibiu um pico a $\lambda = 580\text{nm}$ e a região 9/A ("zona de ninguém") mostrou dois máximos de absorção (a $\lambda = 570\text{nm}$ e $\lambda = 590\text{nm}$). Esses dados foram obtidos em larvas com idade entre 20 e 25 dias. A localização de tais picos também sofre deslocamento em função do desenvolvimento larval. Deve-se salientar que cromossomos politênicos tratados por clupeína (= protamina) praticamente não mais se coram com soluções de azul de toluidina a pH 3,4 ou 4,0, exceto em regiões onde há acúmulo de RNA, pois essa proteína se liga aos fosfatos livres do DNA, bloqueando-os (Vidal, 1979).

No hemíptero Triatoma infestans, a heterocromatina constitutiva dos cromocentros, em células de tubos de Malpighi, difere em padrão de basofilia da eucromatina respectiva, após remoção de RNA (Mello, 1976 e 1980b). Tal fenômeno

foi considerado como sendo devido a diferente tipo de interação DNA-proteína possivelmente associado a diferente estado de empacotamento dos filamentos cromatínicos, com possivelmente uma participação mais notória de H1 na heterocromatina (Mello, 1980b).

Os objetivos do presente trabalho são, portanto, os seguintes:

1. Caracterização da resposta às reações citoquímicas de desnaturação-reassociação (banda C), banda G e ação do composto Hoechst 33258 nas regiões heterocromáticas dos diferentes cromossomos mitóticos de cérebro e politênicos de glândula salivar de D. nebulosa. Assim, seriam os cromossomos mitóticos comparados entre si e aos politênicos. Uma posterior comparação com dados existentes para outras espécies do gênero Drosophila seria tentada.
2. Comparação das propriedades citoquímicas de basofilia e espectros de Feulgen da heterocromatina do cromocentro (cromossomo II, especialmente) com relação às da eucromatina, em glândulas salivares.

A análise, de caráter microespectrofotométrico referente ao item 2, não poderia ser estendida aos cromossomos mitóticos, devido ao tamanho extremamente reduzido dos mesmos e às dificuldades técnicas instrumentais (as menores áreas de mensuração ao microespectrofotômetro são muito maiores que a largura dos cromossomos).

II. MATERIAL

Foram utilizados gânglios cerebrais e glândulas salivares de larvas de 3º estadio (classificação baseada em Bodenstein, 1950) de ambos os sexos de Drosophila nebulosa, pertencente ao grupo Willistoni do subgênero Sophophora. A linhagem utilizada neste trabalho é procedente da Fazenda Jandaia, próxima à cidade de São José do Rio Preto, São Paulo. Sua área de distribuição se estende do sul dos Estados Unidos da América ao sul do Brasil.

No desenvolvimento deste trabalho foi empregado o meio de cultura à base de banana-agar (utilizado rotineiramente no Laboratório de Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto), com a seguinte composição:

Água	1000ml
Agar	24g
Banana	800g
Fermento Fleischmann	25g
Nipagin (solução alcoólica a 10%)	8ml
Ácido propiônico	2ml
Calda de açúcar (500g de açúcar em 250ml de H ₂ O)	20ml

O estoque foi mantido em garrafas de um quarto de litro contendo cerca de 2cm de meio de cultura e uma fita quádrupla de guardanapo de papel medindo 4 x 17cm aproximadamente, pressionada levemente nos bordos do meio de cultura,

aumentando a superfície de pouso das moscas e principalmente, servindo de substrato para a pupação das larvas. Toda a população de moscas foi mantida à temperatura ambiente.

Fermento Fleischmann em suspensão foi acrescentado aos vidros quando surgiam as larvas, para melhor desenvolvimento das mesmas.

A dissecação das larvas foi acompanhada com lupa estereoscópica Zeiss e para observação e fotografias dos cromossomos foi utilizado um fotomicroscópio Zeiss.

III. MÉTODOS

III.1. Para bandas C e G

Os gânglios cerebrais e as glândulas salivares foram fixados em ácido acético a 45% por 1 minuto aproximadamente. Após o esmagamento do material nessa solução, a lâmina foi removida por congelamento do material em nitrogênio líquido. A seguir, quando as lâminas atingiram a temperatura ambiente, foram imediatamente imersas em etanol a 70% por 2 minutos e secadas ao ar.

Foi utilizado o método de desnaturação-reassociação (banda C) de Arrighi-Hsu (1971), conforme o original e com algumas modificações.

A desnaturação foi feita inicialmente com NaOH (Carlo Erba) 0,07N (Arrighi e Hsu, 1971), mas tal concentra

ção foi modificada, já que altera extremamente a morfologia cromossômica. Usou-se então, NaOH 0,01N (Deaven e Petersen, 1973) por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas rapidamente, por 2 vezes em etanol a 70%, 1 minuto em etanol a 80% e a 95% e secadas ao ar. Procedeu-se à reassociação em solução 2SSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato de sódio 0,03M) durante uma noite (12 a 14 horas) em banho-maria, sendo que, parte dos preparados foi mantida à temperatura constante de 60°C e parte à 75°C (Arrighi e Hsu, 1971). A seguir, as preparações foram lavadas 2 vezes em etanol a 70% rapidamente, secadas ao ar, coradas com uma solução Giemsa (Merck) a pH 6,8-7,0 durante 30 minutos (Schnedl, 1973), lavadas rapidamente em água destilada, secadas ao ar, diafanizadas em xilol por 10 minutos e montadas em bálsamo do Canadá ($n_D = 1,54$) (Método I).

As variações metodológicas utilizadas no presente trabalho foram as seguintes:

a. Desnaturação com uma solução NaOH 0,0014N por 15 segundos à temperatura ambiente (Gagné et al., 1971; Hsu, 1971) e renaturação às temperaturas de 65°C e 75°C, 12 a 14 horas (Método II).

b. Desnaturação com uma solução saturada de Ba(OH)₂ (May & Baker Ltda) por 90 segundos à 50°C (Sumner, 1972) e reassociação em 2SSC por 4 horas e 30 minutos às temperaturas de 60°C e 75°C (Método III).

c. Foi também utilizado o método de desnaturação-reassociação de Bedo (1975), modificado por Hägele (1977), como se segue: o material foi tratado por isopropanol absolu-

to a pH 6,5 por 7 dias à -20°C ("RB.Method") (Método IV) e por 50 dias à mesma temperatura ("C Method") (Método V). Após este período, o procedimento para a desnaturação-reassociação foi o mesmo para ambos os métodos: depois de secadas ao ar, as lâminas foram imediatamente tratadas com uma solução saturada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a pH 13,0 por 15 minutos à temperatura ambiente e lavadas 3 vezes em água destilada. A reassociação foi feita em 2SSC a pH 7,0 às temperaturas de 60°C e 75°C por uma hora e trinta minutos. Após serem lavadas 3 vezes em água destilada, secadas ao ar, as preparações foram coradas com uma solução Giemsa (Merck) a 1% em tampão fosfato 0,025 M a pH 7,0, por 10 minutos, secadas ao ar, diafanizadas em xilol por 10 minutos e montadas em bálsamo do Canadá. Segundo Hägele (1977) o tempo de tratamento em isopropanol é de 2 a 10 dias ("RB Method") e de 40 a 60 dias ("C Method"). Para o presente trabalho utilizamos tempos intermediários aos sugeridos, conforme descrito acima.

Além dos métodos para banda C, também foi utilizado tratamento com tripsina para obtenção de banda G em algumas preparações. Os preparados foram tratados com uma solução de tripsina a 1% (1:250 DIFCO) em NaCl a 0,9% por 90 segundos a 10°C , lavados em água deionizada, secados ao ar, diafanizados em xilol por 10 minutos e montados em bálsamo do Canadá (Gallimore e Richardson, 1973) (Método VI)

III.2. Ação do composto Hoechst 33258 sobre as áreas hetero - cromáticas

Para o estudo de descompactação da heterocromatina constitutiva em presença do composto Hoechst 33258 usou-se a técnica de Pimpinelli e colaboradores (1975). Foram utilizados gânglios cerebrais e glândulas salivares, os quais foram removidos em solução Ringer para insetos (7,5 g de NaCl + 0,35 g de KCl + 0,21 g de CaCl₂, diluídos em 1 litro de água destilada). Em seguida foram colocados em uma solução aquosa contendo NaCl (0,7%), soro fetal bovino (20%) e composto Hoechst 33258 (40µg/ml) por 8 horas. Após 6 horas de incubação, colchicina (Laboratórios Primã S/A) foi adicionada à cultura, em uma concentração final de 10⁻⁴M. Após completarem-se 8 horas, os gânglios e as glândulas foram fixados em ácido acético a 45% por 1 minuto e submetidos a esmagamento. A lamínula foi removida após congelamento em nitrogênio líquido. Como controle utilizamos o mesmo procedimento, excluindo-se o composto Hoechst 33258 da solução incubadora. Os preparados foram submetidos ao processo de denaturação-renaturação por Ba(OH)₂ conforme já descrito anteriormente (Método III), a fim de se visualizar o comportamento das áreas consideradas de heterocromatina constitutiva frente ao composto Hoechst.

III.3. Basofilia cromossômica

O material foi preparado conforme o item III.1. Parte das preparações foi submetida a um tratamento

com uma solução de RNase (Sigma) a 0,05% a 37°C em câmara úmida por 60 minutos. A seguir, o material tratado previamente com RNase bem como aquele não tratado foram corados com uma solução de azul de toluidina (Merck) a 0,025% em tampão MacIlvaine pH 4,0 (Lison, 1960). Antes de se efetuar a coloração, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em água destilada e secadas levemente com papel Yes. Após 15 minutos de coloração, o material foi rapidamente lavado em água destilada (5 s), secado ao ar, diafanizado em xilol por 10 minutos e montado em bálamo do Canadá.

As medidas fotométricas de absorção foram realizadas em um citofotômetro Zeiss (fotomultiplicador EMI 6256 e fotômetro 01), usando-se objetiva Neofluar 100/1,25, optovar 2, diâmetro do diafragma de campo = 0,2 mm, diâmetro do diafragma de mensuração = 0,4 mm, ocular Kpl W MPM, condensador LD-Epiplan 16/0,30 e régua monocromadora Schott. A área do espécime medido foi igual a 3,14 μm^2 .

Foram construídas curvas espectrais de absorção para regiões heterocromáticas (cromocentro) e eucromáticas (bandas) dos cromossomos politênicos, variando-se os comprimentos de onda de 500 a 640 nm. Foram também calculados os índices metacromáticos ($E_{\lambda = 555\text{nm}}/E_{\lambda = 625\text{nm}}$, E = absorbância) para as regiões mencionadas.

Para se confirmar a participação de RNA na basofilia cromossômica, algumas lâminas foram tratadas antes da coloração (nesse caso com azul de toluidina a pH 3,4) com uma solução saturada de sulfato de clupeína (Fluka A. G.), segundo método de Vidal (1979). Esse tratamento teve a duração de 0,5, 1 e 2 horas, à temperatura ambiente. A se-

guir os preparados foram lavados em água destilada, secados ao ar, diafanizados em xilol e montados em bálamo do Canadá.

III. 4. Espectros de absorção de Feulgen

O esmagamento, fixação do material e o método de remoção das lâminulas foram idênticos aos descritos no tópico III.1.. O material foi hidrolizado em HCl 0,1M ^{segundo} diversos períodos (4, 8, 12, 14 e 20 horas) a 37°C. A seguir as lâminas foram lavadas várias vezes em H₂O e tratadas com o reativo de Schiff por 40 minutos. Logo após, o material foi submetido a 3 banhos de 5 minutos cada em água sulfurosa (1 parte de metabissulfito de sódio a 10%, 1 parte de HCl 1N e 18 partes de água) e lavado em água destilada, por 2 minutos, várias vezes. Em seguida, o material foi desidratado em uma série de álcoois, diafanizado em xilol por 10 minutos e montado em bálamo do Canadá.

A análise dos preparados foi realizada com o mesmo equipamento mencionado no tópico III.3.. As condições operacionais foram as seguintes: objetiva Pol/Neofluar 63/0,90, optovar 2, diâmetro do diafragma de medida = 0,16mm, diâmetro do diafragma de campo = 0,2 mm, condensador LD Epiplan 16/0,30. A área do espécime medido foi, portanto, de 1,27µm². Os comprimentos de onda, de 480 a 610 nm, foram obtidos com régua monocromadora de fabricação Schott. Foram determinadas curvas espectrais de absorção para a região eucromática 78 do cromossomo III (classificação baseada na representação esquemática de Pavan, 1946b) de larvas de machos e fêmeas.

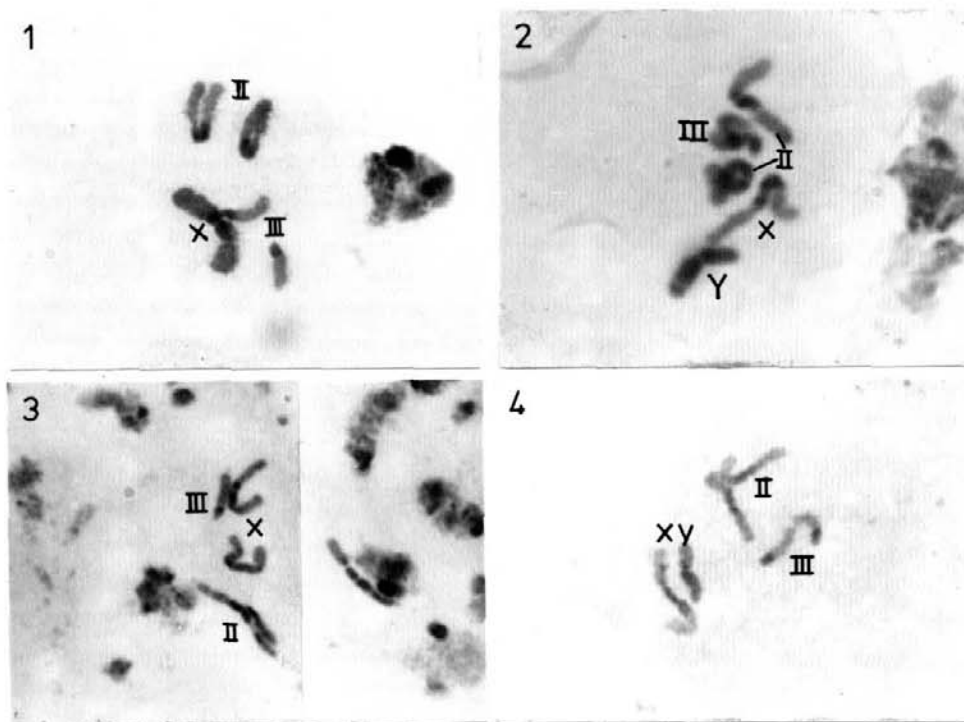
IV. RESULTADOS

IV.1. Bandas C e G

IV.1.1. Cromossomos mitóticos

Nos preparados tratados com NaOH 0,01N e renaturados em 2SSC a 65°C (Método I) observou-se que as regiões heterocromáticas centroméricas dos cromossomos X, II, III e Y, respondem de maneira semelhante entre si, corando-se levemente mais forte do que as porções cromossômicas restantes (Figs. 1 e 2). A intensidade de coloração do cromossomo Y é semelhante à observada nas regiões centroméricas heterocromáticas dos demais cromossomos exceto em sua região centromérica e próximo a um dos telômeros, onde aparece uma região mais clara (Fig. 2). A região heterocromática do cromossomo X bem como a do II, assemelham-se entre si principalmente quanto à intensidade de coloração (Fig. 1). Resposta semelhante foi geralmente obtida quando a renaturação foi feita a 75°C (Figs. 3 e 4). Em alguns destes preparados obtivemos uma certa variabilidade na intensidade de coloração, as regiões centroméricas de todos os cromossomos aparecendo não muito coradas, devido talvez a diferenças no grau de compactação dos cromossomos.

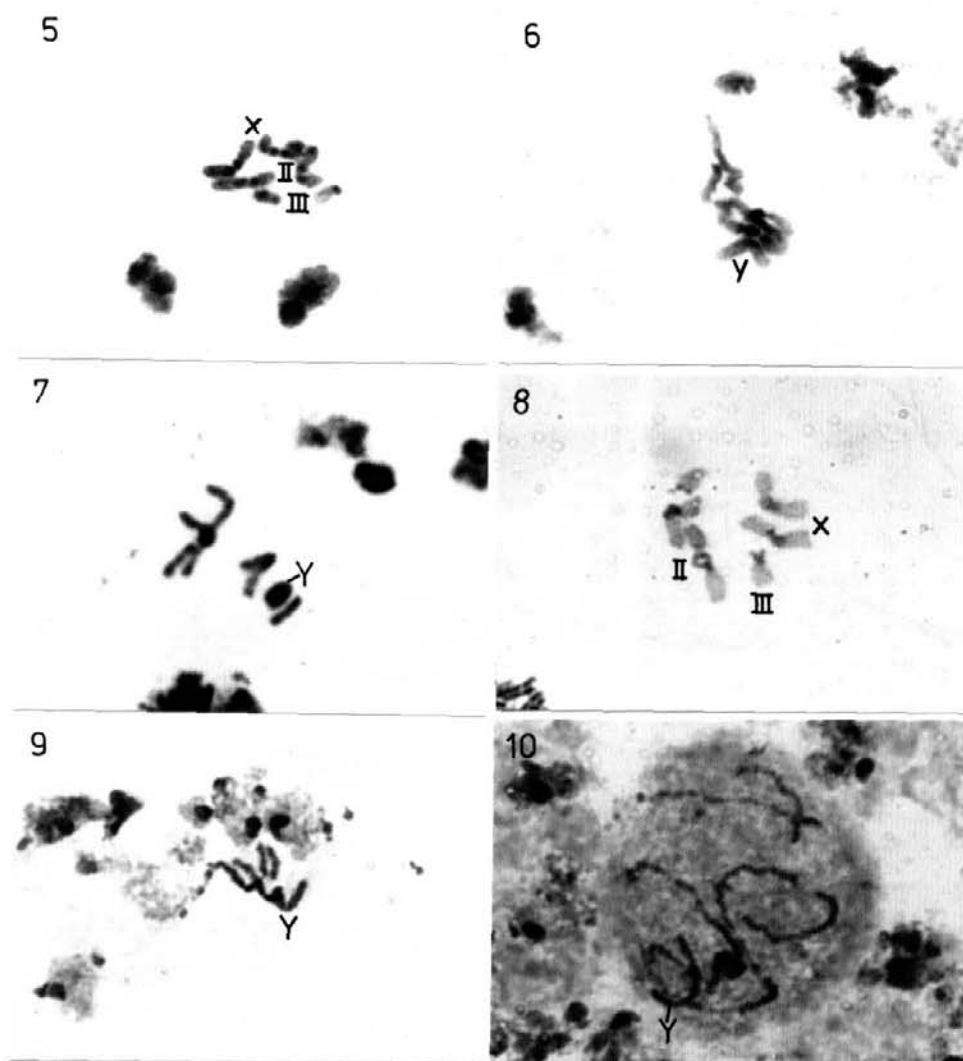
Nos preparados submetidos ao Método II, com a renaturação efetuada à temperatura de 65°C, (Figs. 5 a 7), as regiões heterocromáticas apresentam-se com coloração bem mais intensa do que as regiões eucromáticas, mas semelhantes entre



FIGURAS 1 e 2. Cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais de larvas de *D. nebulosa*, submetidos ao Método I (banda C; renaturação a 65°C). Fig.1: fêmea (1900x); fig.2: macho (2370x).

FIGURAS 3 e 4. Idem, renaturação a 75°C. Fig.3:fêmea (1900x); fig.4: macho (1900x).

Regiões centroméricas com padrão semelhante entre si. Cromossomo Y exibe algumas bandas ao longo do seu comprimento.



