

FISIOLOGIA CROMOSOMICA, SINTESIS DE PROTEINAS Y ACIDO RIBONUCLEICO EN LAS GLANDULAS SALIVARES DE *Rhynchosciara millery* DIPTERA (Sciaridae)

Felipe García
Departamento de Biología
Martha C. Domínguez
Departamento de Microbiología
Universidad del Valle

Abstract

In the salivary glands of *R. millery* several citological and biochemical characteristics have been studied. Between the parameters choised to make the research were considered: opening and closing events of puffing, synthesis of ceptain RNA and protein fractions along larval development. In general the synthetic activity of RNA in the salivary glands was low. Using PAGE-SDS, was possible the detection of some specific polipeptide fractions. The Mr28kd polipeptide detected in the S1 section, was correlated with the translational product of B-2 DNA puff. Protein band of 18 kd was determined as the genic product of C-3 DNA puff. The results obtained show that the RNA and protein synthesis are moleculary controled events occurring during the glandular development.

Resumen

Se han estudiado algunas características citológicas y bioquímicas de las glándulas salivares de *R. millery*. Entre los parámetros escogidos para la realización de este trabajo se consideraron: Eventos de apertura y cierre de determinados "puffs"; síntesis de poblaciones de RNA y polipéptidos específicos a lo largo

de los períodos finales del desarrollo larval de la especie. En términos generales la actividad de síntesis de RNA de las glándulas salivares es baja. Empleando electroforesis en geles de poliacrilamida, fué posible detectar varias fracciones polipeptídicas. El polipéptido de Mr 28 Kd detectado en la sección S_1 , se correlacionó con el producto de traducción del puff de DNA B-2. La banda protéica de 18 Kd se determinó como el producto génico del puff de DNA - C - 3. Los resultados obtenidos, muestran que la síntesis de RNA y proteínas en glándulas salivares de esta especie son eventos moleculares controlados a nivel del desarrollo glandular.

INTRODUCCION

Las glándulas labiales de los insectos son estructuras de origen ectodérmico que se abren a la cavidad preoral, y su función puede variar según la especie. En una misma especie estos órganos suelen presentar diferentes papeles durante el desarrollo ontogenético¹. Estas glándulas en los Dípteros son denominadas salivares, por analogía con las glándulas salivares de los mamíferos, pero sin embargo no poseen una función digestiva. En el género *Rhynchosciara*, los estudios realizados en *R. americana*, indican que una de las funciones de las glándulas salivares, durante ciertos estudios larvales, es sintetizar una secreción viscosa que mantiene la lubricación externa de la larva². Sin embargo cuando la larva para de alimentarse, la función principal pasa a ser la de producción de una secreción protéica que es empleada para la construcción del casulo común en cuyo interior ocurre la metamorfosis^{3,4,2}.

Los cambios del funcionamiento a lo largo del desarrollo larval y pupal convierten a la glándula salivar bastante interesante para el estudio de la síntesis de RNA poli A⁺ y proteínas específicas, así como también para la elucidación de los mecanismos de control hormonal involucrados en la reprogramación de la síntesis protéica y de RNA⁵.

En *Rhynchosciara* después que las glándulas salivares están completamente formadas en el embrión, sus células no se dividen más⁶. Sucesivas replicaciones del DNA de la célula (Fases S repetidas), seguidas de períodos en que el DNA no se replica (Fase G), dan como resultado un aumento del tamaño celular y un conjunto de

cromosomas especiales, en los cuales el gran número de cromátidas hijas permanecen asociadas. Este proceso da como resultado la formación de una estructura multiestriada, compuesta por bandas e interbandas. Este arreglo de cromátidas, es denominado cromosoma politénico⁷.

El patrón de bandas e interbandas es constante en todos los tejidos politénicos de la misma especie^{8,7}. Sin embargo, durante períodos determinados del desarrollo larval, suceden eventos de expansión de bandas específicas, denominadas "PUFFS". Este proceso fue inicialmente observado por Beerman (1952)⁸ en *Rhynchosciara angelae*.