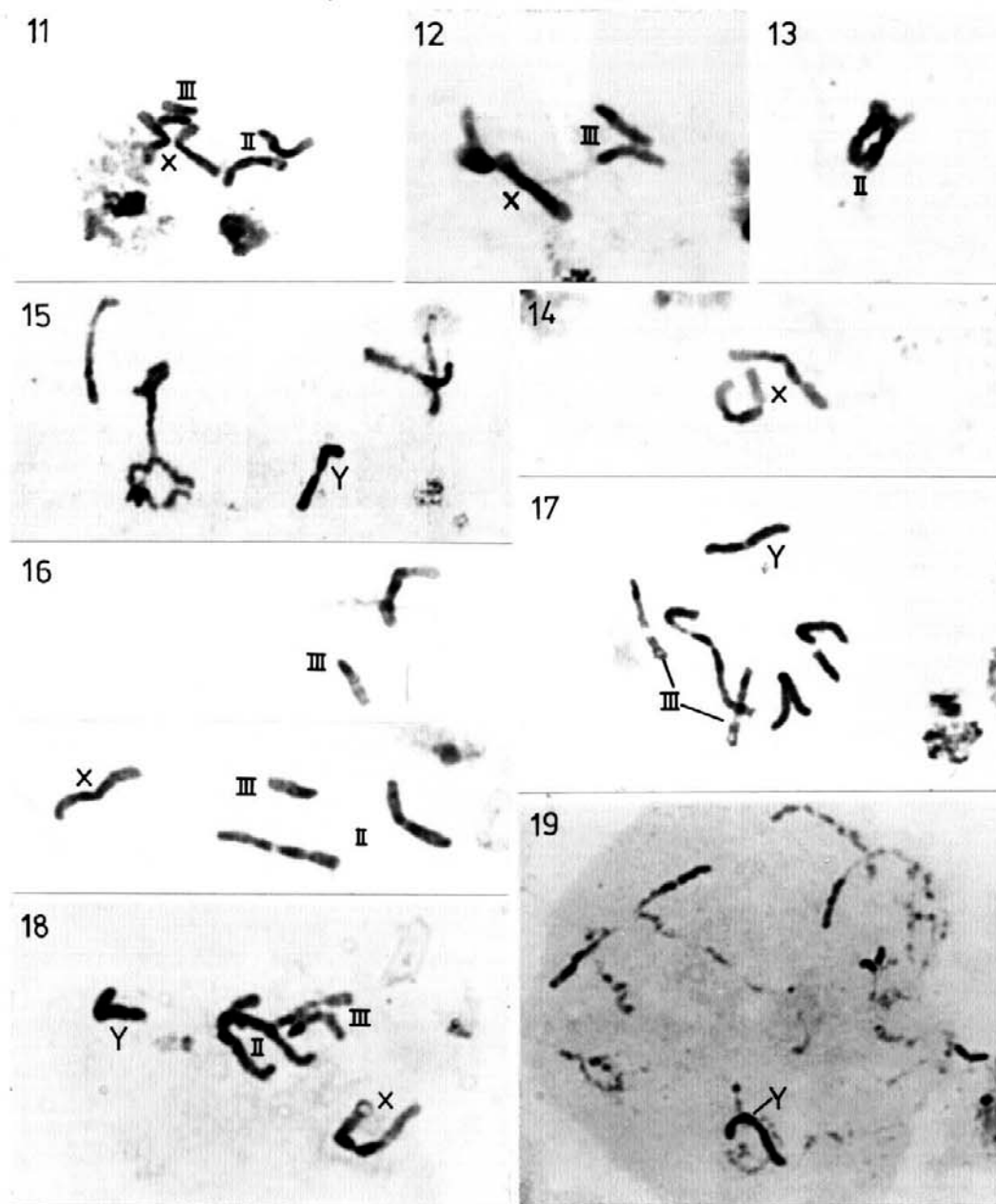
FIGURAS 5 a 7. Cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais de larvas de *D. nebulosa*, submetidos ao Método II (banda C; renaturação a 65°C). Fig.5:fêmea (1900x); figs.6 e 7: machos (6:1900x; 7:2400x).

FIGURAS 8 a 10. Idem, renaturação a 75°C. Fig.8:fêmea (1900x); figs.9 e 10: machos (1900x).

Regiões centroméricas com padrão semelhante entre si. Na fig.6, o cromossomo Y aparece discretamente corado e nas figs. 7, 9 e 10, intensamente corados. Cromossomos mais distendidos apresentam maior número de bandas (fig 10).

si. Nos preparados de machos (Figs. 6 a 7) nem sempre encontramos a mesma resposta para o cromossomo Y, o qual se apresentou discretamente corado em algumas placas metafásicas (Fig. 6) e intensamente corado em outras (Fig. 7). À temperatura de renaturação de 75°C, coram-se em geral mais distintamente as regiões heterocromáticas centroméricas dos cromossomos X, II e III e os braços do Y (Figs. 8 e 9), mas em alguns casos, onde os cromossomos se encontravam mais distendidos, a diferença de coloração não foi assim tão evidente e o número de bandas ao longo dos braços cromossômicos foi maior (Fig. 10).

Nos preparados tratados segundo o Método III e renaturados a 65°C e 75°C, a resposta foi semelhante à obtida com os dois métodos citados anteriormente, embora as regiões centroméricas heterocromáticas dos cromossomos X, II e III e os braços do cromossomo Y tenham^{se} corado mais nitidamente, quando comparadas às regiões eucromáticas (Figs. 11 a 19). Verificou-se também com este método que podem aparecer bandas ao longo de regiões eucromáticas dos braços cromossômicos, inclusive no cromossomo III (Figs. 11, 16 a 19) e no Y (Fig. 18). Mesmo em cromossomos bastante distendidos (em fases iniciais de divisão) (Fig. 19), as regiões heterocromáticas destacam-se pela coloração com giemsa, podendo, às vezes aparecerem subdivididas em bandas (Fig. 19). O cromossomo Y, quando submetido à renaturação a 65°C apresentou-se intensamente corado (Fig. 15). O mesmo, no entanto, não aconteceu na maioria dos casos para situação de renaturação à 75°C (Fig. 17), embora, em raras preparações tenha se notado o Y tão intensamente corado quanto as regiões centroméricas dos outros cromossomos (Figs. 18 e 19).



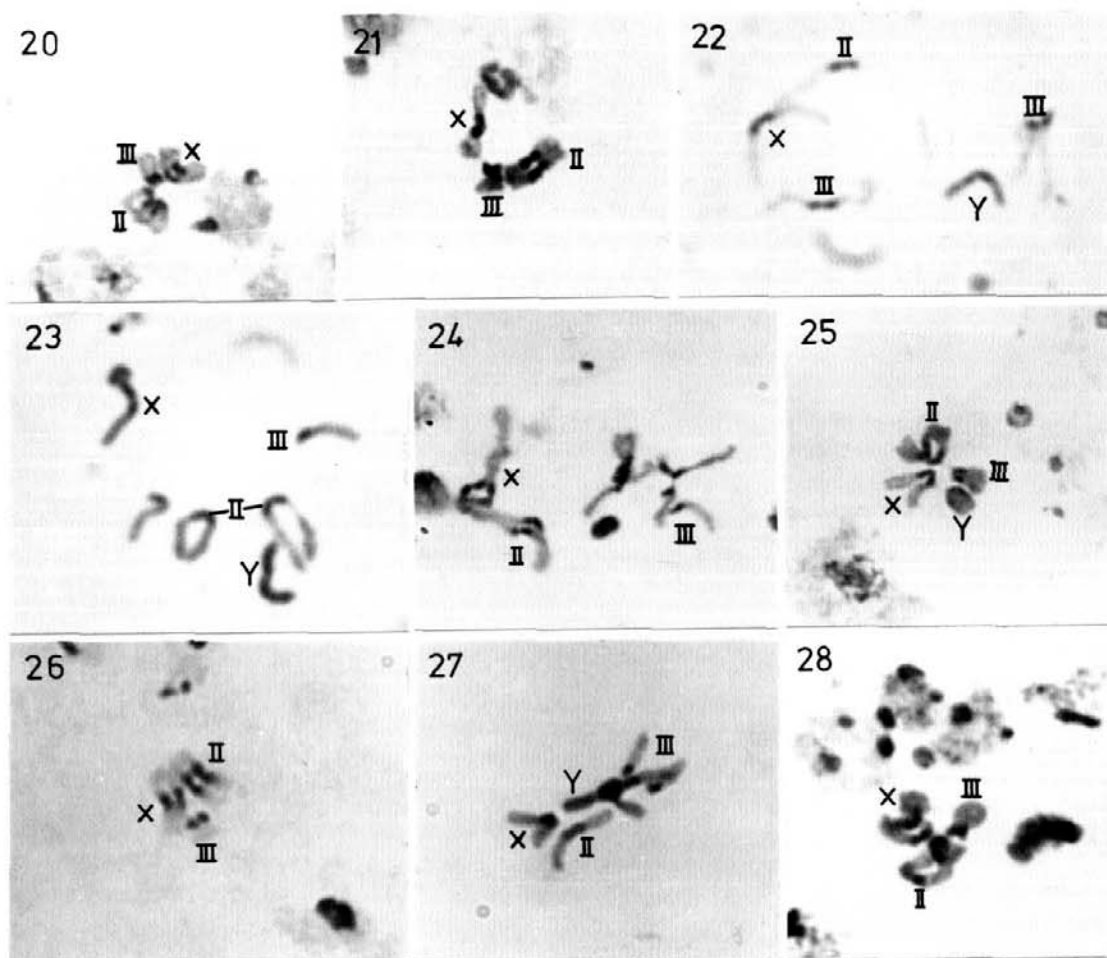
FIGURAS 11 a 15. Cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais de larvas de *D. nebulosa*, submetidos ao Método III (banda C; renaturação a 65°C). Figs. 11 a 14: fêmeas (11: 1900x; 12, 13 e 14: 2460x); fig. 15: macho (1900x).

FIGURAS 16 a 19. Idem, renaturação a 75°C. Fig.16: fêmea 2370x); figs.17 a 19: machos (17 e 19: 1900x; 18: 2370x). Regiões centroméricas com padrão semelhante entre si. Cromossomo Y mostrou-se intensamente corado em alguns casos (figs.15 e 19) e pouco corado em outros (fig. 17); observou-se também presença de bandas ao longo do seu comprimento (fig. 18).

Os cromossomos mitóticos de D. nebulosa quando tratados segundo os métodos IV e V, não mostraram a diferenciação em cor, de regiões coradas em azul e outras em violeta, (Método RB) descritas por Hägele (1977). Também não foi obtida a diferenciação por intensidade de coloração, de regiões palidamente e fortemente coradas em azul (Método C), relatada pelo mesmo autor. No material de D. nebulosa, com o tempo de 7 dias de pré-tratamento com isopropanol, (Método IV), as regiões heterocromáticas centroméricas dos cromossomos X, II e III, apresentaram-se coradas em violeta-róseo e mais intensamente do que o restante dos cromossomos, tanto para renaturação à 65°C quanto a 75°C (Fig. 20 a 25). O cromossomo Y apresentou coloração semelhante à das regiões centroméricas heterocromáticas, à temperatura de renaturação de 65°C (Figs. 22 e 23), mas à temperatura de 75°C apresentou-se palidamente corado, como a eucromatina, por exemplo, do cromossomo III (Fig. 25).

Os resultados obtidos com o Método V, usando-se renaturação à temperatura de 65°C e 75°C foram semelhantes aos observados com o Método IV (Figs. 26 a 29).

Nas figs. 29 a 33 são mostrados alguns cromossomos mitóticos tratados pelo Método VI (bandeado G). Para um mesmo tratamento, houve diferente resposta das placas metafásicas ou dos cromossomos prometafásicos, à tripsina. Às vezes as regiões heterocromáticas apareceram mais coradas do que as eucromáticas, embora não com a intensidade demonstrada pelos métodos de bandeado C (Figs. 29, 32 e 33). Outras vezes, os cromossomos mostraram uma certa homogeneidade de coloração ao longo de seu eixo (Fig. 30). Houve mesmo casos em que justa -



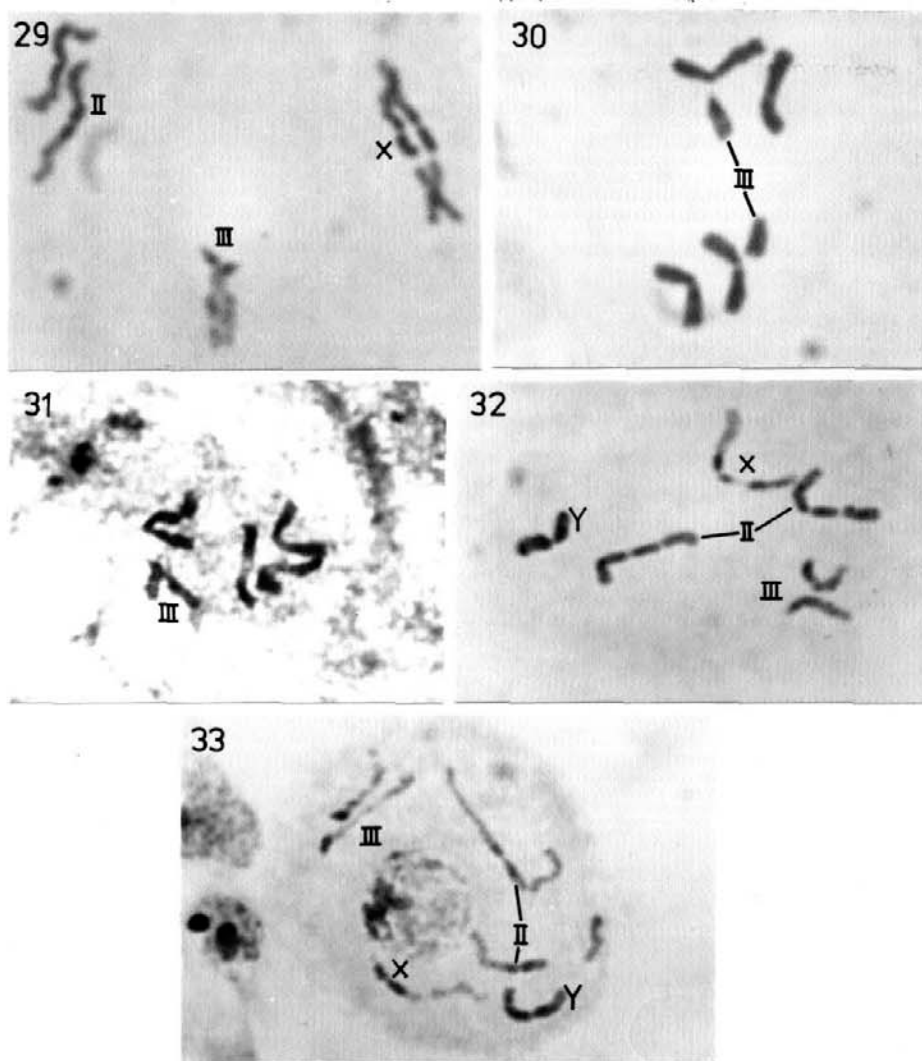
FIGURAS 20 a 23. Cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais de larvas de *D. nebulosa*, submetidos ao Método IV (banda C; renaturação a 65°C). Figs.20 e 21: fêmeas (2400x); figs. 22 e 23: machos (4600x).

FIGURAS 24 e 25. Idem, renaturação a 75°C. Fig.24: fêmea (1900x); fig.25: macho (1900x).

FIGURAS 26 e 27. Cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais de larvas de *D. nebulosa*, submetidos ao Método V (banda C; renaturação a 65°C). Fig.26: fêmea (2400x); fig.27: macho (2400x).

FIGURA 28. Idem, renaturação a 75°C. Fêmea (2400x).

Regiões centroméricas com padrão semelhante entre si após cada método. Cromossomo Y com resposta homogênea ao longo do seu comprimento. Na fig.25 o cromossomo Y aparece palidamente corado.



FIGURAS 29 a 33. Cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais de larvas de *D. nebulosa*, submetidos ao tratamento para obtenção de bandeado G (Método VI). Figs. 29 a 31: fêmeas (29 e 30: 4600x; 31: 2400x); figs. 32 e 33: machos (4600x).

Regiões centroméricas com padrão semelhante entre si. Cromossomo Y exhibe algumas bandas ao longo do seu comprimento. Na fig. 31, as áreas heterocromáticas aparecem menos coradas que as eucromáticas.

mente as áreas heterocromáticas apareceram pouco coradas (Fig. 31). No caso do cromossomo Y, as suas regiões mais coradas situam-se vizinhas à região centromérica (Figs. 32 e 33). As regiões heterocromáticas dos cromossomos II, III e X mostraram igual comportamento, seja como bandas negativas (Fig. 31) ou bandas positivas (Fig. 33).

IV.1.2. Cromossomos politênicos

Não foram observadas diferenças na resposta aos métodos de banda C utilizados quando se comparou o cromocentro com as regiões de bandas (eucromatina) dos cromossomos politênicos (Figs. 34 a 39).

Nos preparados submetidos ao Método I, com reassociação a 65°C (Fig. 34) e a 75°C (Fig. 35) não se observou diferença na intensidade de coloração entre as regiões, embora este procedimento altere sensivelmente a morfologia cromossômica, devido talvez a remoção de material (observar anel mais escuro circundando o cromocentro), que parece ser mais acentuada quando a renaturação é feita a 75°C (Fig. 35).

Quanto aos métodos II e III, embora a resposta em intensidade de coloração tenha sido semelhante à do método I, a morfologia cromossômica foi melhor preservada (Figs. 36 e 37).

Com relação aos métodos IV e V não se observou também a diferença de coloração esperada para esses métodos (Hägele, 1977) (Figs. 38 e 39). Para se demonstrar a eficiência desses métodos, utilizamos como controle núcleos de células de tubos de Malpighi de Triatoma infestans, cuja heterocromatina constitutiva corou-se em azul e eucromatina em vio-

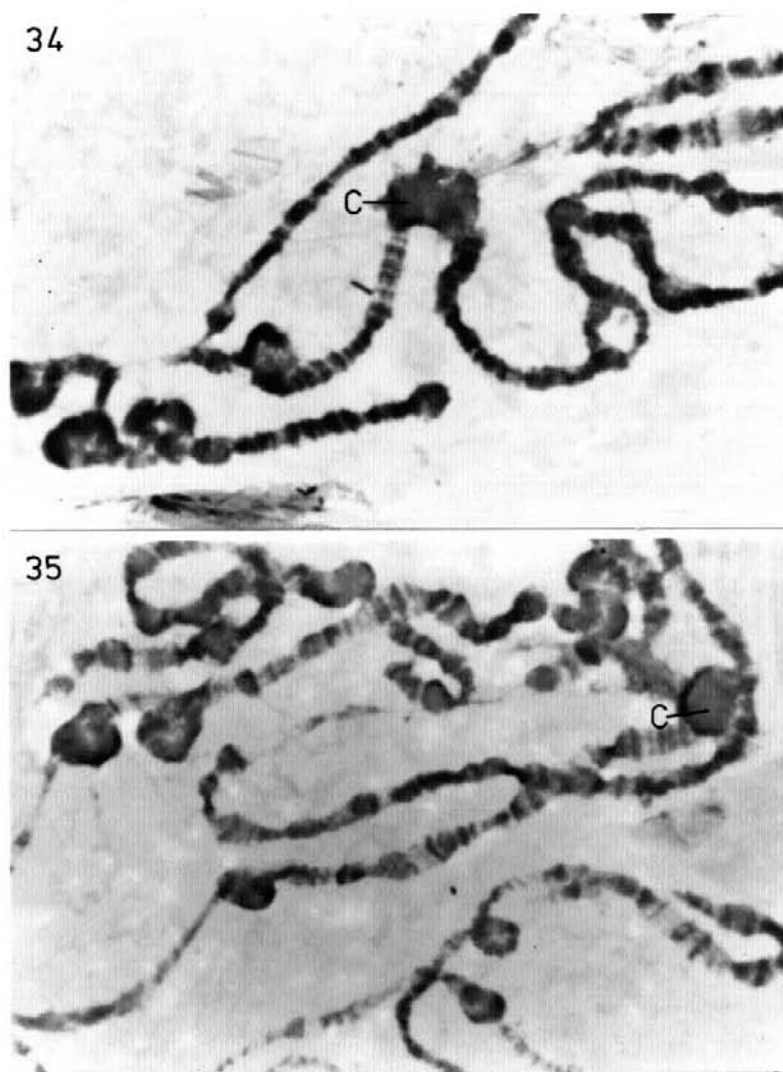
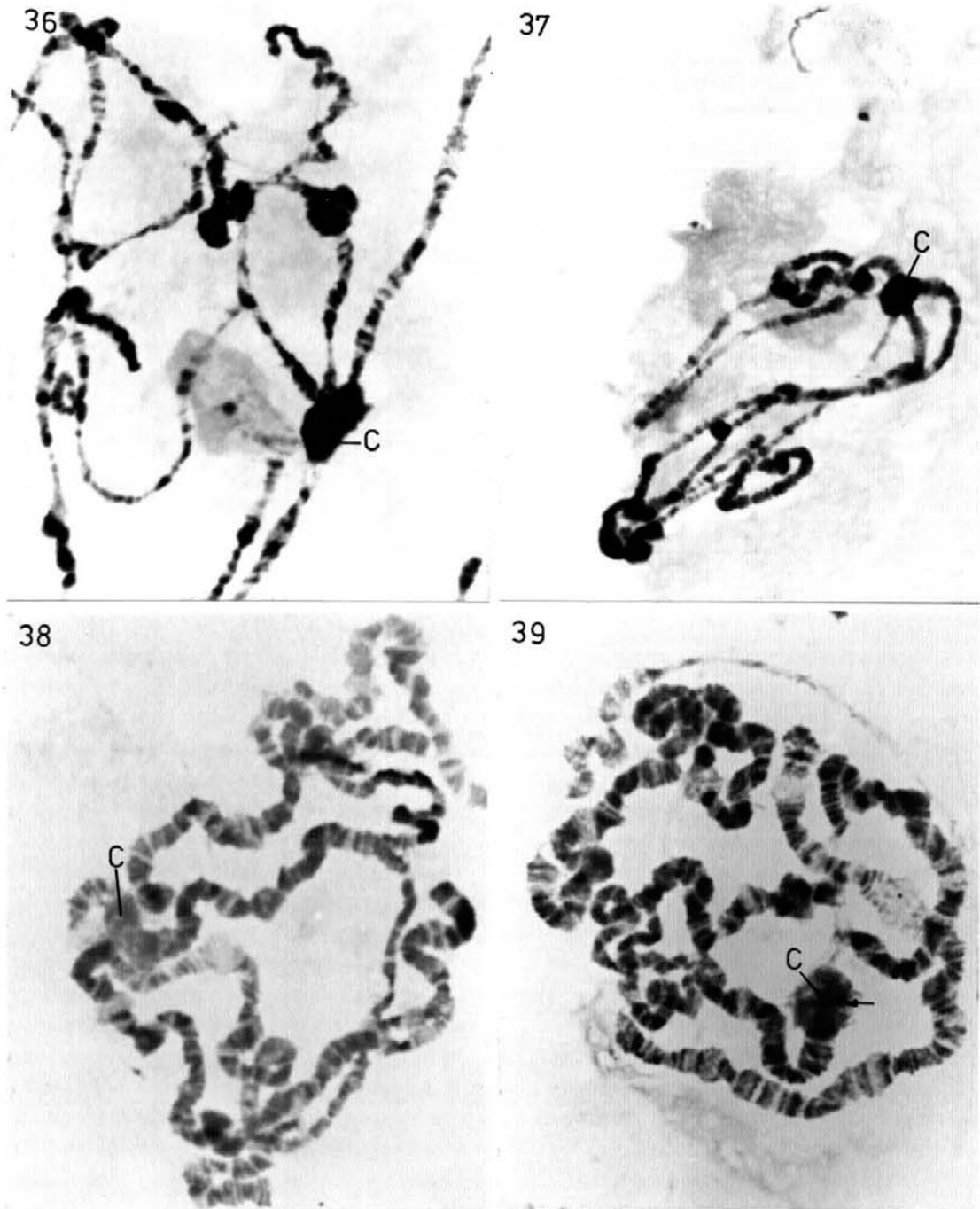


FIGURA 34. Cromossomos politênicos de glândula salivar de larva fêmea de *D. nebulosa*, submetidos ao Método I (banda C, renaturação a 65°C) (1030x).
C= Cromocentro.

FIGURA 35. Idem fig.34, porém renaturação a 75°C (1030x). C= Cromocentro.



FIGURAS 36 e 37. Cromossomos politênicos de glândula salivar de larvas de *D. nebulosa*, submetidos ao Método II (banda C, renaturação a 65°C). Fig. 36: fêmea (820x); fig. 37: macho (530x). C= Cromocentro.

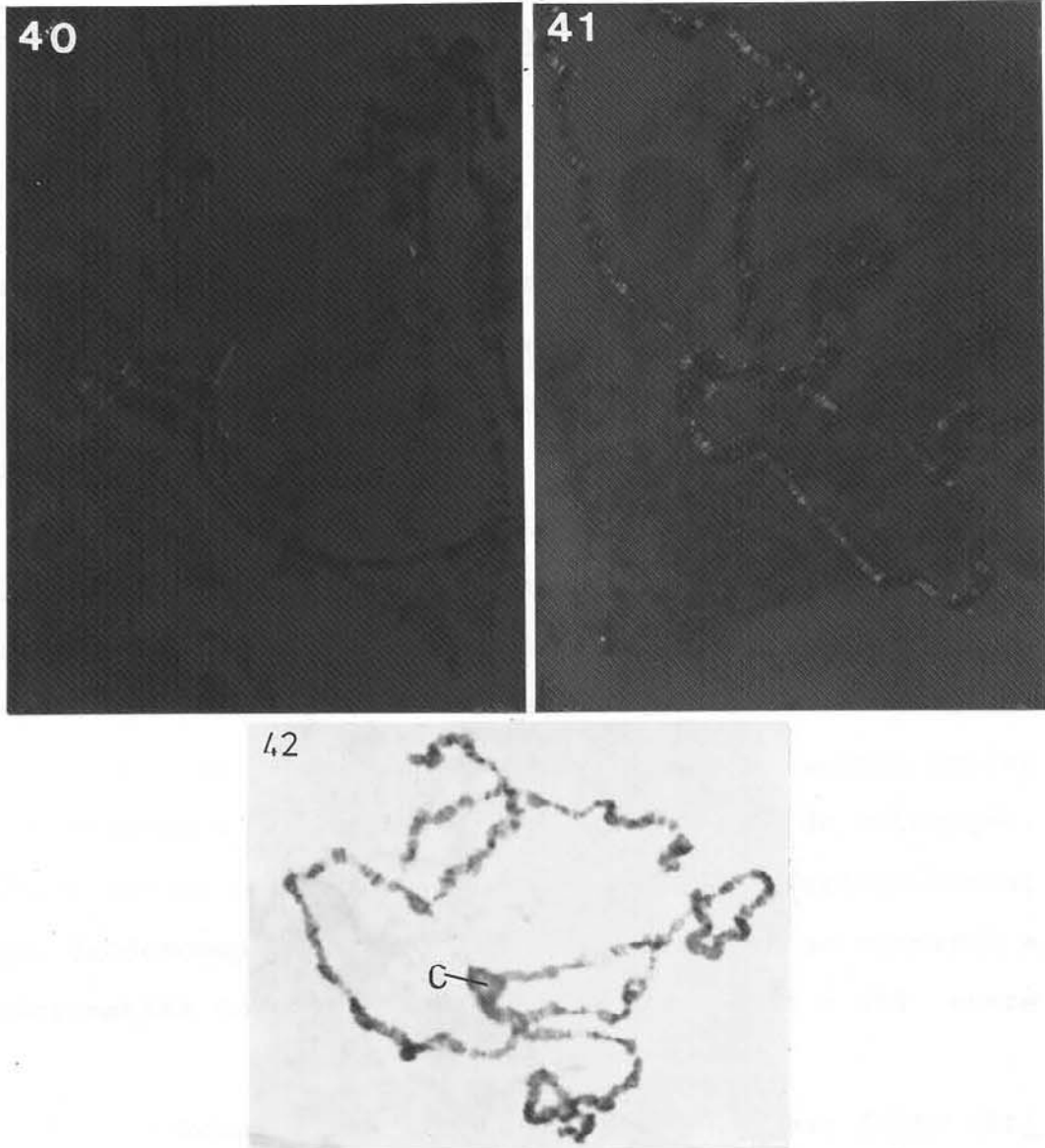
FIGURAS 38 e 39. Idem figs. 36 e 37, porém Método IV. Banda C, renaturação a 65°C. Fig. 38: fêmea (810x); fig. 39: macho (810x). C= Cromocentro. Em nenhum dos casos se observa resposta do cromocentro diferente daquela salientada por áreas eucromáticas.

leta-róseo para o método IV e ambas se coraram em azul (mais forte e mais fraca respectivamente) para o método V, o que estaria de acordo com o esperado (Mello, 1976, 1979b). Em cromossomos politênicos, porém, tal tipo diferencial em cores não foi obtido.

Na região do cromocentro de cromossomos politênicos de larvas machos observou-se frequentemente um grânulo que se evidencia após os procedimentos de desnaturação-renaturação e que provavelmente deva ser o cromossomo Y (Fig. 39-seta).

Na tentativa de se verificar o efeito do isopropanol sobre os cromossomos politênicos nos métodos de bandeados IV e V, alguns preparados tratados por isopropanol por 7 dias, foram submetidos à coloração por azul de toluidina a pH 3,5 e sua birrefringência comparada à dos não tratados. A intensidade de brilho em termos visuais aumenta sensivelmente nos preparados de cromossomos que foram tratados por isopropanol (Figs. 40 e 41). Aqueles não tratados apresentaram birrefringência muito fraca, com exceção de algumas poucas bandas e do filamento de DNP ligado ao nucléolo.

Os cromossomos politênicos submetidos ao método VI (banda G) são mostrados na figura 42. O cromocentro não se corou homogeneamente pelo giemsa, podendo-se observar uma região central que se cora fracamente. Apesar disto, a intensidade de coloração do cromocentro, de modo geral, foi semelhante à das regiões eucromáticas, se não, mais fraca.



FIGURAS 40 e 41. Observar que a birrefringência dos cromossomos politênicos de glândula salivar de larvas de D. nebulosa corados com azul de toluidina a pH 3,5, após tratamento com isopropanol durante 7 dias (fig.41) é maior do que no controle não tratado (fig. 40). Fig. 40: fêmea (660x); fig. 41: macho (660x).

FIGURA 42. Cromossomos politênicos de glândula salivar de larva macho de D. nebulosa submetidos ao Método VI (banda G) (920x). C= Cromocentro;

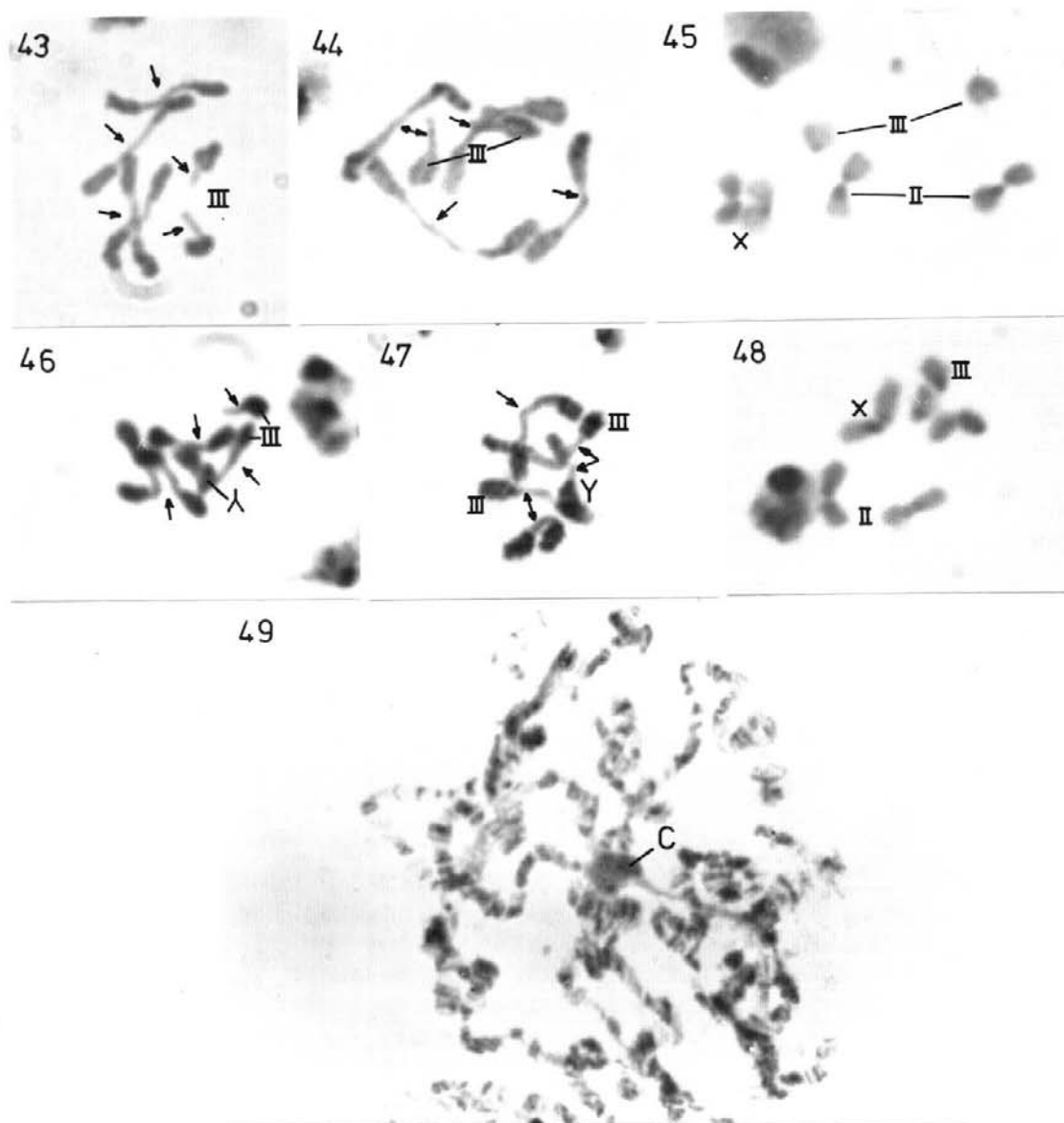
IV.2. Ação do composto Hoechst 33258 sobre as áreas heterocromáticas

Os resultados obtidos da ação do composto Hoechst 33258 sobre as áreas heterocromáticas dos cromossomos mitóticos de fêmeas e machos são mostrados nas figuras 43, 44, 46 e 47. Para comparação, são também apresentados preparados controles (Figs. 45 e 48).

Nas fêmeas, verificou-se que as regiões heterocromáticas centroméricas dos cromossomos X e II, os quais são metacêntricos, bem como dos cromossomos III, acrocêntricos, encontram-se descompactadas (setas) (Figs. 43 e 44). No material controle, as áreas heterocromáticas se apresentam condensadas e respondem positivamente, em intensidade de coloração, ao método III de bandeado (Fig. 45). Nenhuma diferença visual no grau de descompactação foi verificada quando se comparou a heterocromatina centromérica do cromossomo X, II e III entre si.

Resultados semelhantes aos de fêmeas foram obtidos para os cromossomos X, II e III de machos, que apresentaram o mesmo padrão de descondensação. A heterocromatina do cromossomo Y, no entanto, não sofreu o mesmo padrão de descompactação (Figs. 46 a 48). Em alguns casos notou-se ligeira descompactação próxima à região centromérica (Fig. 46) e em outros, descompactou-se apenas a região terminal de um dos braços cromossômicos (Fig. 47).

Em cromossomos politênicos de larvas do 3º estágio, submetidos ao mesmo tratamento, não se observou descompactação do cromocentro (Fig. 49).



FIGURAS 43-44 e 46-47. Cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais de larvas de fêmeas de *D. nebulosa*, tratados pelo composto Hoechst por 8 horas e submetidos ao Método III de denaturação-renaturação. Figs.43 e 44: fêmeas (4250x); figs. 46 e 47: machos (5000x). Observar as regiões alongadas. No cromossomo Y há indício de ligeira descompactação num dos braços (Fig.47).

FIGURAS 45 e 48. Idem, controle para fêmeas e machos respectivamente (sem composto Hoechst 33258 no meio de incubação) (45: 4250x; 48: 5000x). Os cromossomos se apresentam compactados.

FIGURA 49. Cromossomos politênicos de glândula salivar de larva macho tratados pelo composto Hoechst 33258 e submetidos ao Método III de denaturação-renaturação (1600x). No cromocentro (C) não se observa descompactação.

IV.3. Basofilia cromossômica

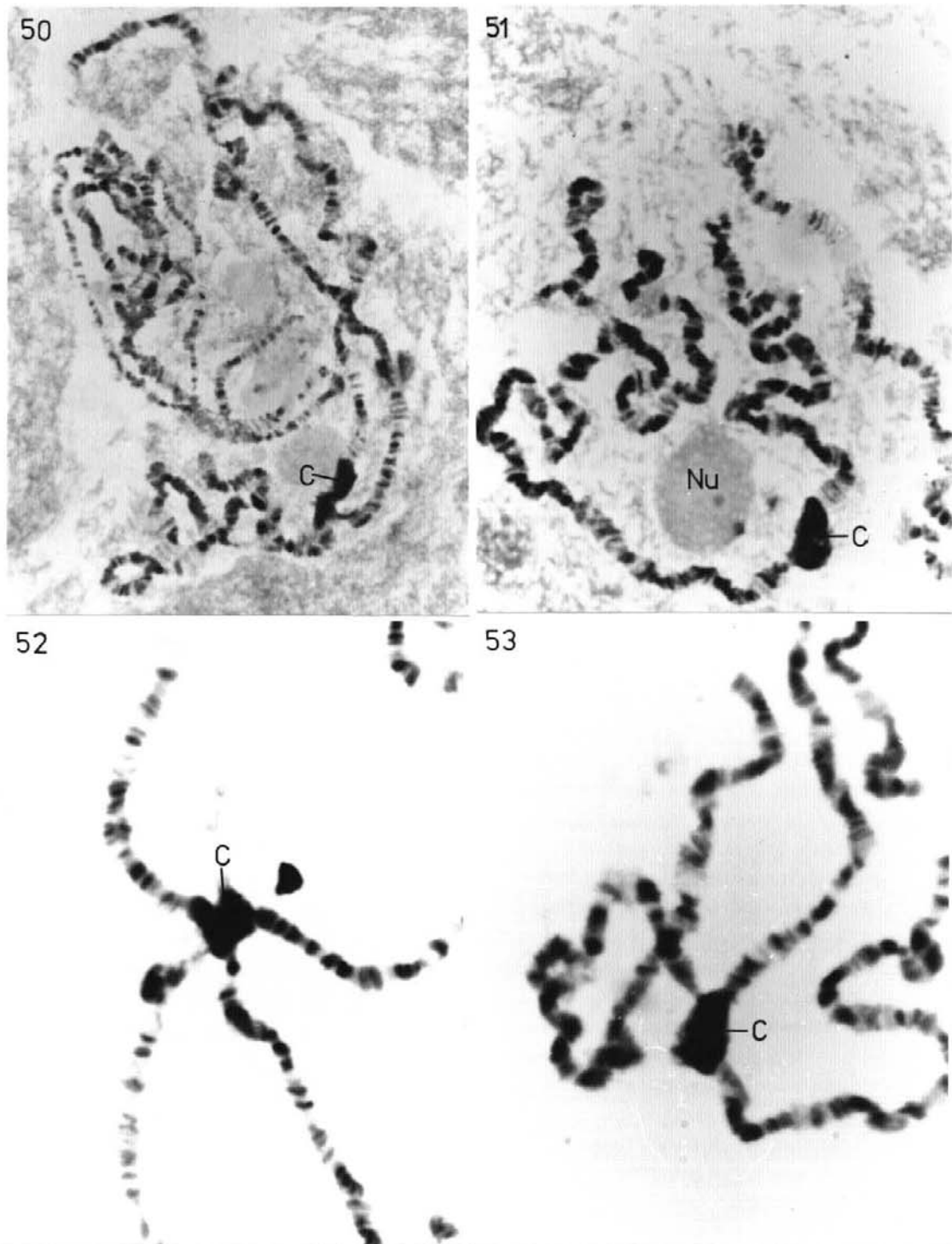
Os aspectos morfológicos dos cromossomos politênicos corados com azul de toluidina e analisados no presente trabalho são mostrados nas figuras 50 a 53.