La demostración de que el patrón de abertura y cierre de estos puffs era dependiente del tipo celular, y de su período de desarrollo ontogénico, llevaron a estos autores a sugerir que el fenómeno de "Puffing", era una manifestación morfológica de la actividad génica.

Algunos puffs que se observan en larvas de Dípteros de la familia Sciaridae, además de incorporar precursores de RNA, presentan una intensa síntesis de DNA, la cual es exclusiva de la región cromosómica del puff. Esta síntesis extra de DNA refleja el proceso de Amplificación génica de *loci* involucrados, y a aquellos puffs que muestran tal efecto se les denomina puffs de DNA⁹. Los puffs de DNA, constituyen el primer caso descrito de aumento diferencial de la cantidad de DNA de una región cromosómica.

Mediante el análisis de patrones de electroforesis de proteínas sintetizadas en diferentes períodos de la vida larval en *Rhynchosciara americana*, varios autores evidenciaron la aparición de polipéptidos específicos en determinadas fases del desarrollo glandular. De esta manera, correlacionaron la síntesis de una proteína de peso molecular 21 Kd (P₉) con el Puff B 2. Este polipéptido se encuentra con actividades específicas muy altas, justamente durante el período de abertura del mencionado Puff. Otro péptido de peso molecular 18 Kd, está correlacionado con el Puff de DNA C-3. El análisis de las proteínas de la secreción salivar de larvas en el 5º y 6º períodos, mostró que dichos polipéptidos hacen parte integral del casulo común en el cual las larvas pupan³.

La importancia de este trabajo, radica en la posibilidad de obtener resultados sobre la síntesis de RNA y proteínas en períodos del desarrollo larval de *R. millery*, una especie que aunque bastante rela-

cionada con *R. americana*, muestra patrones de desarrollo diferentes. Los resultados extraídos de las experiencias que se llevaron a cabo, sirvieron de comparación con los ya obtenidos de otras especies de Sciaridos, a fin de poder dar una explicación a nivel molecular de los posibles controles en la pupación de este grupo tan particular de insectos.

METODOLOGIA

Cultivo de larvas

En este trabajo se usaron larvas de *Rhynchosciara millery* criadas en laboratorio en las condiciones descritas previamente por Lara *et al* (1965)¹⁰, o colectadas en el litoral del Estado de Sao Paulo. La edad fisiológica fué determinada según Terra (1972)¹¹ y Terra *et al* (1973)¹². A no ser que se especifique lo contrario, se usaron hembras del cuarto estadio larval que fue dividido por Terra *et al* (1973)¹², con base en las características morfológicas y fisiológicas de los animales.

Preparaciones citológicas

Las glándulas eran fijadas en etanol, ácido acético 3:1 (10 minutos), y enseguida coloreadas con orceína 3% en ácido acético 60%, 5 minutos; o eran directamente "aplastados" entre la lámina y la laminilla en ácido acético 45% y observadas por microscopio de contraste de fase.

Administración de precursores radioactivos

Incorporación "In vitro".

Precursores de RNA.

Las cantidades de Uridina ³H según el experimento, eran secadas en láminas excavadas gruesas. El residuo seco era disuelto en volúmenes apropiados de medio TBGPL¹² que usualmente era de 10 μ l para cada par de glándulas salivares, o segmentos aislados S₁.

Precursor de proteínas.

En todos los experimentos se usó leucina ^3H . Volúmenes de 5 ó 10 μl del aminoácido eran secados sobre una láminilla siliconizada y el residuo disuelto en 5 μl de medio TBGPL en cuya preparación fué omitida Leucina no radioactiva. Después de 5 minutos (tiempo necesario para una completa disolución del aminoácido marcado isotópicamente) se colocaba en cada gota un segmento glandular S_1 , dejando por cincuenta y cinco minutos que ocurriera la incorporación.