Com as curvas espectrais de basofilia obtidas para as regiões heterocromáticas (cromocentro) e eucromáticas (bandas) dos cromossomos politênicos de D. nebulosa detectaram-se os valores dos índices metacromáticos e os picos de absorção respectivos (Tabela I).

A região do espectro em que se encontrou com maior frequência o pico de absorção para a heterocromatina de fêmeas do cromocentro (cromossomo II) sem e com tratamento prévio por RNase e analisando-se curvas individuais, foi respectivamente em $\lambda = 570 - 580\text{nm}$ e $\lambda = 580\text{nm}$. Para as regiões eucromáticas o pico foi encontrado geralmente em $\lambda = 580\text{nm}$ para os dois tipos de tratamento.

Para heterocromatina de machos, o pico de absorção deslocou-se de $\lambda = 570\text{nm}$ para $\lambda = 580\text{nm}$, após tratamento por RNase, e se manteve em torno de $\lambda = 570\text{nm}$ para as eucromatinas (Tabela I). Isto salienta uma ligeira e eventual participação de RNA nos padrões de basofilia estudados, uma vez que a remoção desse componente promove geralmente (porém nem sempre) um deslocamento do pico de absorção para um λ mais curto. Este deslocamento mostrou ser pouco pronunciado.

A comparação dos valores dos índices metacromáticos também não salienta diferenças sensíveis no que se refere à participação de RNA nos padrões de basofilia, exceto no



FIGURAS 50 a 53. Aspectos morfológicos dos cromossomos politênicos de glândula salivar de larvas fêmeas (figs. 50 e 52) e machos (figs. 51 e 53) de *D. nebulosa*, corados com azul de toluidina a pH 4,0, sem (figs. 50 e 51) e com (figs. 52 e 53) tratamento prévio por RNase. C= cromocentro (heterocromatina do cromossomo II); Nu= Nucléolo. (50: 700x; 51: 900x; 52 e 53: 1300x).

TABELA I. Índices metacromáticos e picos de absorção de regiões heterocromáticas (cromocentro) e eucromáticas de cromossomos politênicos de D. nebulosa, corados com Azul de Toluidina a pH 4,0, com e sem tratamento prévio por RNase.

Í T E N S	F E M E A S			M A C H O S				
	heterocromatina		eucromatina	heterocromatina		eucromatina		
	Índices metacromáticos ($\bar{X} \pm S$)	Picos de absorção (λ em nm)	Índices metacromáticos ($\bar{X} \pm S$)	Picos de absorção (λ em nm)	Índices metacromáticos ($\bar{X} \pm S$)	Picos de absorção (λ em nm)		
sem tratamento prévio por RNase (A)	1,453 \pm 0,126	570-580	1,376 \pm 0,078	570-590*	1,532 \pm 0,204	570	1,479 \pm 0,264	560-590**
com tratamento prévio por RNase (B)	1,350 \pm 0,055	580	1,215 \pm 0,064	580	1,247 \pm 0,077	580	1,217 \pm 0,104	570-580

* - valor mais frequente 580; ** - valor mais frequente 570

$n_H = 3$ e $n_E = 7$ para cálculo dos picos

$n_H = 6$ e $n_E = 6$ para cálculo dos índices metacromáticos

caso das regiões eucromáticas de fêmeas (Tabelas I e II). A não comprovação do mesmo em machos (Tabelas I e II) pode ser devida a diferenças fisiológicas entre os cromossomos dos dois sexos e/ou a pequenas diferenças em idade (e desenvolvimento) das larvas, uma vez que a determinação das fases larvais segundo Bodenstern (1950) dá margem a uma certa variação desse tipo. Com relação a comparações de heterocromatina versus eucromatina, em termos de índices metacromáticos, a única diferença estatisticamente significativa foi verificada em fêmeas e após tratamento enzimático com RNase (Tabela II).

Foram também determinadas curvas percentuais de basofilia nas diversas condições experimentais, visando-se melhor comparar o perfil das curvas espectrais. O valor máximo de absorbância em cada caso individual, foi considerado como 100% e a partir deste foram calculados valores relativos para os dados dos outros comprimentos de onda. A seguir foram construídas curvas com os valores médios percentuais (Figs. 54 e 55). As curvas obtidas nesse caso mostram grande semelhança entre si, com alguma exceção referente à zona do máximo de absorção. Deve-se notar também que a localização dos máximos de absorção às vezes difere ligeiramente dos dados apresentados na Tabela I, graças ao próprio procedimento de cálculo.

A observação visual de regiões heterocromáticas outras que as do cromossomo II (exemplo, partes heterocromáticas muito reduzidas dos cromossomos X e Y), e comparadas às deste cromossomo, não evidenciou diferente reatividade ao azul de toluidina nesse nível.

TABELA II. Valores de teste t encontrados para diversas condições de comparações testadas.

Condições testadas	Teste
$H\sigma_{\downarrow} A \times B$	$t = 1,658 < t_{0,05} = 2,23$
$E\sigma_{\downarrow} A \times B$	$t = 3,975 > t_{0,01} = 3,17^*$
$H\sigma^{\uparrow} A \times B$	$t = 0,995 < t_{0,05} = 2,23$
$E\sigma^{\uparrow} A \times B$	$t = 2,198 < t_{0,05} = 2,23$
$H\sigma^{\uparrow}(A) \times H\sigma_{\downarrow}^{\uparrow}(A)$	$t = 0,241 < t_{0,05} = 2,23$
$H\sigma_{\downarrow}^{\uparrow}(A) \times E\sigma_{\downarrow}^{\uparrow}(A)$	$t = 1,130 < t_{0,05} = 2,23$
$E\sigma^{\uparrow}(A) \times H\sigma^{\uparrow}(A)$	$t = 0,338 < t_{0,05} = 2,23$
$E\sigma_{\downarrow}^{\uparrow}(A) \times E\sigma^{\uparrow}(A)$	$t = 0,252 < t_{0,05} = 2,23$
$H\sigma^{\uparrow}(B) \times H\sigma_{\downarrow}^{\uparrow}(B)$	$t_{0,05} < t = 2,675 < t_{0,01} = 3,17^{**}$
$H\sigma_{\downarrow}^{\uparrow}(B) \times E\sigma_{\downarrow}^{\uparrow}(B)$	$t = 3,924 > t_{0,01} = 3,17^*$
$E\sigma^{\uparrow}(B) \times H\sigma^{\uparrow}(B)$	$t = 0,179 < t_{0,05} = 2,23$
$E\sigma_{\downarrow}^{\uparrow}(B) \times E\sigma^{\uparrow}(B)$	$t = 0,040 < t_{0,05} = 2,23$

H = Heterocromatina
 E = Eucromatina
 A = Sem tratamento prévio por RNase
 B = Com tratamento prévio por RNase
 * = Significativo a nível de 1%
 ** = Significativo a nível de 5%
 GI= 10, para todos os casos

- No caso de heterocedasticidade das amostras, trabalhou-se com o log dos dados.

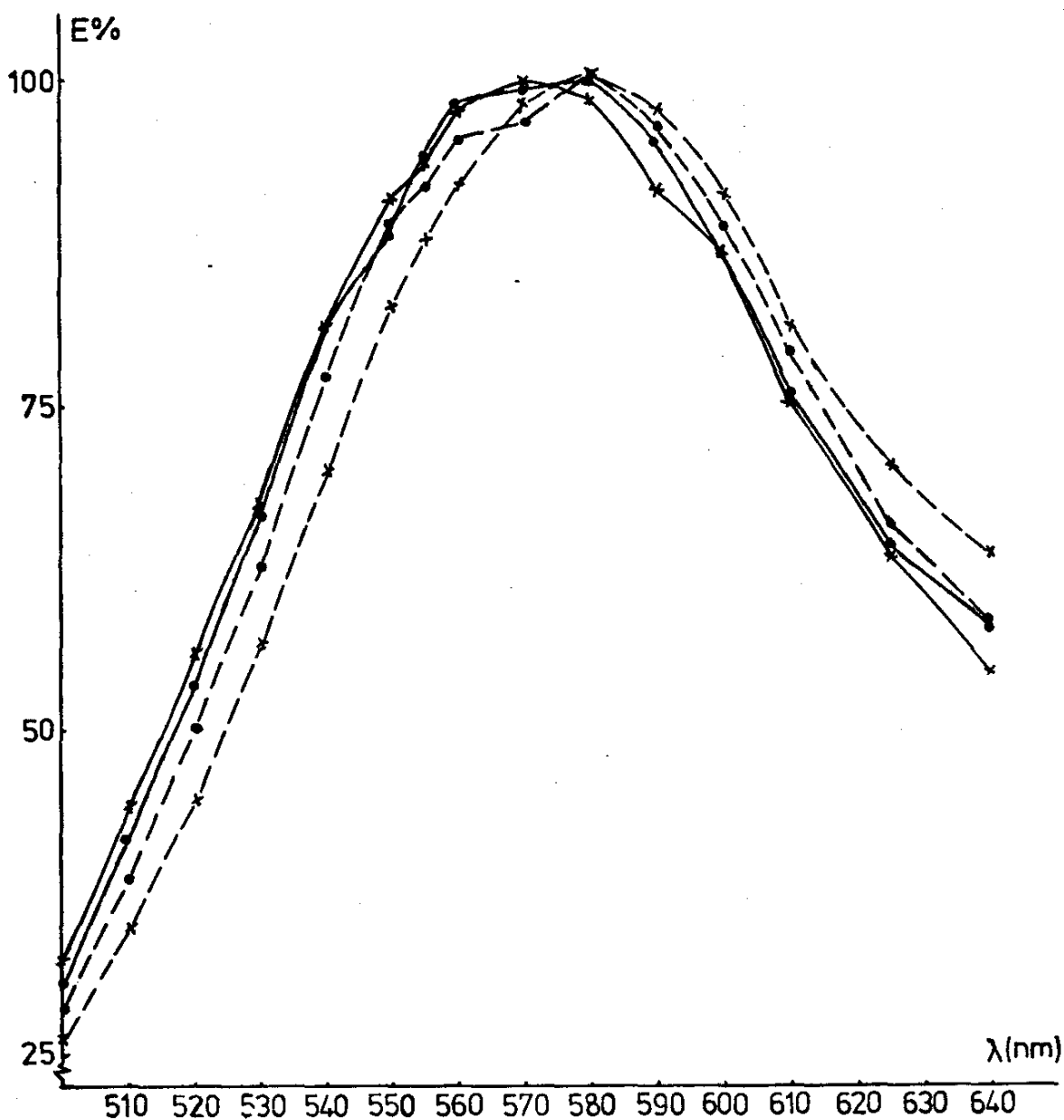


FIGURA 54. Curvas espectrais de absorção de regiões heterocromáticas (cromocentro) de cromossomos politênicos de *D. nebulosa* corados com azul de toluidina a pH 4,0, com (---) e sem (—) tratamento prévio por RNase. ● = ♀; x = ♂. Cada ponto na curva representa a média aritmética de 3 medidas. E= Absorbância.

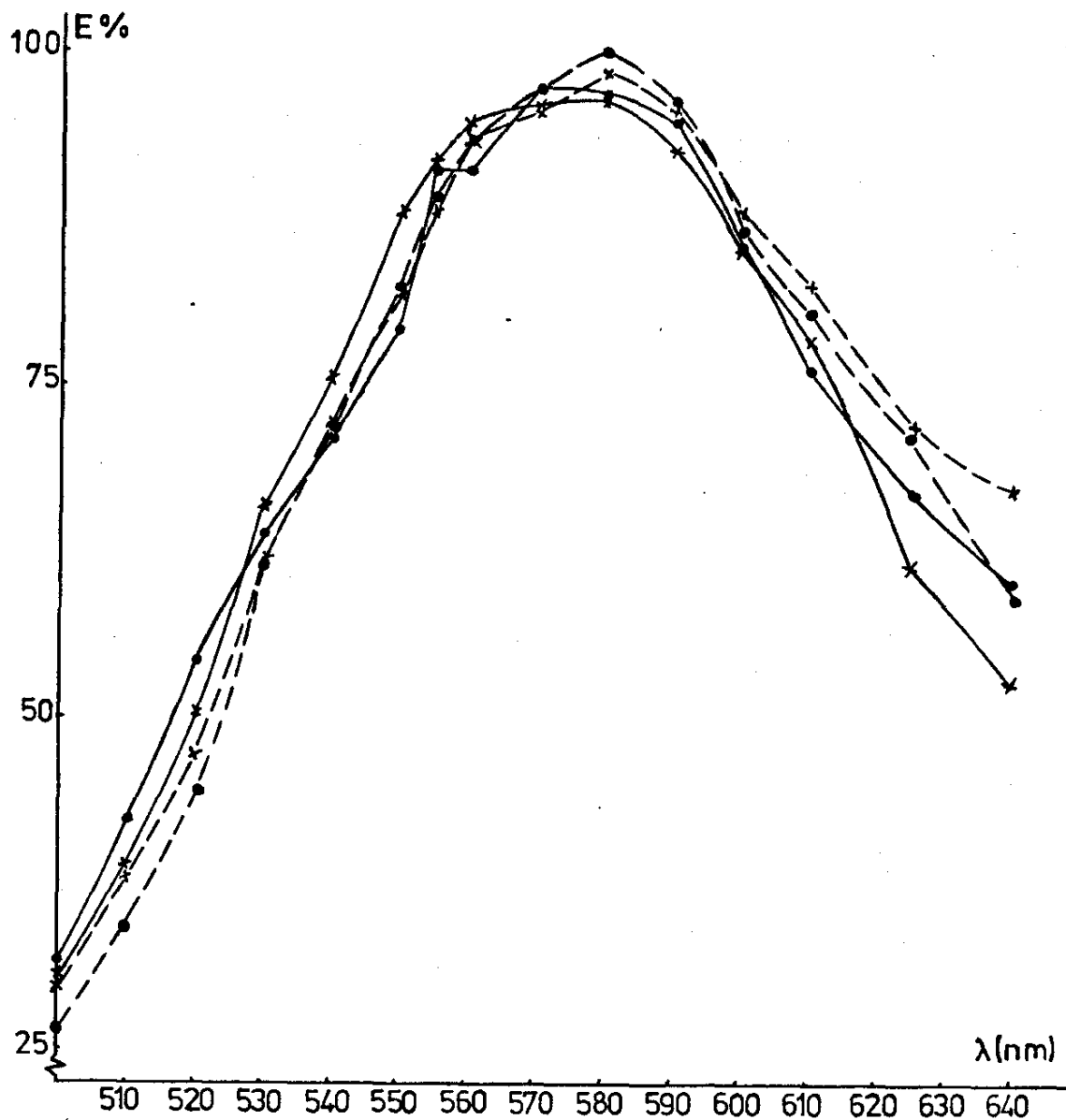


FIGURA 55. Curvas espectrais de absorção de regiões eucromáticas (bandas) de cromossomos politênicos de *D. nebulosa* corados com azul de toluidina a pH 4,0, com (---) e sem (—) tratamento prévio por RNase. ● = φ; x = σ. Cada ponto na curva representa a média aritmética de 7 medidas.
E= Absorbância.

Quanto aos preparados tratados por clupeína e a seguir pela solução de azul de toluidina a pH 3,5, verificou-se que os cromossomos permaneceram palidamente corados em verde, com exceção de áreas contendo grânulos ligeiramente metacromáticos (setas) (Fig. 56). Estes devem representar acúmulo de RNP (Vidal, 1979). As regiões heterocromáticas não diferiram das eucromáticas, mesmo no caso de fêmeas. Isto indica que a atividade de síntese de RNA nessas eucromatinas era mais baixa do que aquela dos preparados submetidos às reações de basofilia sem prévio tratamento por clupeína.

IV.4. Espectros de absorção de Feulgen

Os aspectos morfológicos dos cromossomos politênicos submetidos à Reação de Feulgen, após 12 e 20 horas de hidrólise são mostrados na figura 57.

O exame visual dos cromossomos e a análise de seus valores de absorbância no λ do pico de absorção, após 12 e 20h de hidrólise indicam que no 2º caso há um decréscimo nesses valores:

12h de hidrólise - Eucromatina	0,160 ± 0,027 δ
	0,209 ± 0,053 δ
Heterocromatina	0,340 ± 0,086 δ
	0,346 ± 0,027 δ
20h de hidrólise - Eucromatina	0,094 ± 0,034 δ
	0,113 ± 1,021 δ
Heterocromatina	0,221 ± 0,030 δ
	0,254 ± 0,053 δ

Portanto, os valores correspondentes a 20h de hidrólise se enquadram na região descendente das curvas de hidrólise desse

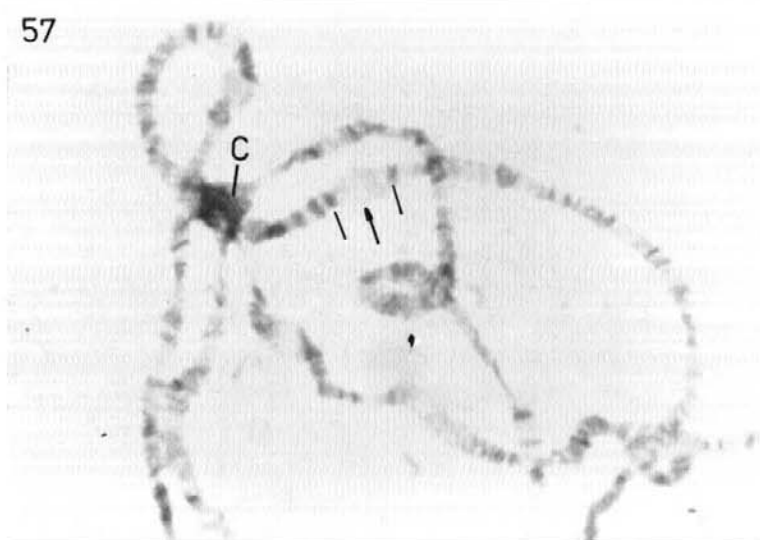
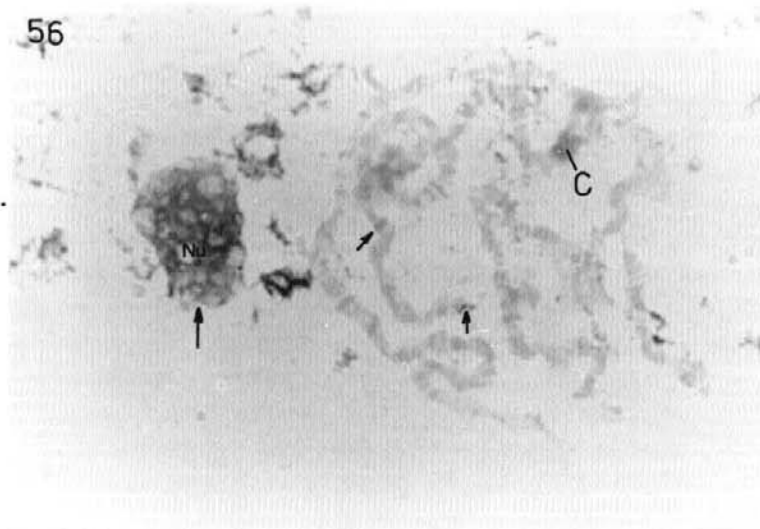


FIGURA 56. Aspectos morfológicos dos cromossomos politénicos de glândula salivar de larva macho de D. nebulosa tratados por clupeína e a seguir por azul de toluidina a pH 3,5. C= Cromocentro (heterocromatina do cromossomo II); Nu= Nucléolo; setas= regiões metacromáticas. (820x).