En ambos casos (incorporación de ribonucleótidos (^3H) o Leucina (^3H)) los sistemas de incubación eran colocados dentro de placas de petri cubiertas con fondo de agar 2% para mantener la humedad interna, y todo el conjunto era mantenido a 22°C por los tiempos de incubación especificados para cada experiencia.

Extracción de ácidos ribonucléicos

Consistió en el procedimiento desarrollado por Daneholdt (1972)¹³ con algunas modificaciones introducidas por García (1984)¹⁴. La determinación de la actividad específica del RNA marcado, se realizó por el método de Fleck y Munro (1962)¹⁵ modificado por Meneghini *et al* (1968)¹⁶.

Extracción de proteínas de glándula salivar

Después de la incubación en el medio conteniendo Leucina ^3H , los segmentos glandulares fueron lavados en solución de Ringer para *Rhynchosciara* y solubilizados, calentándolos por una hora a 50° C, en el tampón Tris-Hcl 60 mM, EDTA 0.5 mM; SDS 2.5% ; Glicerol 10% , 2-Mercapto-etanol y azul de bromofenol 0.005% . Una sección proximal de la glándula S_1 , era disuelta en 25 μl . Las glándulas completas eran disueltas en 50 μl .

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

El método utilizado fué el descrito por Laemli (1970)¹⁷. La electroforesis era hecha con tres tampones diferentes con discontinuidad de pH y concentración. La concentración del gel de corrida fué de 15% ,

la del gel de apilamiento 3.5% . La determinación de peso molecular se hizo según Laemli (1970)¹⁷.

Fluorografía de proteínas

Las placas de geles de poliacrilamida fueron impregnadas con PPO disuelto en DMSO, como está descrito por Bonner y Laskey (1974)¹⁸ y luego secadas ¹⁹ a 60°C con el auxilio de una bomba de vacío. Después de secado el gel, éste fué cubierto con una película para Rayos X (RP/R - 54 ó XR - 5 Kodak). Preexpuesto a una "lamparada" de luz suficiente para ocasionar un aumento de fondo de 0.150 unidades de absorbancia a 540 nm. Los geles fueron expuestos por tiempos variables a -70°C y posteriormente la película de Rayos X fué revelada.

El cálculo de la concentración de cada una de las fracciones protéicas caracterizadas, se llevó a cabo adaptando la metodología descrita por Maxam y Gilbert (1977)²⁵. Cada una de las bandas era precipitada en etanol, centrifugada, secada y resuspendida en solución Tris Glicina; fueron cuantificadas empleando la metodología descrita por Meneghini *et al*(1968)¹⁶.

RESULTADOS

Principales eventos citológicos de las glándulas salivares de *R. millery*

Habiendo caracterizado en condiciones de laboratorio el ciclo vital de *R. millery*, procedimos al estudio citogenético del comportamiento de los cromosomas de las glándulas salivares de esta especie. En la tabla 1 se presentan los principales eventos citológicos de la sección S_1 de las glándulas salivares de *R. millery*. Para mejor entendimiento de la fisiología de los cromosomas politénicos de esta especie, hemos subdividido la glándula en tres secciones. Estas subdivisiones, fueron hechas tomando como base las realizadas en los cromosomas de *R. americana* ²⁰. De acuerdo con la tabla presentada, es posible ver que solamente a partir del 25° día los cromosomas de este tejido comienzan a mostrar una cierta actividad detectable citológicamente. Antes de este época, la glándula salivar en sus tres secciones, muestra

una relativa inactividad, por lo menos en lo referente a actividades cromosómicas.

El período segundo, que comienza a partir del 25° día, se caracteriza por el inicio en la sección S_1 , de actividad nucleolar. En esta sección, empleando coloración para RON, es posible observar la presencia de nucleolos en las puntas heterocromáticas de los cromosomas A, B y X de esta especie. (Figura 1). La Figura 1 muestra una microfotografía, obtenida por observación con el microscopio de luz polarizada, de un núcleo politénico de una célula salivar de larva del 25° día. Es evidente la proliferación de nucleolos en las puntas heterocromáticas de los cromosomas antes mencionados.