FIGURA 57. Aspectos morfológicos dos cromossomos politénicos de glândula salivar de larva macho de D. nebulosa, submetidos à reação de Feulgen (hidrólise : 20 horas). C= Cromocentro (heterocromatina do cromossomo II); seta= região 78 do cromossomo III. (990x).

material (Mello e Vidal, 1978). Em outras palavras, o material estudado, após 20h de hidrólise já atingiu a máxima depurinação, o que está de acordo com dados de cinética de hidrólise de Desai (1966), Kjellstrand (1977a e b) e Mello (1979a). Portanto, para tornar válida a busca de diferenças entre as cromatinas, no que se refere ao seu perfil espectral de Feulgen (Mello, 1978, 1980a), foram determinadas curvas de absorção justamente após 20 horas de hidrólise as quais foram comparadas com as obtidas após 12 horas do processo hidrolítico.

Para o tempo de 12h, as curvas de absorção de Feulgen da heterocromatina do cromocentro e da eucromatina, de machos e fêmeas de D. nebulosa, exibem um máximo em $\lambda = 565\text{nm}$. Os perfis das curvas praticamente não diferem entre si. Um ombro discreto é observado ao redor de $\lambda = 530\text{-}540\text{nm}$ (Fig. 58). Após 20h de hidrólise também os máximos de absorção se localizam num único λ , o qual passa a ser mais longo (570nm) (Fig. 59). O pronunciamento dos ombros praticamente não se altera, se comparado àquele encontrado no tempo de hidrólise de 12h (Figs. 58 e 59). Efetuando-se análise de variância para os valores de absorbância percentual obtidos nas quatro condições experimentais, na região do ombro ($\lambda = 530$ e 540nm), para cada tempo de hidrólise, comprovou-se que uma diferença entre tais valores não era estatisticamente significativa (Tabelas III e IV).

Com base no exame dos valores de absorbância encontrados nos tempos de 12 e 20h de hidrólise é de se esperar que a lei de Beer esteja sendo obedecida na região do espec -

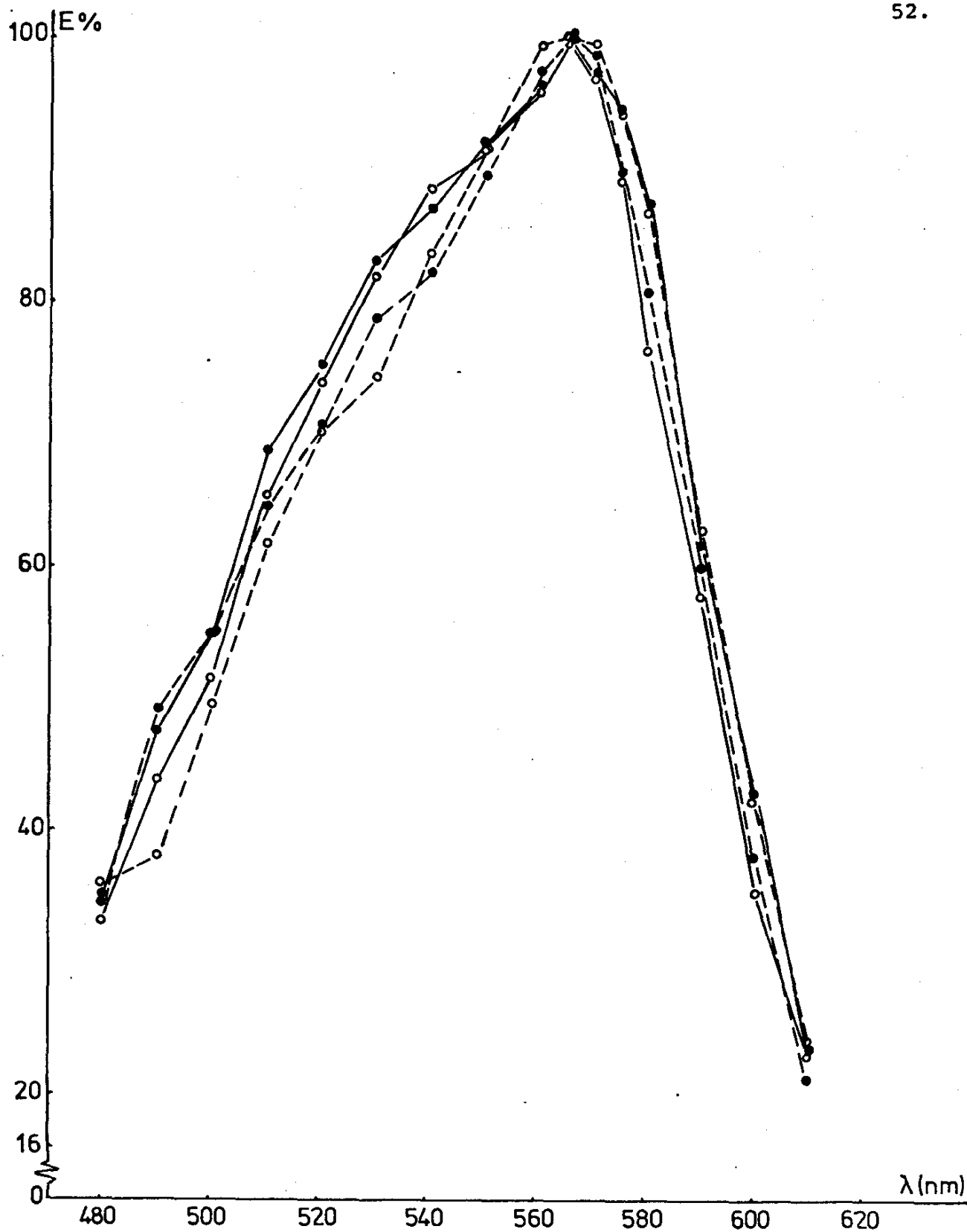


FIGURA 58. Curvas de absorção de Feulgen de heterocromatina (●) do cromossomo II e eucromatina da região 78 do cromossomo III (o) de politênicos de glândula salivar de machos (—) e de fêmeas (---) de *D. nebulosa*. A hidrólise foi efetuada durante 12 horas a 37°C com HCl 0,1N. Cada ponto representa a média aritmética de 3 valores. E= Absorbância.

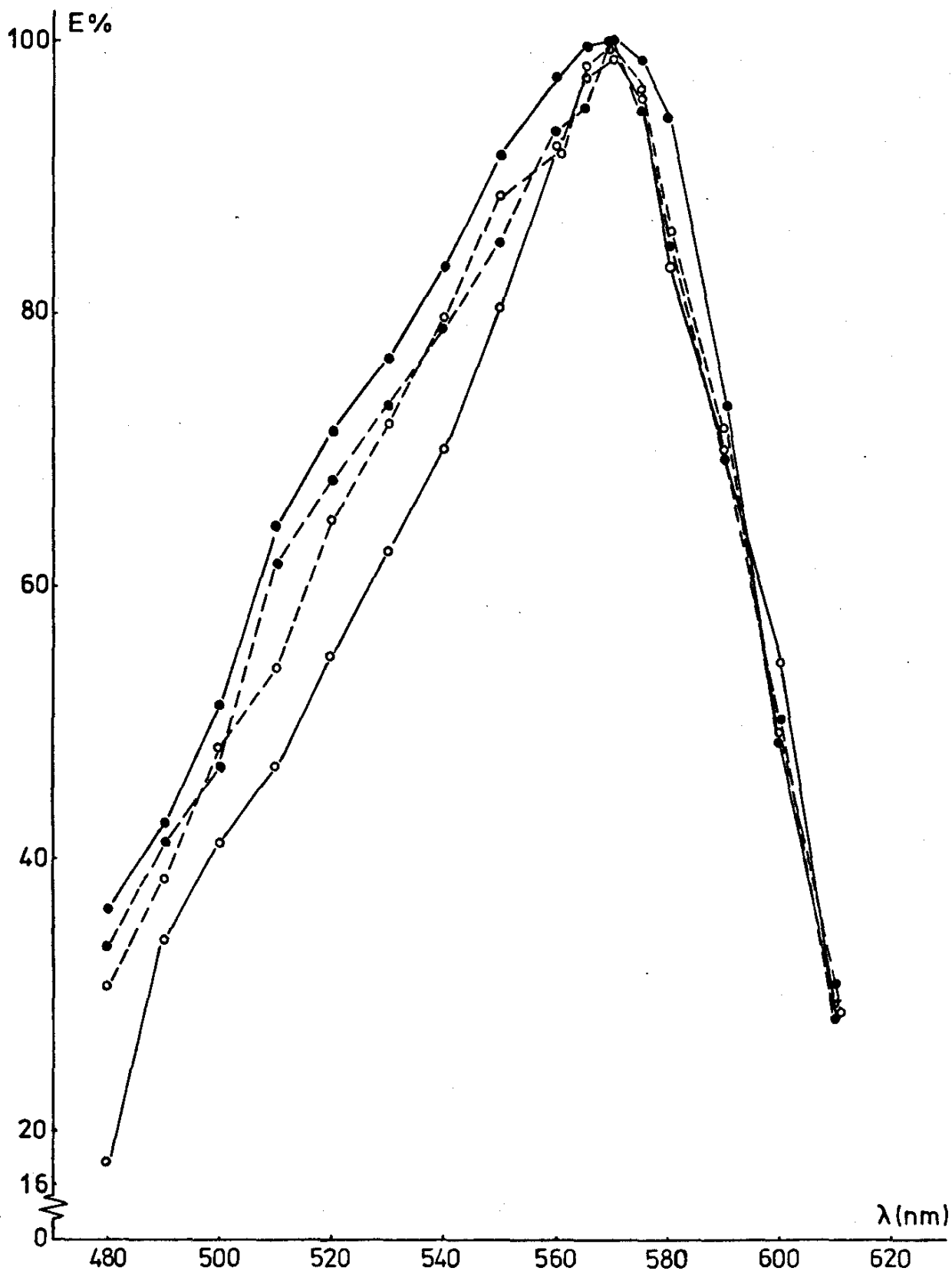


FIGURA 59. Curvas de absorção de Feulgen de heterocromatina (●) do cromossomo II e eucromatina da região 78 do cromossomo III (o) de politênicos de glândula salivar de machos (—) e de fêmeas (- - -) de *D. nebulosa*. A hidrólise foi efetuada durante 20 horas a 37°C com HCl 0,1N. Cada ponto representa a média aritmética de 3 valores. E= Absorbância.

TABELA III. Análise de variância para os valores percentuais de absorvância na região do ombro da curva espectral de Feulgen após 12 horas de hidrólise, em cromossomos politênicos de D. nebulosa.

Cromatinas	Sexo das larvas	Absorbâncias ($\bar{X} \pm s$)	
		$\lambda = 530\text{nm}$	$\lambda = 540\text{nm}$
Heterocromatina	♂	83,2 ± 2,0	87,3 ± 1,5
	♀	78,8 ± 7,2	82,2 ± 3,9
Eucromatina	♂	81,9 ± 2,6	88,6 ± 3,5
	♀	79,7 ± 4,7	85,4 ± 2,1

Análise de variância - $\lambda = 530\text{nm}$

Variação	S.Q.	Gl	Variância
Total	205,26	11	
Entre	36,46	2	18,23
Dentro	168,80	9	18,76

$$F = 0,97 < F_{0,05} = 4,26$$

Análise de variância - $\lambda = 540\text{nm}$

Variação	S.Q.	Gl	Variância
Total	137,42	11	
Entre	68,93	2	34,47
Dentro	68,49	9	7,61

$$F_{0,05} = 4,26 < F = 4,53 < F_{0,01} = 8,02$$

TABELA IV. Análise de variância para os valores percentuais de absorvância na região do ombro da curva espectral de Feulgen após 20 horas de hidrólise, em cromossomos politênicos de D. nebulosa.

Cromatinas	Sexo das larvas	Absorbâncias ($\bar{X} \pm S$)	
		$\lambda = 530\text{nm}^*$	$\lambda = 540\text{nm}$
Heterocromatina	♂	76,6 ± 1,1	83,4 ± 1,8
	♀	73,3 ± 4,5	78,9 ± 2,1
Eucromatina	♂	62,5 ± 15,3	69,9 ± 10,3
	♀	71,8 ± 2,0	79,5 ± 1,9

* Uma vez que ocorre heterocedasticidade das amostras, foram usados log dos dados.

Análise de variância - $\lambda = 540\text{nm}$

Variação	SQ	Gl	Variância
Total	528,97	11	
Entre	294,40	2	147,20
Dentro	234,57	9	26,06

$$F_{0,05} = 4,26 < F = 5,65 < F_{0,01} = 8,02$$

Análise de variância - $\lambda = 530\text{nm}$

Variação	SQ	Gl	Variância
Total	0,04	11	
Entre	0,01	2	0,005
Dentro	0,03	9	0,003

$$F = 1,50 < F_{0,05} = 4,26$$

tro abrangendo o máximo de absorção e o ombro, pois os valores de absorbância não são nem muito baixos nem muito altos com relação às curvas publicadas por Ewing (1972). Por outro lado, se ocorreram algumas inconsistências nesses valores, devidas a erro distribucional, não devem ter sido significantes a ponto de invalidar o padrão das curvas, pois as áreas escolhidas para as medidas apresentaram-se relativamente homogêneas nas condições de fixação e hidrólise utilizadas.

V. DISCUSSÃO

V.1. Banda C

Embora todos os métodos de banda C tenham salientado as regiões heterocromáticas centroméricas dos cromosomas mitóticos II, III e X de D. nebulosa coradas mais intensamente do que as regiões eucromáticas, não foram encontradas diferenças de intensidade de resposta entre essas heterocromatinas após cada um dos diferentes métodos.

Portanto, se diferenças químicas ocorrem entre as regiões heterocromáticas de D. nebulosa, especialmente comparando-se os cromossomos mitóticos X e II entre si, não são detectáveis com métodos de banda C. Apenas o cromossomo Y salientou diferenças com relação aos demais. Neste, considerado inteiramente heterocromático por Pavan (1946a) obteve-se uma diferente resposta a alguns dos métodos de banda C, quando comparado às áreas heterocromáticas dos outros cromossomos, em função da temperatura em que se procedia a reassociação. Assim, apareceu pálido e homogeneamente corado, quando a reassociação era efetuada a 75°C, o que não aconteceu a 65°C. A 75°C há reassociação predominante de CG (Harbers, 1969) e portanto, pouca intensidade de coloração a 75°C, mas intensa coloração a 65°C é indicativo de que ocorra riqueza em AT no DNA de tal cromatina. Nesse aspecto, convém lembrar que em D. melanogaster, por exemplo, tem sido comprovado que o cromossomo Y é especialmente rico em AT (Fansler et al., 1970; Blumen

feld e Forrest, 1971; Pimpinelli et al., 1976). Deve-se ressaltar, por outro lado, que a resposta aos métodos de banda C (em condições de reassociação efetuada a 65°C) no cromossomo Y de D. nebulosa não evidenciou o mesmo corado homoganeamente. Segmentos claros aparecem nas extremidades e próximo ao centrômero, pelo menos após os métodos de banda C relatados como I e III (Tabela V). Certa alternância em segmentos claros e escuros foi já encontrada no cromossomo Y de D. melanogaster por Hsu (1971) e por Pimpinelli e colaboradores (1976), muito embora as condições de desnaturação usadas por esses autores diferissem entre si (Tabela V). Também no cromossomo Y de D. nasuta (Lakhotia e Kumar, 1979), de D. hydei (Beck e Srdić, 1979), bem como no de outras espécies animais como o caribu (rena do Canadá) Pathak e Stock, 1974) e o ser humano (Jalal et al., 1974b) foi constatada inhomogeneidade ao longo do mesmo, em preparações submetidas a métodos de banda C. Para o caso de D. nasuta essa inhomogeneidade ao longo do cromossomo Y parece estar relacionada com diferenças nos tipos de DNAs repetitivos e/ou proteínas cromossômicas associadas ao longo do mesmo (Lakhotia e Kumar, 1979). Já no caso de D. hydei não se encontrou ainda nenhuma explicação, principalmente porque o Y desta espécie praticamente não contém sequências repetitivas de DNA (Hennig, 1972; Renkawitz, 1978a, b; Beck e Srdić, 1979).

Quanto aos cromossomos politênicos, a região do cromocentro mostrou resposta aos métodos de banda C muito semelhante à da maioria das bandas das regiões eucromáticas. Nem mesmo áreas puntiformes que possam representar heterocromati-

na dos cromossomos outros que o II apresentaram diferenças em intensidade ou tipo de cor. Não foram constatadas, portanto, diferenças como as narradas para alguns outros dípteros, como Simulium (Bedo, 1975) e Chironomus (Hägele, 1977).

Os cromossomos politênicos (e também os mitóticos), que foram tratados por isopropanol a frio antes de serem submetidos ao método de banda C (Métodos IV e V) não apresentaram a diferenciação em cor descrita nos relatos de Hägele (1977). Nos cromossomos mitóticos, os resultados, em intensidade de coloração, foram semelhantes aos obtidos para os demais métodos de banda C, ou seja, as regiões heterocromáticas centroméricas coraram-se mais intensamente do que o restante dos cromossomos, embora com a mesma cor. Nos politênicos, o cromocentro respondeu homogeneamente e com uma intensidade de coloração comparável à das áreas eucromáticas. Segundo Hägele (1977), a ação do isopropanol sobre os cromossomos, em particular sobre os politênicos, não está ainda bem esclarecida. Esse autor supõe que a remoção de proteínas e/ou perda preferencial de DNA desempenhe algum papel na resposta aos seus métodos "C" e "RB". Em D. nebulosa, tal resposta diferencial não foi obtida, podendo-se supor que as regiões heterocromáticas e eucromáticas desses cromossomos apresentem composição e estrutura tais que, se diferenças houverem, estas não são evidenciadas após tratamento por isopropanol. No entanto, verificamos que os cromossomos politênicos tratados durante 7 dias por isopropanol a -20 C e submetidos à coloração por azul de toluidina a pH 3,5, passam a apresentar uma birrefringência visivelmente maior que controles não tratados. Isto é indica

tivo de que possa ter ocorrido, com o tratamento, um rearranjo ordenado de material cromossômico, talvez por mudanças conformacionais envolvendo a própria molécula de DNA e deslocamentos de proteína (Barnett et al., 1980). Assim, poderiam ser expostos mais grupos fosfatos livres do DNA, disponíveis a se ligarem às moléculas de azul de toluidina e/ou aproximação das moléculas de corante de forma ordenada, com a ação do isopropanol em pH ácido. Esta remoção, com vistas aos dados obtidos em D. nebulosa, ocorreu no cromocentro e em bandas e interbandas das áreas eucromáticas. Não parece ter sido diferencial entre vários cromossomos.