A medida que avanza el desarrollo larval, se observa la aparición de estructuras de origen nucleolar, los micronucleolos. Estos cuerpos pequeños, se tornan bastante abundantes hacia el 29° día. Correlativamente, se observa la disminución del tamaño de los nucleolos presentes en las puntas heterocromáticas. En el día 35° el nucleolo del cromosoma A desaparece. Sin embargo, los de los cromosomas B y X persisten hasta el 38° día. En las glándulas salivares de larvas con 35 días de edad, los micronucleolos han desaparecido completamente. Finalmente en el día 39 los nucleolos persistentes en los cromosomas B y X desaparecen.

El quinto período se inicia con la abertura del Puff 2B el más importante de los Puffs de DNA (día 40); ya en el día 41 se observa la activación del Puff C3 y el cierre del Puff B2.

Después del 44° día, comienza la histólisis de las glándulas salivares, y se desencadenan los eventos de morfogénesis, que terminarán con la formación de las estructuras definitivas presentes en el adulto.

Metabolismo del RNA en las glándulas salivares

Se determinó el contenido del RNA presente en la célula salivar en puntos específicos previamente determinados. La cuantificación del contenido de RNA de glándulas salivares de larvas en el segundo período (25 días) mostró un contenido equivalente a 17.5 $\mu\text{g/ml}$ /glándula. Por otro lado el contenido de RNA total de glándulas en el tercer período (34 días) fue de 17.0 $\mu\text{g/ml}$ /glándula.

Los valores anteriores, aunque son relativos, demuestran cierta

actividad metabólica de la glándula, en cuanto a la síntesis de RNA. El mismo tipo de medidas, fué realizado en glándulas de larvas en cuarto período (40 días), y en quinto período (41 días), en las dos fases estudiadas, el contenido de RNA por glándulas, fué 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{glándula}$. Este valor se mantiene relativamente constante hasta la histólisis de la misma. La tabla 2 muestra el contenido de RNA total en las glándulas salivares de *R. millery*, en los diferentes períodos del desarrollo que fueron estudiados.

Un parámetro que mide la síntesis de RNA total, es la incorporación de Uridina ^3H . La determinación de la cantidad de isótopo incorporada en las moléculas de RNA, es una medida directa de su síntesis.

Los resultados obtenidos en este tipo de experiencias indican que la actividad específica del RNA sintetizado en los diferentes períodos, es variable. Por otro lado, se observa un pico de actividad específica en las preparaciones de RNA aisladas de glándulas salivares en el cuarto período; éste se caracteriza por la abertura del Puff de DNA B - 2. A medida que avanza el desarrollo glandular, la síntesis de RNA total en la glándula disminuye. Esto está posiblemente asociado con una disminución de la actividad metabólica de la misma a medida que se aproxima a su fase de histólisis. (Tabla 2).

Síntesis de proteínas en las glándulas salivares

La tabla 3 muestra los valores de concentración de proteínas presentes en glándulas de *R. millery* en varios estadios del desarrollo. De los resultados obtenidos en estas experiencias iniciales, se pudo observar que justamente en los períodos del desarrollo glandular en que los Puffs de DNA están presentes, se obtienen los valores de concentración de proteínas totales más elevados. Así las glándulas salivares de larvas en el tercer período (34 días), muestran un contenido protéico de 71 μg de proteína/glándula; a medida que avanza el desarrollo, el contenido de proteínas glandulares se incrementa (101.4 μg de proteína/ glándula en el cuarto estadio, 95.0 μg de proteína/glándula en el quinto y sexto períodos). Los estadios donde existe mayor concentración de proteínas glandulares, corresponden a aquellos en que los Puffs de DNA B - 2 y C - 3 están presentes en

las glándulas salivares.

De los valores de actividad específica de las proteínas glandulares, podemos ver que la actividad sintética de la glándula salivar es mayor en aquellos períodos que anteceden a la abertura de los grandes Puffs de DNA. Sin embargo es interesante observar que en la transición del cuarto para el quinto período hay un incremento en la actividad específica de proteínas de la glándula. (Tabla 3).

A medida que la glándula salivar se aproxima de su histólisis, la actividad específica de las proteínas disminuye, es así como en pupa el primer día ya existe una diferencia considerable en relación a períodos que le anteceden. (Tabla 3).

Caracterización de proteínas glandulares

La figura 2, muestra el patrón electroforético de la síntesis de proteínas de la glándula total de *R. millery*, en los estadios finales del desarrollo larval.

En las glándulas salivares del cuarto período, es posible observar la síntesis de fracciones características. En este estadio, además de proteínas de peso molecular alto (mayores de 30 Kd), dos polipéptidos aparecen. Uno de ellos, mostró un peso molecular relativo de 28 Kd (M_R), este polipéptido se encuentra presente en todas las glándulas analizadas, y representa aproximadamente el 45% del contenido protéico de este período glandular. Por otro lado, otro péptido de peso molecular M_R 18 Kd, el cual representa un 30% del contenido total, se observa en las glándulas salivares en este mismo período.

El patrón de síntesis se altera, cuando la glándula pasa al quinto período. El péptido de 18 Kd, se encuentra en una relación de abundancia, que representa el 52% del contenido total. Es interesante observar que el M_R de 28 Kd es observable en este período. El quinto período en esta especie está caracterizado, por la presencia del Puff C - 3 en su máxima abertura. Esto significa que el producto protéico de este Puff, posiblemente sea este polipéptido.

La síntesis de proteínas sufre un cambio dramático cuando la larva pasa a la fase de pupa. En ésta cesa la síntesis de los polipéptidos característicos de las fases de abertura de los grandes Puffs de DNA.

Con el fin de mostrar la síntesis de proteínas de la región S_1 , secciones S_1 de glándulas salivares de larvas en diferentes períodos del último instar larval, fueron sometidos al mismo análisis descrito por los párrafos anteriores. Los resultados de estas experiencias están consignadas en la Figura 3. El análisis se restringió a tres puntos tomados en distintas fases de abertura y cierre de los Puffs de DNA B-2 y C-3. En estas experiencias observamos la aparición del polipéptido de $M_R 28$ Kd a lo largo de la abertura y cierre del Puff B-2. Este resultado, confirma la posible correlación de esta proteína con la región B-2. Por otro lado, la fracción de 18 Kd, aparece solamente en la fase en que el Puff C-3 está presente. Esto nos hace afirmar, que existe una correlación entre este polipéptido y el Puff C-3.

Experiencias preliminares de traducción *in vitro*, mostraron que entre los productos de traducción de RNA poli A⁺ extraído de glándulas en quinto período, aparece la fracción de 18 Kd. Este resultado constituye una prueba muy fuerte de que el polipéptido de 18 Kd, es el producto génico del Puff C-3 (datos no mostrados).

DISCUSION

De los análisis citológicos realizados en las glándulas salivares de larvas de *R. millery*, es posible extractar las siguientes características comparables con otras especies filogenéticamente relacionadas.

- El patrón de "puffing" de esta especie, muestra los mismos puffs de DNA, que sus contrapartes *R. americana*, y *Trischosia pubescens*.
- El patrón de "puffing", aunque semejante, presenta diferencias temporales para las tres especies comparadas.
- Indirectamente los mecanismos moleculares que controlan el patrón de abertura y cierre de los puffs de DNA en *R. millery*, son semejantes a los que controlan la contraparte en las dos especies antes mencionadas.
- La duración del ciclo vital de *R. millery*, aunque más corta que *R. americana*, reproduce citológicamente todos los eventos de

abertura y cierre de los principales puffs de DNA comunes a estas dos especies.