Uma vez que, para os cromossomos mitóticos, as áreas heterocromáticas centroméricas de D. nebulosa aparecem sempre fortemente coradas, independente do método de banda C e temperatura do banho em solução 2SSC, seria de se supor riqueza em CG ou um certo equilíbrio entre seu teor em AT e CG. Com base nos resultados após tratamento com o composto Hoechst, discutidos mais para a frente, a segunda hipótese é mais verossímil. Possivelmente tais sequências sejam repetitivas (Arrighi e Hsu, 1971). Embora em equilíbrio entre si, o conteúdo dessas sequências nos cromossomos mitóticos deve ser sensivelmente maior do que o das áreas eucromáticas. Já nos politênicos, o teor em sequências repetitivas do cromocentro, não deve ser maior do que na eucromatina, uma vez que não responde diferencialmente aos métodos de desnaturação-reassociação. Esta suposição encontra apoio em dados obtidos para D. melanogaster e D. virilis, através de experimentos de hibridização in situ, quando Gall e colaboradores (1971) mostraram que a maioria das sequências repetitivas de DNA satélite são

encontradas na heterocromatina. Estas sequências, porém, a despeito de serem altamente representadas nos tecidos diploides, se tornam apenas uma fração diminuta do DNA total isolado do tecido com cromossomos politênicos, por não se replicarem (Gall et al., 1971). Talvez a homogeneidade de resposta das áreas hetero- e eucromáticas dos cromossomos politênicos de D. nebulosa frente aos procedimentos de denaturação-reassociação se deva a fato semelhante.

Em D. nebulosa, portanto, se considerarmos a heterocromatina centromérica do cromossomo II um tipo β (Heitz, 1934; Gall et al., 1971) e a dos outros cromossomos, tipo α , diferenças entre as mesmas, pesquisadas a nível de banda C não são detectáveis. Exceção deve ser feita na consideração do cromossomo Y, o qual, pelo menos ao nível mitótico, apresenta algumas diferenças observáveis, decorrentes de sua composição. E, neste caso, a sua área heterocromática não se restringe unicamente ao centrômero.

É interessante se constatar que as diferenças entre hetero- e eucromatina verificadas nos cromossomos mitóticos, desaparecem nos politênicos, o que demonstra que a composição das áreas heterocromáticas (α e β) sofre alguma alteração, qualitativa e/ou quantitativa, em relação à eucromatina. Essa alteração envolveria tipos de DNA e/ou proteínas cromossômicas.

Uma tentativa de comparação dos resultados de banda C obtidos para os autossomos e cromossomo X de D. nebulosa com os de outras espécies de Drosophila mostra-se uma tarefa dificultada pelas diferenças na metodologia escolhida por

cada autor para a análise de cariótipos de uma ou mais espécies em particular (Tabela V). Inclusive, diversos autores são concordes em afirmar que variações de resultados possam vir a ocorrer para um mesmo material, numa única lâmina, submetido a um determinado método de banda C, em função do grau de compactação dos cromossomos e fase da mitose (Sumner, 1972; Bostock e Christie, 1975).

Neste trabalho, dada a uma certa gama de variação nos métodos de desnaturação associada à relativa constância na homogeneidade dos resultados obtidos para os cromossomos metafásicos, tentou-se proceder a algumas comparações. Muito embora para diversas espécies de Drosophila estudadas por Pimpinelli e colaboradores (1976) não tenham sido reveladas diferenças quanto à banda C, nas áreas heterocromáticas centroméricas, e em D. nebulosa isso também ocorra usando-se o mesmo método (Tabela V), neste último caso as regiões eucromáticas aparecem muito coradas, tornando-se difícil diferenciá-las das heterocromáticas. Isto já não acontece no caso das espécies estudadas por Pimpinelli e colaboradores (1976), o que se deduz observando-se as ilustrações de sua publicação. Talvez os resultados desses autores e os obtidos para D. nebulosa não sejam comparáveis, uma vez que o método de obtenção dos cromossomos metafásicos difere.

Os resultados de banda C exibidos pelos cromossomos mitóticos de D. nebulosa diferem dos de D. hydei, considerando-se o método usado por Beck e Srdić (1979), o qual corresponderia ao método III para D. nebulosa (Tabela V) e até mesmo considerando-se os dados obtidos após o método de desna

Tabela V. Dados de banda C em autossomos e cromossomo X metafísicos de algumas espécies de *Drosophila*.

Espécies	Desnaturação	Reassociação	Observações	Autor
<i>D. melanogaster</i>	NaOH 0,0014 N 1 - 2 min	6SSC a 65°C 20 - 24 horas	Heterocromatina do cromossomo X apresenta-se segmentada por bandas fracamente coradas; a região centromérica do II apresenta 2 compartimentos - um mais condensado que o outro; no III, heterocromatina centromérica subdividida num dos lados	Hsu, 1971
	NaOH 0,07 N 1 - 2 min	2SSC a 60°C 1 hora	Não há diferença entre a resposta das regiões heterocromáticas centroméricas	Pimpinelli et al., 1976
<i>D. simulans</i>	NaOH 0,07 N 1 - 2 min	2SSC a 60°C 1 hora	Idem anterior	Pimpinelli et al., 1976
<i>D. virilis</i>	NaOH 0,07 N 1 - 2 min	2SSC a 60°C 1 hora	Idem anterior	Pimpinelli et al., 1976
<i>D. texana</i>	NaOH 0,07 N 1 - 2 min	2SSC a 60°C 1 hora	Idem anterior	Pimpinelli et al., 1976
<i>D. ezoana</i>	NaOH 0,07 N 1 - 2 min	2SSC a 60°C 1 hora	Idem anterior	Pimpinelli et al., 1976
<i>D. hydei</i>	NaOH 0,07 N 1 - 2 min	2SSC a 60°C 1 hora	2 pares de autossomos possuem banda C simples na heterocromatina centromérica terminal; e outros dois pares mostram a região positiva à banda C dividida por uma área menos corada; um dos braços do X, mais região centromérica positivos.	Pimpinelli et al., 1976
	Ba(OH) ₂ 0,07 N 5 - 10 min	2SSC a 65°C 2 horas	4 pares de autossomos com banda C subdividida; um dos braços do X mais região centromérica, positivos	Beck e Srdić, 1979
<i>D. nasuta</i>	NaOH 0,0014 N em 2SSC (20°C)	3 vezes em 2SSC 2 a 3 min cd	Não há diferença entre a resposta das regiões heterocromáticas centroméricas	Lakhotia e Kumar, 1979
<i>D. nasutoides</i>	NaOH 0,07 N	2SSC a 60°C 20 a 24 horas	O par metacêntrico maior apresenta bandas C intersticiais, além das centroméricas; os de mais cromossomos não diferem	Cordeiro et al., 1975
<i>D. nebulosa</i>	NaOH 0,01 N (Método I)	2SSC a 60 e 75°C 12 a 15 horas	Não há diferenças entre as respostas das regiões heterocromáticas centroméricas	
	NaOH 0,0014N (Método II)	2SSC a 60 e 75°C 12 a 15 horas	Idem anterior	
	Ba(OH) ₂ sol. saturada (Método III)	2SSC a 60 e 75°C 4h e 30 min.	Idem anterior	
	Isopropanol 7 dias, Ba(OH) ₂ sol. saturada (Método IV)	2SSC a 60 e 75°C 1h e 30 min.	Idem anterior	
	Isopropanol 50 dias, Ba(OH) ₂ sol. saturada (Método V)	2SSC a 60 e 75°C 1h e 30 min.	Idem anterior	
	NaOH 0,07N	2SSC a 60°C 1 hora	Resposta das áreas centroméricas não difere entre si. Diferenças entre heterocromatina e eucromatina dificilmente visíveis (observações não incluídas em Resultados)	

turação-reassociação utilizado por Pimpinelli e colaboradores (1976). O comportamento das áreas heterocromáticas centroméricas dos autossomos e cromossomo X de D. nebulosa, por outro lado, difere também do ^{de} D. melanogaster, considerando-se os dados de Hsu (1971), obtidos em condições às quais o método II para D. nebulosa mais se assemelha. Deve-se observar, no entanto, que a solução em que se realizou a reassociação em melanogaster é mais concentrada do que a utilizada para nebulosa (Tabela V), o que talvez pudesse extrair mais DNA e proteínas do material da primeira (Kato e Moriwaki, 1972; Comings et al., 1973; McKenzie e Lubs, 1973). Difere também com relação ao tipo das regiões banda C positivas de D. nasutoides, em que o método utilizado por Cordeiro e colaboradores (1975) se assemelha ao método I para D. nebulosa.

Considerando-se a árvore filogenética proposta por Throckmorton, em 1962, para as espécies de Drosophila (Fig. 60) e os dados, embora relativamente escassos, dos tipos de resposta de heterocromatina centromérica de autossomos e cromossomos X aos procedimentos de desnaturação-reassociação, pode-se, portanto, observar que nas espécies mais evoluídas do que D. nebulosa os padrões de banda C em cromossomos mitóticos são mais diversificados.

Em termos evolutivos, os dados existentes na literatura a respeito de heterocromatina, segundo Holmquist (1975a e b) e Gatti e colaboradores (1976) são altamente sugestivos de que no gênero Drosophila "a heterocromatina seja mais taxonomicamente divergente do que características morfológicas externas" e mostram a importância da mesma na evolu -

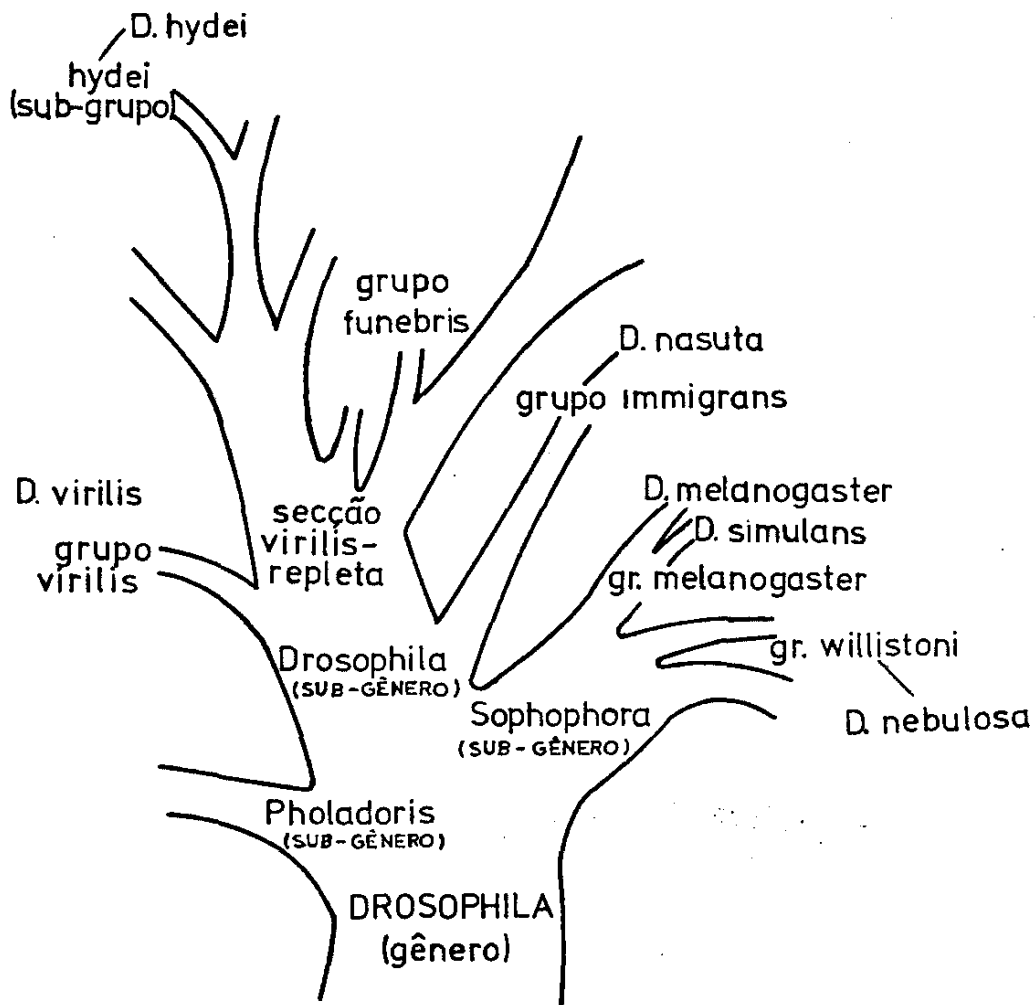


FIGURA 60. Relações filogenéticas dentro do gênero Drosophila (Throckmorton, 1962).

ção do gênero Drosophila. Variações quantitativas e qualitativas de heterocromatina neste gênero talvez estejam conectadas com especiação (Gatti et al., 1976). Segundo Gatti e colaboradores (1976), ainda, a heterogeneidade citológica da heterocromatina de Drosophila pode simplesmente representar uma multiplicidade de aspectos da mesma função ou refletir uma real heterogeneidade funcional.

V.2. Banda G

No que diz respeito à banda G nos cromossomos mitóticos de D. nebulosa, um ponto interessante observado foi uma certa falta de constância na resposta de coloração da heterocromatina dos centrômeros em relação às regiões eucromáticas em diferentes lâminas ou diferentes campos de uma mesma lâmina. Deve-se salientar que também aqui particularidades técnicas podem influenciar a resposta ao método. Por exemplo, se preparações frescas de cromossomos são submetidos ao método de banda G (ex., Fig. 31), os resultados não são satisfatórios. Tem sido relatado, que nessas condições, ocorrem distorções da morfologia cromossômica e que melhores resultados são obtidos quando os preparados são guardados por pelo menos 7 dias à temperatura ambiente, e são então tratados por tripsina (Gallimore e Richardson, 1973). Vem sendo relatado, por outro lado, em cromossomos humanos (Merrick et al., 1973) e de camundongo (Ray e Hamerton, 1973), que tratamento prolongado por tripsina causa desaparecimento de bandas G positivas e aparecimento de banda C, isto é, as regiões heterocromáticas cen-

troméricas passam a apresentar coloração mais intensa que qualquer região dos braços cromossômicos onde anteriormente se constatavam bandas G.

De maneira geral, no entanto, o comportamento da heterocromatina centromérica dos cromossomos X (α) e II (β) de D. nebulosa foi semelhante entre si, frente aos métodos de bandas por tripsina. Não se verificou diferença entre os locais que apresentavam banda C positiva e banda G positiva, pelo menos para os autossomos e X. Comportamento semelhante foi também observado nos cromossomos mitóticos de D. hydei (Beck e Srdiċ, 1979). Quanto ao cromossomo Y de D. nebulosa, este apresentou bandas em áreas vizinhas à região centromérica, à semelhança do que ocorre algumas vezes no cromossomo Y de D. hydei (Beck e Srdiċ, 1979). Para o caso do cromossomo Y de D. hydei os autores sugerem que tanto a banda G como a C reflitam diferenças na condensação cromatínica, mais do que uma distinção (qualitativa) em composição (Beck e Srdiċ, 1979). No entanto, para outros materiais existem fortes sugestões de que as regiões que aparecem menos coradas após o método de banda G tiveram suas histonas preferencialmente removidas (Comings et al., 1973; Mello, 1980c). Se se considerar que a tripsina em condições controladas remove da cromatina preferencialmente H_1 (Oudet et al., 1975) e que esta histona se prende muitas vezes com certa preferência a DNA rico em AT (Sponar e Sormová, 1972; Mello, 1980c), o fato de no cromossomo Y de D. nebulosa as áreas G+ estarem mais próximas ao centrômero está de acordo com os dados obtidos de banda C. Segundo estes dados, haveria riqueza em AT nos bra-

ços cromossômicos, em blocos ligeiramente afastados do centrômero, justamente onde não ocorreram bandas G. Por outro lado, nos outros cromossomos, locais banda G positivos coincidiram com as regiões centroméricas, banda C positivas, para as quais já se discutiu não ocorrer riqueza predominante de AT ou de CG.

Os cromossomos politênicos, por outro lado, quando tratados por tripsina, não tiveram a região do cromocentro diferentemente corada das regiões eucromáticas, à semelhança do que ocorreu com os métodos de banda C. Foram vistos sinais de remoção de material cromossômico na porção central do cromocentro e de muitas bandas. Mais uma vez se encontra, portanto, evidência de mudanças em composição de heterocromatina (α ou β) em relação à eucromatina, quando se passa da condição de cromossomos mitóticos para a de politênicos.

Os padrões de banda G para autossomos e cromossomos X mitóticos, à semelhança do que acontece com a banda C, são também relativamente simples para D. nebulosa, em comparação com os de D. hydei. Esta última, em contraste com D. nebulosa, ocupa uma posição muito elevada na árvore filogenética proposta por Throckmorton (1962).

V.3. Resposta ao tratamento com o composto Hoechst 33258 em cultura.

Nos cromossomos mitóticos das mesmas espécies de Drosophila que foram estudadas por Pimpinelli e colaboradores (1976), quanto ao padrão de banda C, Gatti e colabora-

dores (1976) verificaram o comportamento das áreas heterocromáticas tratadas pelo composto Hoechst 33258. Verificaram estes pesquisadores que a heterocromatina centromérica dos cromossomos mitóticos das espécies que respondiam homogeneamente ao bandado C, apresentavam certa heterogeneidade na resposta por ação do composto Hoechst, exibindo regiões drásticamente ou moderadamente descompactadas e regiões insensíveis. D. melanogaster e D. simulans apresentaram padrões de descompactação diferentes, conforme o cromossomo considerado, mostrando regiões que foram classificadas como drásticamente alongadas, como por exemplo, a região próxima ao centrômero do cromossomo Y de D. melanogaster. Em D. virilis, apenas os blocos heterocromáticos proximais dos cromossomos II, IV e X alongaram-se. O Y, no entanto, não sofreu modificação. Já, D. texana, apresentou notáveis diferenças em relação a D. virilis. A heterocromatina centromérica dos cromossomos IV e V sofreu grande descompactação, e a dos cromossomos II, III, X e extremidade do Y alongaram-se fracamente. E, surpreendentemente, os cromossomos de D. hydei e D. ezoana não foram afetados pelo composto Hoechst, com exceção do Y de D. hydei que apresentou um grau intermediário de descompactação, próximo ao centrômero em cerca de 10% das células analisadas. Admitiu-se que a heterogeneidade de resposta dessas regiões ao tratamento por Hoechst 33258 corresponderia à heterogeneidade ao nível molecular e/ou estrutural da heterocromatina envolvida (Gatti et al., 1976). Vem sendo admitido, por outro lado, que o composto Hoechst 33258 ligar-se-ia especificamente ao DNA rico em AT (Comings, 1975; Latt e Wohlleb, 1975; Pimpinelli et al., 1975; Rocchi et al., 1976) e que

outros fatores, como proteínas cromossômicas, poderiam estar envolvidas, determinando a especificidade de ação do composto Hoechst (Gatti et al., 1976).

Em D. nebulosa, não ocorreu alongamento diferencial das áreas heterocromáticas centroméricas dos cromossomos X, II e III. Todas essas regiões, banda C positivas, dscompactaram moderadamente e de maneira semelhante. Devem apresentar, portanto, um teor moderadamente significativo em pares de bases AT, o qual deve ser semelhante entre eles (Gatti et al., 1976). Também neste nível não apareceram características diferenciais entre os dois tipos de heterocromatina descritos por Pavan (1946a).

O padrão obtido para os cromossomos de D. nebulosa demonstrou ser razoavelmente simples, não se assemelhando ao de outras espécies de Drosophila estudadas, mais evoluídas que D. nebulosa, a não ser para um ou outro cromossomo. Com relação ao cromossomo Y, apenas uma pequena área vizinha à sua região centromérica, em alguns casos, e parte de um dos braços cromossômicos, em outros, apareceu alongada com o tratamento pelo composto Hoechst. Isto, embora tal cromossomo apresente regiões mais extensas, admitidas como ricas em AT com base nos dados de banda C discutidos acima, ao longo de ambos os braços cromossômicos. Possivelmente este achado esteja relacionado com diferenças em proteínas associadas mesmo a parte das regiões ricas em AT, à semelhança do que já se descreveu em outros materiais tratados com fluorocromos do tipo quinacrina (Comings, 1978; Comings et al., 1975; Gatti et al., 1976). Segundo Beck e Srdić (1979) variações nos tipos de resposta aos métodos de banda C, G e Q e/ou alonga-

mento com o composto Hoechst no cromossomo Y conforme as espécies de Drosophila consideradas, ilustram o alto grau de divergência evolutiva do mesmo, um cromossomo que foi por longo tempo considerado como um elemento geneticamente inativo. Sabe-se hoje, que o cromossomo Y contém uma série de 5 a 6 sítios responsáveis pela formação dos cromossomos plumosos nos núcleos de espermátócitos primários de Drosophila (Hess e Meyer, 1968). Recentemente foi verificado conter outros genes também relacionados à fertilidade em machos, mas que não formam alças visíveis (Leoncine, 1977), e genes para rRNA (Tartof e Dawid, 1976), residindo nestes fatos todos a importância de se conhecer suas propriedades citológicas (Beck e Srdić, 1979).