Uno de los parámetros empleados para medir la actividad metabólica de las glándulas salivares, es la incorporación de precursores radioactivos de las macromoléculas que son sintetizados en este órgano. De acuerdo a este concepto, la actividad metabólica en cuanto a síntesis de RNA en las glándulas salivares de *R. millery*, es baja. Medidas semejantes realizadas en *R. americana*, mostraron que la actividad sintética de RNA total en glándulas salivares de esta especie, es mayor. En general, las diferencias observadas sobrepasan dos órdenes de magnitud. Esta diferencia es bastante significativa, tratándose de especies que filogenéticamente están emparentadas. Lo anterior indica, que aunque emparentadas, evolutivamente, presentan adaptaciones moleculares diferentes con relación a la actividad de síntesis de RNA total.

La síntesis de RNA en las glándulas salivares de *R. millery* mostró picos de actividad glandular en larvas del segundo y tercer períodos del desarrollo larval. Correlativamente con estos picos de actividad, fue posible observar la presencia en las glándulas en estos períodos, de un gran número de micronucleolos. Estas estructuras, evidenciadas por Pavan y da Cunha (1969)⁹, se originan de regiones Organizadores del Nucleolo (RON) en las puntas heterocromáticas de los cromosomas politénicos de *R. americana*. Con base en estas evidencias podemos afirmar que los micronucleolos detectados en las glándulas salivares de *R. millery*, son de origen semejante a las observadas en *R. americana*.

Al estudiar los valores de actividad específica obtenidos en los estudios de incorporación de Uridina (³H) en el RNA aislado de glándulas salivares, es posible observar que son bajos. Medidas semejantes realizadas por Alvarenga (1980)²¹ en glándulas salivares de *R. americana*, muestran que la actividad específica de los RNAs sintetizados por las glándulas salivares de esta especie es alta. Esta comparación, nos da la idea de que existen diferencias a nivel molecular, en relación a la regulación de la síntesis de RNAs durante los diferentes períodos del desarrollo glandular.

Por otro lado los resultados obtenidos al trabajar con secciones S_1 de glándulas salivares de *R. millery*, confirmaron la proposición de

Marques (1976)⁶. Con referencia a la actividad sintética de la región S_1 , ésta fué mayor que las de las regiones S_2 y S_3 . Análogamente en al sección S_1 de glándulas de *R. americana*, la incorporación de precursores de Acido Ribonucleico es mayor que en el resto de la glándula²². Resultados semejantes fueron obtenidos en secciones S_1 de las glándulas salivares de *Trichosia pubescens*²³.

En base a las evidencias presentadas, existe una característica común en lo referente a la actividad sintética de la región S_1 de las especies de Sciaridos comparadas. Las diferencias de función de segmentos glandulares, también se observan en cuanto al patrón diferencial de Puffs de DNA en estas tres especies. Marques (1976)⁶, observó que el ciclo de "puffing", es diferente y dependiente del segmento glandular. Así el puff B-2 se abre preferencialmente en las primeras cincuenta células, que conforman el segmento proximal de las glándulas salivares de *R. americana*. Nuestros datos, dan evidencias de que un efecto similar, se presenta en las regiones S_1 de las glándulas salivares de *R. millery*. A pesar de la alta velocidad que el ciclo de puffing se presenta en esta especie, la abertura preferencial del puff B-2 en la sección proximal, se demuestra.

Otro parámetro que estima la actividad metabólica de las glándulas salivares en varias especies de Sciaridos, es la síntesis de proteínas específicas con funciones especiales en el desarrollo.

Al comparar los datos de incorporación de Leucina (³H) en las glándulas salivares de *R. millery*, con las de *R. americana*. Es posible observar de nuevo, una menor actividad en las de *R. millery*. Aparentemente estas diferencias se dan en todos los períodos que fueron analizados.

Las actividades específicas de proteínas sintetizadas en las glándulas salivares de *R. millery*, también son menores que las observadas en las de *T. pubescens*³¹. De nuevo podemos concluir que las glándulas de *R. millery* son menos eficientes en síntesis de proteínas que sus contrapartes en *Trichosia*.

De manera análoga a la realizada para la síntesis de RNA, medimos la incorporación de Leucina (³H), en los diferentes segmentos que conforman la glándula salivar. Los resultados obtenidos, muestran que la sección S_1 es más activa en síntesis protéica que las S_2 y S_3 . El mismo tipo de valores obtenidos en las glándulas salivares de *R.*

americana, evidencian que la sección proximal de la glándula salivar en esta especie es metabólicamente más activa en cuanto a síntesis de proteínas.

Hasta el momento, podemos afirmar que en varios aspectos moleculares, las glándulas salivares de *R. millery*, son diferentes. Estas diferencias se encuentran tanto en actividad de aberturas y cierre de puffs de DNA determinados, en la síntesis de RNAs y proteínas glandulares.

Los patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas durante las fases finales del desarrollo larval, mostraron la presencia de ciertas fracciones de polipéptidos específicos de períodos determinados. De esta manera, es posible determinar en las glándulas el quinto período, la síntesis de un polipéptido de 18000 daltons, que representa un 52% del contenido total de péptidos sintetizados por la glándula en este período. Nuestros resultados, están de acuerdo con los obtenidos para las glándulas salivares de *R. americana*. En éstas, se observa la presencia de un péptido de peso molecular de 18000, en el quinto período del desarrollo glandular de las larvas de esta especie^{3,4}.

Los estudios realizados por Winter *et al*, (1977)³ sobre la síntesis de proteínas, en los segmentos glandulares de *R. americana*, lograron establecer una fuerte correlación entre la síntesis de esta proteína, y el puff C - 3. Estudios posteriores de De Toledo *et al* (1981)²⁴, consiguieron caracterizar, que una fracción de RNA poliadenilado de 16 S, era responsable por la traducción *in vitro*, de un péptido de migración electroforética semejante al caracterizado por Winter *et al*, (1977, a)³.

Aunque las correlaciones entre el puff B - 2 y el polipéptido de 28000 daltons, no fueron muy claras, ésta se sustenta en la base de una correlación clara en *R. americana*²⁴. Tal como hemos mostrado en secciones anteriores de esta discusión, en la fisiología de las glándulas salivares de las dos especies, existen semejanzas en cuanto a la síntesis de proteína glandulares determinadas en ciertos estadios del desarrollo glandular.

Se han analizado eventos citológicos específicos en las glándulas salivares de larvas de *R. millery*, a lo largo de los distintos períodos del desarrollo larval establecido en este trabajo. En base a estos criterios, existen diferencias y semejanzas entre especies del género

Rhynchosciara.

Los productos génicos de los puffs de DNA en las dos especies del género *Rhynchosciara*, aparentemente son semejantes, y su expresión coordinada, es una característica fisiológica del género. Los resultados obtenidos sientan bases concretas para el seguimiento de experiencias que ayuden a aclarar los mecanismos de control de la expresión coordinada de genes en estas especies.

TABLA 1. Principales eventos cromosómicos en la Sección S₁ de glándulas salivares de *R. millery*.

PERIODO	EDAD (Días)	EVENTO CROMOSOMICO
2°	25	- Apertura de nucleolos. - Nucleolos en las puntas heterocromáticas de los cromosomas A, B, X. - Micronucleolos abundantes.
	30	- Nucleolos en cromosomas A, X, B. - Ausencia de micronucleolos.
3°	35	- Aspecto de nucleolos en cromosomas B, X. - Ausencia de micronucleolos.
4°	40	- Apertura del puff 2B. - Otros puff abiertos C5, C8.
5°	41	- Apertura del puff C3. - Puff 2B cerrado. - Algunos otros puff.
6°	42 (prepupa)	- Puff A16 abierto al máximo. - Otros puff cerrados.
	42 (pupa)	- Puff A16 abierto. - Otros cerrados.

TABLA 2. Valores de concentración y actividad específica del RNA de glándulas salivares de larvas y pupas de *R. millery*.