Os cromossomos politênicos não apresentaram alterações após tratamento por composto Hoechst 33258 em cultura, devido provavelmente à ausência de replicação naquela fase do desenvolvimento larval.

V.4. Basofilia e espectros de absorção de Feulgen

Os dados de basofilia e perfis espectrais de Feulgen levantados para D. nebulosa salientam semelhanças entre a heterocromatina que representa quase que exclusivamente o cromocentro (cromossomo II, região centromérica) (Pavan, 1946a) e a eucromatina. Além disso, pelo menos em termos visuais, as cores de basofilia exibidas pelas reduzidas áreas heterocromáticas dos outros cromossomos não diferem daquela da heterocromatina do cromossomo II e da eucromatina.

Nada semelhante às diferenças em padrões de basofilia encontrados em cromossomos politênicos de Rhynchosciara americana (Vidal, 1975) foi observado no material em estudo. Neste aspecto, o próprio exame visual dos cromossomos das duas espécies de dípteros sugere diferenças em basofilia metacromática entre os dois materiais. O mesmo é válido para uma comparação das características de basofilia de heterocromatina- eucromatina de D. nebulosa em relação às do hemíptero Triatoma infestans, no qual as propriedades de basofilia da heterocromatina diferem sensivelmente daquelas da eucromatina, principalmente em células proximais dos tubos de Malpighi (Mello, 1976, 1980b). Considerando-se o significado da basofilia nuclear após coloração com azul de toluidina nas condições deste trabalho (disponibilidade de grupos fosfatos hábeis, de ácido nucleico, em ligarem eletrostaticamente moléculas de azul de toluidina) (Lison, 1960; Davison e Butler, 1956; Miura e Ohba, 1967; Toepfer, 1970), pode-se concluir que as heterocromatinas de D. nebulosa, portanto, não se assemelham às de Rhynchosciara americana e muito menos às do Triatoma infestans em estrutura e/ou composição (Vidal, 1975; Mello, 1976, 1980b). As diferenças em complexos DNP que se imagina ocorrer entre a heterocromatina do cromocentro e eucromatina de D. nebulosa; não são, por outro lado, drásticas a ponto de exibirem padrões como os reportados para alguns outros sistemas (Vidal, 1975; Mello, 1976, 1980b). Não existe uma riqueza pronunciada em histonas ricas em arginina ou em lisina nas áreas cromatínicas investigadas, pois no primeiro caso seriam encontrados picos de absorção em λ mais longos que 600nm e, no segundo caso,

ao redor de 550nm (Mello e Vidal, 1973, 1977; Vidal et al., 1978).

A participação de RNA nos padrões de basofilia analisados nesse trabalho é ligeira (modificações pouco pronunciadas na localização dos picos de absorção) e eventual (regiões eucromáticas de fêmeas).

A diferença em índices metacromáticos quando se compara a heterocromatina do cromocentro com a eucromatina em fêmeas, após digestão com RNase, se relaciona possivelmente com a atividade de transcrição da eucromatina. Essa atividade pressupõe certo desenrolamento do filamento cromatínico, fazendo com que, por unidade de área de medida, decresça o número e proximidade das moléculas de azul de toluidina (Toepfer, 1970), o que, de certa forma, se acharia também relacionado com diferenças em núcleo-proteínas. No caso dos machos analisados, como possivelmente as eucromatinas não se encontravam transcrevendo em mesmo nível que nas fêmeas, tal diferença não se manifestou. Fala em favor dessa hipótese o achado de picos de absorção em $\lambda = 570\text{nm}$ em alguns dos machos, enquanto nas fêmeas os picos sempre se localizaram em 580nm.

Por outro lado, com base na análise dos espectros de absorção de Feulgen, é possível se admitir que, em D. nebulosa, um maior teor em sequências repetitivas de bases púricas no DNA, favorecendo o aparecimento de moléculas Schiff di-substituídas com aldeídos adjacentes (Mello, 1978b, 1980a), não deva ocorrer na heterocromatina mais representativa do cromocentro, comparada à eucromatina. Além disso é de se supor também que na heterocromatina mais representati-

va do cromocentro de D. nebulosa tal teor em sequências repetitivas não deva ser alto como o dos tipos de heterocromatina de sciarídeos e de Triatoma infestans (Mello, 1978b, 1980a; Mello e Silva, 1980). Essas conclusões se baseiam nos fatos descritos a seguir. Para um tempo de hidrólise que possibilita máxima depuração do DNA de heterocromatina e eucromatina (Kjellstrand, 1977a,b; Mello, 1979a), as curvas de Feulgen para os dois tipos de cromatina em estudo salientaram sempre, ao redor de $\lambda = 530-540\text{nm}$, um ombro discreto e semelhante entre si. O aparecimento deste ombro, bem como sua proeminência, vem sendo relacionados à ocorrência de moléculas Schiff di-substituídas com aldeídos vicinais, em função de um número significativo de sequências repetitivas, no DNA, e maior resistência dessas regiões aos fenômenos de solubilização com a hidrólise ácida (Mello, 1978b, 1980a). Esta resistência à solubilização seria devida à ligação de proteínas nucleares ((provavelmente não histônicas (Mello, 1980a)) nos fragmentos de ácido apurínico que conteriam tais sequências repetitivas de bases (Kjellstrand e Lamm, 1976; Mello, 1980a).

O perfil das curvas de Feulgen de D. nebulosa é muito semelhante ao encontrado no cromocentro (α - e β - heterocromatina) e em eucromatina de D. melanogaster (Mello e Recco, 1980). Por outro lado, difere dos perfis para a maioria das áreas heterocromáticas e para uma certa área eucromática rica em DNA repetitivo de Rhynchosciara americana (Mello, 1980a). Nestes últimos, o ombro é muito mais proeminente do que o observado na curvas de D. melanogaster (Mello e Recco, 1980) e de D. nebulosa.

Tais achados falam em favor de uma não especial riqueza em sequências repetitivas, com setores de purinas adjacentes, na heterocromatina mais representativa do cromocentro de D. nebulosa, ou seja, a heterocromatina do cromossomo II. Conforme já mencionado, esta heterocromatina teria características da β -heterocromatina descrita por Heitz (1934). Sabe-se que nas regiões heterocromáticas α e β de cromossomos politênicos de D. melanogaster os DNAs satélites repetitivos são uma fração diminuta do DNA total, uma vez que aí praticamente não se replicam (Gall et al., 1971). O DNA replicador da β -heterocromatina é da banda principal, muito semelhante ao da eucromatina (Gall et al., 1971). Isto tem sido chamado para explicar de certa forma os perfis de Feulgen encontrados em D. melanogaster (Mello e Recco, 1980). Possivelmente em D. nebulosa suceda o mesmo, o que seria mais um dado a favor de se considerar a heterocromatina proveniente do cromossomo II, no cromocentro, como uma β -heterocromatina. Os dados de banda C e as características de basofilia do cromocentro e bandas eucromáticas de D. nebulosa, semelhantes entre si, dão também um certo suporte às deduções concernentes ao espectro de Feulgen.

O deslocamento do pico de absorção de Feulgen para um λ mais longo, conforme verificado no presente trabalho, com o avanço da hidrólise, se devido à remoção tardia de proteínas nucleares como sugerido por Sibatini (1950 e 1953), não deve estar, no entanto, relacionado a histonas. Estas são rapidamente extraídas nos primeiros momentos do processo hidrolítico pertinente à reação de Feulgen. Um teste preliminar demonstrou que após 2 horas de hidrólise com

HCl 0,1N, a 37°C, a reatividade dos cromossomos ao método do fast-green alcalino de Alfert e Geschwind (1953) modificado por Deitch (1966) é praticamente abolida. Por outro lado, mesmo após 30 horas de hidrólise a reatividade ao método do fast-green ácido (Deitch, 1966) permanece tão forte quanto a verificada em cromossomos não tratados por HCl. Isto indica que apenas proteínas não histônicas acham-se presentes nos cromossomos submetidos à reação de Feulgen após longos tempos de hidrólise.

VI. CONCLUSÕES

1. As regiões heterocromáticas centroméricas dos cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais de larvas de Drosophila nebulosa, consideradas por Pavan (1946a) como pertencentes a dois tipos diversos (cromossomos II e X), não diferem em resposta aos métodos de bandas C e G e ao tratamento com o composto Hoechst 33258 em cultura (sabe-se que este último promove geralmente alongamento de regiões heterocromáticas ricas em pares de bases AT). Os centrômeros dos autossomos e cromossomo X responderam positivamente a todos esses métodos, ao contrário da eucromatina. Com base nos resultados obtidos com tais métodos, sugere-se que o teor de AT não seja excepcionalmente maior do que o de CG na heterocromatina dos centrômeros dos cromossomos acina mencionados. Uma ação diferencial de proteínas cromossômicas a ponto de afetar a resposta às metodologias empregadas parece não ocorrer nessas áreas heterocromáticas comparadas entre si.
2. Com relação à resposta aos métodos para obtenção de bandas e cultura em meio contendo composto Hoechst, o cromossomo Y mostrou diferir dos demais, salientando-se nele as peculiaridades de sua composição. Os métodos de bandas indicam certa riqueza em pares de bases AT no DNA de ambos os braços cromossômicos do Y, em áreas ligeiramente afastadas da região do centrômero e dos telômeros. Os resultados com o composto Hoechst, no entanto, mostraram que, dos dois braços cromossômicos, apenas um se alonga, o que

é altamente suspeito de que diferenças em proteínas cromossômicas sejam responsáveis por tal comportamento.

3. Nos cromossomos politênicos de glândulas salivares, o cromocentro respondeu aos métodos de bandas C e G de maneira muito semelhante à maioria das bandas das regiões eucromáticas. Esse resultado, nas glândulas salivares, possivelmente se deva a alterações qualitativas e quantitativas em tipos de DNA e/ou proteínas cromossômicas, quando se passa da condição de cromossomo mitótico para politênico.
4. Tanto para banda C quanto para banda G e resposta ao tratamento com o composto Hoechst, Drosophila nebulosa apresentou padrões de resposta mais simples (homogêneos) do que os de outras Drosophila mais evoluídas, as quais apresentam heterogeneidade em respostas. Variações nesse nível talvez possam estar relacionadas com especiação, como proposto por Gatti e colaboradores (1976).
5. Os dados de basofilia e perfis de absorção de Feulgen salientaram semelhanças entre a heterocromatina mais representativa do cromocentro (cromossomo II) e a eucromatina, em D. nebulosa. Com base nos resultados de basofilia, não existem, portanto, diferenças drásticas no número e proximidade de fosfatos livres do DNA acessíveis à ligação com moléculas de azul de toluidina nessas cromatinas. Com relação aos espectros de Feulgen, deduz-se não haver maior teor em sequências repetitivas de bases púricas do DNA na heterocromatina do cromocentro em comparação à eucromatina lembrando o que acontece em D. melanogaster (Mello e Recco, 1980). Nesta, em tecidos com

cromossomos politênicos, o teor em DNA satélite repetitivo do cromocentro é sensivelmente baixo, comparado com o de tecidos diplóides, graças a uma não replicação dessas sequências (Gall et al., 1971). As conclusões levantadas com os dados de basofilia e curvas espectrais de Feulgen para os cromossomos politênicos de D. nebulosa encontram um apoio nos resultados aos métodos de bandas C e G.

VII. RESUMO

Com o objetivo de se efetuar um estudo citoquímico e citofisiológico dos dois tipos de heterocromatina descritos por Pavan, em 1946, para Drosophila nebulosa (regiões heterocromáticas centroméricas principalmente dos cromossomos II e X), os cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais e os politênicos de glândulas salivares de larvas de 3º estágio desse díptero, foram submetidos a métodos para ^{obtenção de} bandas C e G e à ação do composto Hoechst 33258 em cultura. Em cromossomos politênicos, foram comparados, ainda, os padrões de basofilia e perfis espectrais de Feulgen do cromocentro (heterocromatina centromérica do cromossomo II, especialmente) com relação aos da eucromatina.

Os resultados relativos a bandas C, G e após tratamento com o composto Hoechst em cultura não salientaram diferenças de resposta entre a heterocromatina centromérica dos cromossomos mitóticos X e II. Da mesma forma se comportou o cromossomo III.

As regiões heterocromáticas centroméricas dos autossomos e cromossomo X responderam positivamente a esses métodos, sempre diferindo do comportamento das regiões eucromáticas. Os dados sugerem que o teor de bases AT do DNA não deva ser drasticamente superior ao de CG, nem que ocorram diferentes proteínas, cuja ação pudesse afetar os padrões de bandeado ou alongamento pela atuação do composto Hoechst, na heterocromatina desses cromossomos.

O cromossomo Y mitótico salientou diferença em composição dos demais cromossomos, com uma riqueza em AT em

ambos os braços, em áreas ligeiramente afastadas do centrômero e telômeros, e proteínas supostamente diferentes, quando se comparam os dois braços entre si.

As respostas relativamente homogêneas aos métodos de bandas C e G e ao tratamento com o composto Hoechst em cultura das áreas heterocromáticas de D. nebulosa comparadas às de outras Drosophila parecem estar de acordo com a posição das mesmas na árvore filogenética respectiva, se se considerar padrões mais complexos, encontrados nas Drosophila filogeneticamente superiores, como caráter mais evoluído.

Os dados de desnaturação-renaturação indicaram semelhanças entre a heterocromatina do cromocentro com relação à eucromatina, em cromossomos politênicos, possivelmente devido a alterações qualitativas e quantitativas em tipos de DNA e/ou proteínas cromossômicas, quando se passa da condição de cromossomos mitóticos (diplóides) para a de cromossomos politênicos.

Semelhanças entre essas regiões foram também determinadas em termos de características de basofilia e espectros de absorção de Feulgen. Sugere-se semelhança em número e proximidade de fosfatos livres do DNA e um teor em sequências de DNA repetitivo não sensivelmente diferente, quando se comparam tais regiões entre si.

VIII. ABSTRACT

The two types of heterochromatin described for Drosophila nebulosa by Pavan, in 1946 (heterochromatin of the centromeric regions of the X, Y and III chromosomes vs. that of the II chromosome) were studied cytochemically and cytophysiologically.

Mitotic chromosomes of neural ganglia and polytene chromosomes of salivary glands of third instar larvae were subjected to C- and G- banding procedures and incubated in a medium containing the 33258 Hoechst compound. Patterns of basophilia and Feulgen spectral absorption curves were also determined for the polytene chromosomes, the chromocenter region (mostly, heterochromatin of the II chromosome) being compared with the euchromatin.

The results did not enhance differences between the centromeric heterochromatin of the mitotic chromosomes X and II. The centromeric heterochromatin of the autosomes and X chromosome responded positively to C- and G- banding methods and moderately decondensed after being treated with Hoechst compound, always differing in relation to euchromatic regions. It is suggested that the AT content should not be strongly higher than the CG one in these heterochromatic regions. Differences in proteins, which could possibly affect the banding patterns or the decondensation due to the 33258 Hoechst compound, also do not appear to exist.

When the Y chromosome was compared with the other chromosomes in neural ganglia, differences in composi-

tion were found. Both arms of the Y chromosome display AT-rich areas slightly shifted from the centromere and telomeres. Different proteins are supposed to be associated to chromatin, when the two chromosome arms are compared to each other.

If the complex responses to C- and G- banding and to decondensation with the Hoechst compound, found in phylogenetically high Drosophila species could be considered an evolved character, the relatively homogeneous pattern depicted by the heterochromatic areas of D. nebulosa would be in agreement with its position in the phylogenetic tree proposed for these flies.

The denaturation-renaturation data indicate a similarity between heterochromatin of the chromocenter and the euchromatin, of the polytene chromosomes, possibly due to qualitative and quantitative changes in DNA types and/or chromosome proteins which are supposed to occur when diploid chromosomes turn into polytene chromosomes.

These chromosome regions do not also differ in characteristics of basophilia and Feulgen absorption spectrum. The number and proximity of the DNA free phosphate groups and the quantity of repetitive DNA sequences are suggested not to be markedly different, when these regions are compared to each other.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Adkisson, K.P.; Perreault, W.J. and H.Gay. 1971. Differential fluorescent staining of Drosophila chromosomes with quinacrine mustard. Chromosoma 34 (2): 190-205.
- Alfert, M. and I.I. Geschwind. 1953. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 39: 991-999.
- Arrighi, F.E. and T.C. Hsu. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics 10: 81-86.
- Arrighi, F.E.; Hsu, T.C.; Saunders, P. and G.F. Saunders. 1970. Localization of repetitive DNA in the chromosomes of Microtus agrestis by means of in situ hybridization Chromosoma 32: 224-236.
- Arrighi, F.E.; Hsu, T.C.; Pathak, S. and H. Sawada. 1974. The sex chromosomes of Chinese hamster: Constitutive heterochromatin deficient in repetitive DNA sequences, Cytogenet. Cell Genet. 13: 268-274.
- Barnett, R.I.; Gray, V.A. and E.A. Mackinnon. 1980. Effects of acetic acid-alcohol, trypsin, histone H₁ and histone fragment on giemsa staining patterns in chromosomes Histochemistry 65: 207-215.
- Barr, H.S. and J.R. Ellison. 1971. Quinacrine staining of chromosomes and evolutionary studies in Drosophila. Nature 233: 190-
- Beck, H. and Z. Srdić. 1979. Heterochromatin in mitotic chromosomes of Drosophila hydei. Genetica 50: 1-10.
- Bedo, D.G. 1975. C-banding in polytene chromosomes of Simulium ornatipes and S. melatum (Diptera: Simuliidae). Chromosoma (Berl.) 51: 291-300.

- Bergeron, J. A. and M. Singer. 1958. Metachromasy: an experimental and theoretical reevaluation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 (4): 433-457.
- Blumenfeld, M. and H. S. Forrest. 1971. Is Drosophila dAT on the Y chromosome? *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)* 68: 3145 - 3149.
- Bodenstein, D., 1950. The postembryonic development of Drosophila. In: *Biology of Drosophila*. Edited by M. Demerec, p. 275-367, New York: John Wiley.
- Bostock, C.J. and S. Christie. 1975. Chromosomes of a cell line of Dipodomys panamintinus (Kangaroo rat). A banding and autorradiographic study. *Chromosoma* 51: 25-34.
- Botchan, M.; Kram, R.; Schmid, C.W. and J. E. Hearst. 1971. Isolation and chromosomal localization of highly repeated DNA sequences in Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 68: 1125-1129.
- Brown, S.W. 1966. Heterochromatin. *Science* 151: 417-425.
- Burkholder, G.D. and M.G. Weaver. 1977. DNA-protein interactions and chromosome banding. *Exp. Cell Res.* 110: 251-262.
- Cavalcanti, A.G.L.. 1948. Geographic variation of chromosome structure in Drosophila prosaltans. *Genetics* 33: 529-536.
- de la Chapelle, A.; Schröder, J. and R.K. Selander. 1971. Repetitious DNA in mammalian chromosomes. *Hereditas* 69: 149-153.

- Comings, D.E. 1975. Mechanisms of chromosome banding. VIII. Hoechst 33258 - DNA interaction. *Chromosoma* 52: 229-243.
- Comings, D.E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Annual Reviews Genetic* 12: 25-46.
- Comings, D.E. and E. Mattoccia. 1972. DNA of mammalian and avian heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 71: 113-131.
- Comings, D.E.; Avelino, E.; Okada, T.A. and H.E. Wyandt. 1973. The mechanism of C - and G - banding of chromosomes. *Exp. Cell Research.* 77: 469-493.
- Comings, D.E.; Kovacs, B.C.; Avelino, E. and D.C. Harris. 1975. Mechanisms of chromosome banding. IV. Quinacrine banding. *Chromosoma* 50: 111-145.
- Comings, D.E.; Harris, D.C.; Okada, T.A. and G.P. Holmquist. 1977. Nuclear proteins. IV. Non-histones proteins of *Drosophila virilis* heterochromatin and euchromatin. *Exp. Cell. Res.* 105: 349-365.
- Cordeiro, M.; Wheeler, L.; Lee, C.S.; Kastriasis, C.D. and R.H. Richardson. 1975. Heterochromatin chromosomes and DNAs satellites of *Drosophila nasutoides*. *Chromosoma (Berl)* 51: 65-73.
- Davison, P.F. and J.A.U. Butler. 1956. The chemical composition of calf thymus nucleoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 21: 568-573.
- Deaven, L.L. and D.F. Petersen. 1973. The chromosomes of CHO, an aneuploid chinese hamster cell line: G-band, C-band and autoradiographic analysis. *Chromosoma* 41: 129-144.
- Deitch, A.D. 1966. Cytophotometry of proteins. In: Introduction to quantitative cytochemistry. Edited by Wield G.L., Acad. Press, New York, p. 451-465.

- Desai, L.S.. 1966. Effects of histones and polylysine on the synthetic activity of polytene chromosomes of Diptera. Ph. D. dissertation. Univ. of Bruxelles, Belgium.
- Dolfini, F.. 1974. The distribution of repetitive DNA in the chromosomes of cultured cells of Drosophila melanogaster. Chromosoma 44: 383-391.
- Dutrillaux, B.; Grouchy, J.; Finaz, C. and J. Lejeune. 1971. Mise en evidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier). C.R.Acad. Sci. Paris, Ser. D., 273: 587.
- Eckhardt, R.A. and J.G. Gall. 1971. Satellite DNA associated with heterochromatin in Rhynchosciara. Chromosoma 32: 407-427.
- Ellison, J.R. and H.J. Barr. 1971. Differences in the quinacrine staining of the chromosomes of a pair simbling species: Drosophila melanogaster and Drosophila simulans. Chromosoma 34: 424-435.
- Ellison, J. R. and H.J. Barr. 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late replication and high AT content in Samoaia leonensis. Chromosoma 36: 375-390.
- Ennis, T.J.. 1974. Chromosome structure in Chilocorus (Coleptera: Coccinellidae). I. Fluorescent and giemsa banding patterns. Canad. J. Genet. Cytol. 16: 651-661.
- Ewing, G.W.. 1972. A absorção de radiação: ultravioleta e vi sível. In: Métodos instrumentais de análise química. 1a. Edição; tradução de A.G. Albanese e J.T. de Souza Campos. São Paulo, Edgard Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo, Volume I, p. 41-87.

- Fansler, B.Y.; Travaglini, E.C.; Loeb, L.A. and Y. Schultz. 1970. Structure of Drosophila melanogaster dAT replicated in an "in vitro" system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40: 29-30.
- Gagné, R.; Tanguay, R. and C. Laberge. 1971. Differential staining patterns of heterochromatin in man. Nature New Biology 232: 29-30.
- Gall, J.C. and M.L. Pardue. 1971. Nucleic acid hybridization in cytological preparations. Methods in enzymology, 12 (Academic Press, NY).
- Gall, J.G.; Cohen, E.H. and M.L. Polan. 1971. Repetitive DNA sequences in Drosophila. Chromosoma 33: 319-344.
- Gallimore, P.H. and C.R. Richardson. 1973. An improved banding technique exemplified in the karyotype analysis of two strains of rat. Chromosoma 41: 259-263.
- Gatti, M.; Pimpinelli, S. and G. Santini. 1976. Characterization of Drosophila heterochromatin. I. Staining and decondensation with Hoechst 33258 and quinacrine. Chromosoma (Berl) 57: 351-375.
- Hägele, K. 1977. Differential staining of polytene chromosome bands in Chironomus by Giemsa banding methods. Chromosoma 59: 207-216.
- Harbers, E. 1969. Nucleinsäuren. Biochemie und Funktionen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, p. 22 - 23.
- Heitz, E. 1933. Die somatische Heteropyknose bei Drosophila melanogaster und ihre genetische Bedeutung. Z. Zellforsch. 20: 237-287.
- Heitz, E. 1934. Über α - und β - Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromomeren bei Drosophila. Biol. Zbl. 54: 588-609.

- Hennig, W.. 1972. Highly repetitive DNA sequences in the genome of Drosophila hydei. I. Preferential localization in the X chromosomal heterochromatin. J. molec. Biol. 71: 407-417.
- Hennig, W.. 1973. Molecular hybridization of DNA and RNA in situ. Int. Rev. Cytol. 36: 1-44
- Hennig, W.; Hennig, I. and H. Stein. 1970. Repeated sequences in the DNA of Drosophila and their localization in giant chromosomes. Chromosoma (Berl.) 32: 31-63.
- Hess, O. and G.F. Meyer. 1968. Genetic activities of the Y chromosome in Drosophila during spermatogenesis. Adv. Genet. 14: 171-223.
- Hilwig, I. and A. Groop. 1973. Descondensation of constitutive heterochromatin in L cell chromosomes by a benzimidazole compound ("33258 Hoechst). Exp. Cell Res. 81: 474-477.
- Hinton, T.. 1942. A comparative study of certain heterochromatic region in mitotic and salivary gland chromosomes of Drosophila melanogaster. Genetics 27: 119-127.
- Holmquist, G.. 1975a. Hoechst 33258 fluorescence staining of Drosophila chromosomes. Chromosoma 49: 333-356.
- Holmquist, G.. 1975b. Organization and evolution of Drosophila virilis heterochromatin. Nature 257: 503-506.
- Hsiang, W.. 1959. The distribution of heterochromatin in Drosophila tumiditarsus. Cytologia 15: 149-152.
- Hsu, T.C.. 1971. Heterochromatin pattern in metaphase chromosomes ^{of} Drosophila melanogaster. Journal Heredity 62: 285-287.

- Jalal, S.M.; Clark, R.W., Hsu, T.C. and S. Pathak. 1974a.
Cytological differentiation of constitutive heterochromatin.
Chromosoma 48: 391-403.
- Jalal, S.M.; Pfeiffer, R.A.; Pathak, S. and T.C. Hsu. 1974b.
Subdivision of human Y chromosome. *Humangenetik* 24: 59-65.
- Jones, K. 1970.. Chromosomal and nuclear location of mouse
satellite DNA in individual cells. *Nature* 225: 912-915.
- Jones, K.W. and F.W. Robertson. 1970. Localization or
reiterated nucleotide sequences in *Drosophila* and mouse
by *in situ* hybridization of complementary RNA. *Chromosoma*
(Berl.) 31: 331-345.
- Kato, H. and K. Moriwaki. 1972. Factors involved in the
production of banded structures in mammalian chromosomes.
Chromosoma 38: 105-120.
- Kjellstrand, P.T.T.. 1977a. Temperature and acid concentra-
tion in the search for optimum Feulgen hydrolysis conditions.
J. Histochem. Cytochem. 25: 129-134.
- Kjellstrand, P.T.T.. 1977b. Control of extraction of deoxy-
ribonucleic acid and apurinic acid by polyethylene glycol
in Feulgen hydrolysis. *J. Histochem. Cytochem.* 25: 371-375.
- Kjellstrand, P. and C.J. Lamm. 1976. A model of the breakdown
and removal of the chromatin components during Feulgen acid
hydrolysis. *Histochem. J.* 8: 419-430.
- Lakhotia, S.C.. 1974. EM autoradiographic studies on polytene
nuclei of *D. melanogaster*. III. Localization of non - re-
plicating chromatin in the chromocentre heterochromatin.
Chromosoma (Berl.) 46: 145-159.

- Lakhotia, S.C. and J. Yacob. 1974. EM autoradiographic studies on polytene nuclei of Drosophila melanogaster. II. Organization and transcriptive activity of the chromocentre. Exp. Cell Res. 86: 253-263.
- Lakhotia, S.C. and M. Kumar. 1979. Heterochromatin in mitotic chromosomes of Drosophila nasuta. Cytobios 21: 79-89.
- Latt, S.A. and J.C. Wohlleb. 1975. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin and metaphase chromosomes. Chromosoma (Berl.) 52: 297-316.
- Lee, C.S. and L. Collins. 1977. Q - and C - bands in the metaphase chromosomes of Drosophila nasutoides. Chromosoma (Berl.) 61: 57-60.
- Leoncini, O. 1977. Temperatursensitive mutanten im Y - chromosom von Drosophila hydei. Chromosoma 63: 329-357.
- Lison, L. 1955. Variation de la basophile pendant la maturation du spermatozoide chez le rat et sa signification histochemique. Acta histochem. 2: 47-67.
- Lison, L., 1960. "Histochemie et Cytochimie Animales". Gauthier - Villars, Paris.
- Lison, L. and W. Mutsaers. 1950. Metachromasy of nucleic acids. Quart. J. microsc. Sci. 91: 309-313.
- Mace, M.L.Jr.; Tevethia, S.S. and B.R.Brinkley. 1972. Differential immunofluorescent labeling of chromosomes with antisera specific for single stranded DNA. Exp. Cell Res. 75: 521-523.
- Machado-Santelli, G.M.; Bonaldo, M.F.; Santelli, R.V.; Eckhardt, R.A. and F.J.S. Lara. 1979. Distribution of repetitive DNA sequences in the polytene chromosomes of Rhynchosciara americana. Experientia 35: 474-475.

- Marcus, M. and K. Sperling. 1979. Condensation - inhibition by 33258 - Hoechst of centromeric heterochromatin in prematurely condensed mouse chromosomes. *Exp. Cell Res.* 123: 406-411.
- Marcus, M.; Nielsen, K.; Goitein, R. and A. Groop. 1979. Pattern of condensation of mouse and chinese hamster chromosomes in G₂ and mitosis of 33258 - Hoechst - Treated cells. *Exp. Cell Res.* 122: 191-201.
- Matsukuma, S. and T. Utakoji. 1977. Non-histone protein associated with centromeric heterochromatin in the mouse chromosome. *Exp. Cell Res.* 105: 217-222.
- Mckenzie, W.H. and H.A. Lubs. 1973. An analysis of the technical variables in the production of C bands. *Chromosoma (Berl.)* 41: 175-182.
- Mello, M.L.S. 1978a. Heterocromatina. *Ciência e Cultura* 30 (3): 290-303.
- Mello, M.L.S. 1978b. Feulgen-DNA absorption spectrum of euchromatin and constitutive heterochromatin. *J. Histochem. Cytochem.* 26: 1082-1086.
- Mello, M.L.S. 1979a. Patterns of lability towards acid hydrolysis in heterochromatins and euchromatins of Triatoma infestans Klug. *Cell. Mol. Biol.* 24: 1-16.
- Mello, M.L.S. 1979b. A heterocromatina constitutiva de Panstrongylus megistus Burmeister. 29 Encontro de geneticistas Paulistas, São José do Rio Preto (SP). Resumos, p. 24-25.

- Mello, M.L.S. 1980a. Feulgen-DNA absorption curves of polytene chromosome regions of Rhynchosciara americana. Histochem. J. 12 (no prelo).
- Mello, M.L.S. 1980b. Toluidine blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of Triatoma infestans Klug. Subm. ã publ.
- Mello, M.L.S. 1980c. Heterochromatin in somatic nuclei of Triatoma infestans. 2nd Int. Congress on Cell Biology, Berlin. Abstract.
- Mello, M.L.S. and S.M. Recco. 1980. Absorption spectrum of Feulgen-stained polytene chromosomes of Drosophila melanogaster Subm. ã publ..
- Mello, M.L.S. e M.J.P.L. Silva. 1980. The Feulgen-deoxyribonucleic acid absorption spectra in salivary glands of the dipteran, Bradysia spatitergum. Cell. Mol. Biol. (no prelo).
- Mello, M.L.S. and B.C. Vidal. 1973. Linear dichroism and anomalous dispersion of birefringence on sperm heads. Acta Histochem. 45: 109-114.
- Mello, M.L.S. and B.C. Vidal. 1977. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper, Staurorhectus longicornis Giglio-Toss. Advances in invertebrate reproduction, (Eds. K.G. Adiyodi and R.G. Adiyodi), 1: 75-83.
- Mello, M.L.S. e B.C. Vidal. 1978. A reação de Feulgen. Ciência e Cultura 30 (6): 665-676.
- Merrick, S.; Ledley, R.S. and H.A. Lubs. 1973. Production of G and C banding with progressive trypsin treatment. Pediat. Res. 7: 39-44.

- Mezzanotte, R.; Ferrucci, L. and C. Cotini. 1979. Identification of sex chromosomes and characterization of the heterochromatin in Culiseta longiareolata (Macquart, 1838). *Genetica* 50 (2): 135-139.
- Miura, A. and Y. Ohba. 1967. Structure of nucleohistone. III. Interaction with toluidine blue. *Biochim. Biophys. Acta* 145: 436-445.
- Mogford, D.J. 1978. Centromeric heterochromatin in Lachenalia tricolor (L.) Thumb. *J.S.Afr. Bot.* 44 (2): 111-117.
- Müller, H.J.; Raffel, D.; Gershenson, S.M. and A.A. Prokofjeva-Belgovskaya. 1937. A further analysis of loci in the so-called "inter-region" of the X chromosome of Drosophila. *Genetics* 22: 87-93.
- Oudet, P.; Gross-Bellard, M. and P. Chambon. 1975. Electron microscopy and biochemical evidence that chromatin structure in a repeating unit. *Cell* 4: 281-300.
- Pardue, M.L.; Gerbi, S.A.; Eckhardt, R.A. and J.G. Gall. 1970. Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. *Chromosoma (Berl.)* 29: 268-290.
- Pardue, M.L.; and J.G. Gall. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356-1358.
- Pathak, S. and F.E. Arrighi. 1973. Loss of DNA following C - banding procedures. *Cytogenet. Cell Genet.* 12: 414-422.
- Pathak, S. and A.D. Stock. 1974. The X-Chromosomes of mammals: karyological homology as revealed by banding techniques. *Genetics* 78: 703-714.

- Pavan, C. 1946a. Two types of heterochromatin in Drosophila nebulosa. Genetics 32: 137-145.
- Pavan, C. 1946b. Chromosomal variation in Drosophila nebulosa. Genetics 31: 546-557.
- Perreault, W.J.; Kaufmann, B.P. and H. Gay. 1973. Repeated DNA sequences in the heterochromatic Y chromosome of adult Drosophila melanogaster. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 70 (3): 773-777.
- Pimpinelli, S.; Gatti, M. and A. De Marco. 1975. Evidence for heterogeneity in heterochromatin of Drosophila melanogaster. Nature 256: 335-337.
- Pimpinelli, S.; Santini, G. and M. Gatti. 1976. Characterization of Drosophila heterochromatin II. C - and N - banding. Chromosoma 57: 377-386.
- Rae, P.M.M. 1970. Chromosomal distribution of rapidly reannealing DNA in Drosophila melanogaster. Proc. natl. Acad. Sci. (USA) 67: 1018-1025.
- Ray, M. and J.L. Hamerton. 1973. Constitutive heterochromatin in mouse chromosomes treated with trypsin. Canad. J. Genet. Cytol. 15: 1-7.
- Renkawitz, R. 1978a. Characterization of two moderately repetitive DNA components localized within the β - heterochromatin of Drosophila hydei. Chromosoma 66: 225-236.
- Renkawitz, R. 1978b. Two highly repetitive DNA satellites of Drosophila hydei localized within the α - heterochromatin of specific chromosomes. Chromosoma 66: 237-248.

- Rocchi, A.; Prantera, G.; Pimpinelli, S. and M. Di Castro. 1976. Effects of Hoechst 33258 on chinese hamster chromosomes. *Chromosoma* 56: 41-46.
- Schnedl, W. 1971. Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma* 34: 448-454.
- Schnedl, W. 1973. Analysis of the human Karyotype by the recent banding techniques. *Archiv. Für Genetik* 46: 1-34.
- Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* II: 971-972.
- Sibatani, A. 1950. Effects of histone and other proteins on the Feulgen reaction. *Nature* 166: 355-356.
- Sibatani, A. 1953. Feulgen reaction and quantitative cytochemistry of desoxyribose nucleic acid. 3. Effects of histone on the Feulgen reaction in vitro. *J. Biochem. Tokyo* 40: 119-134.
- Sorsa, M. 1969. Ultrastructure of the chromocentre heterochromatin in Drosophila melanogaster. *Ann. Acad. Scient. Fenn., Serv. A IV*, 146: 1
- Šponar, J. and Z. Šormová. 1972. Complexes of histone F₁ with DNA in 0,15M NaCl. Selectivity of interaction with respect to DNA composition. *Eur. J. Biochem.* 29: 99-103.
- Stocker, A.J.; Fresquez, C. and G. Lentzios. 1978. Banding studies on the polytene chromosomes of Rhynchosciara hollaenderi. *Chromosoma (Berl.)* 68: 337-356.
- Sumner, A.T.; Evans, H.J. and R.A. Buckland. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology* 232: 31-

- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306.
- Tartof, K.D. and I.B. Dawid. 1976. Similarities and differences in the structure of X and Y chromosome rRNA genes of Drosophila. *Nature* 263: 27-30.
- Throckmorton, L.H. 1962. The problem of phylogeny in the genus Drosophila. The University Texas Publication 6205: 207-343.
- Toepfer, K. 1970. Die thiazinfarbstoffe. *Progr. Histochem. Cytochem.* 1: 277-354.
- Vidal, B.C. 1972. Banding and anisotropic staining of chromosomes. *Beitr. Path. Bd.* 146: 285-288.
- Vidal, B.C. 1975. Cromossomos politênicos: diferenças estruturais reveladas pela basofilia metacromática. *Ciência e Cultura* 27 (1): 54-56.
- Vidal, B.C. 1979. The effect of clupein an anisotropy and basophilia of polytene chromosomes. *Histochemistry* 60: 1-8.
- Vidal, B.C.; Mello, M.L.S. e V.A. Zanardi. 1978. Alteração nos padrões de basofilia e anisotropia de complexos DNP durante a espermatogênese de rato. In: Resumos da 30a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, pag. 434-435.
- Vosa, C.G. 1970. The discriminating fluorescence patterns of the chromosomes of Drosophila melanogaster. *Chromosoma(Berl.)* 31: 446-451.
- Wang, H.C. and S. Fedoroff. 1972. Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biol.* 235: 52-53.

- Ward, C.L. 1949. Karyotype variation in Drosophila. The University of Texas Publications 4920: 70-79.
- Weisblum, B. and E. Haenssler. 1974. Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. Chromosoma 46: 255-260.
- Wheeler, L.L. and L.C. Altemburg. 1977. Hoechst 33258 banding of Drosophila nasutoides metaphase chromosomes. Chromosoma (Berl.) 62: 351-360.
- Yasmineh, W.G. and J.J. Yunis. 1969. Satellite DNA in mouse autosomal heterochromatin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35: 779-782.
- Yasmineh, W.G. and J.J. Yunis. 1970. Localization of mouse satellite DNA in constitutive heterochromatin. Exp. Cell. Res. 5: 69-75.
- Yasmineh, W.G. and J.J. Yunis. 1971. Repetitive DNA in Microtus agrestis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 43: 580-587.
- Yunis, J.J., Yasmineh, W.G. 1971. Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. Science 174: 1200-1209
- Yunis, J.J.; Roldan, L.; Yasmineh, W.G. and J.C.Lee. 1971. Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. Nature New Biol. 231: 532- 533.