PERIODO	DIAS	CONTENIDO DE RNA (μ /ml/glándula)*	ACTIVIDAD ESPECIFICA (cpm/ml/ μ g) x 10 ³ .
2°	25	17.57 ± 2.50	13.27
3°	34	17.03 ± 1.70	0.79
4°	40	12.50 ± 0.81	21.34
5°	41	12.50 ± 1.10	22.34
6°	42	12.42 ± 3.50	1.04

*Cada uno de los valores consignados, son el promedio de tres determinaciones independientes, en larvas diferentes.

TABLA 3. Valores de concentración y actividad específica de proteínas de las glándulas salivares de larvas y pupas de *R. millery*.

DIAS	PERIODO	CONCENTRACION* (μ g de proteína/glándula)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μ cpm/mg/sección S ₁)
34	3°	71.01 ± 0.98	1408
40	4°	101.41 ± 1.25	493
41	5°	94.87 ± 0.99	843
42	6°	95.23 ± 1.01	672
43	Pupa (1)**	37.80 ± 1.30	350
44	Pupa (2)**	21.73 ± 0.58	250

* Los valores consignados son la media de tres medidas tomadas en tres individuos diferentes.

** Estadios pupales en el primer y segundo día.

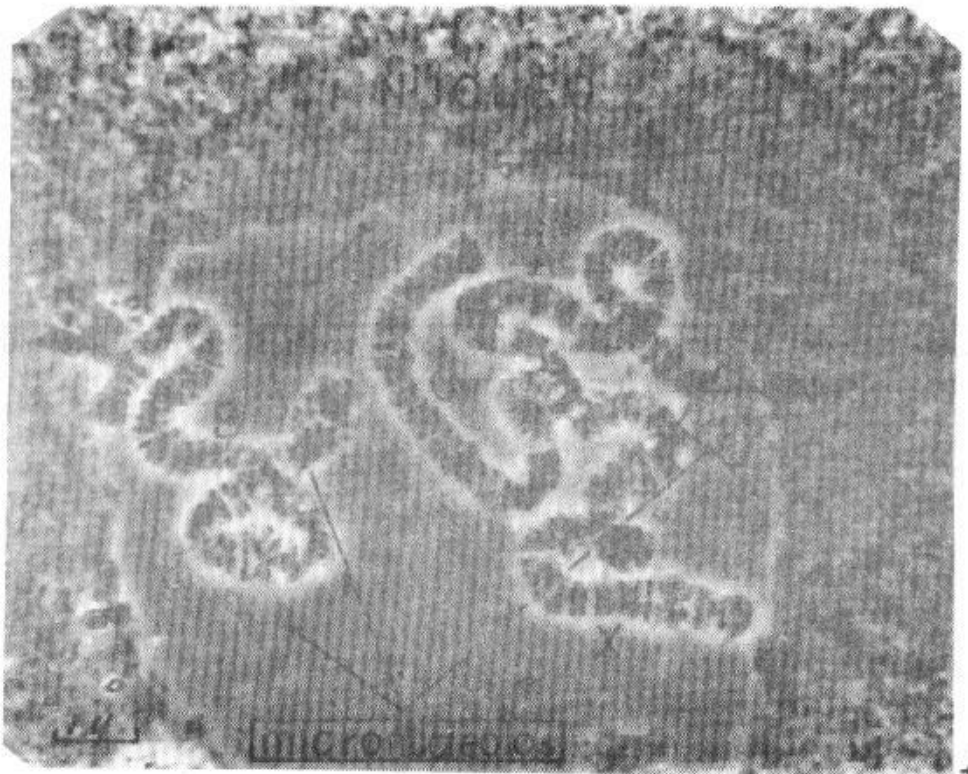


Figura 1: Núcleo de una célula de la glándula salivar de larva de 25 días de *R. millery*. La fotografía detalla el conjunto de cuatro cromosomas politénicos. Obsérvese en este estadio la gran cantidad de micronucleolos (\rightarrow), generados aparentemente de los varios nucleolos que se forman en las puntas heterocromáticas; (Nuc)-Nucleolo; (A,B,C,X) - denominación de los cuatro cromosomas politénicos de esta especie.

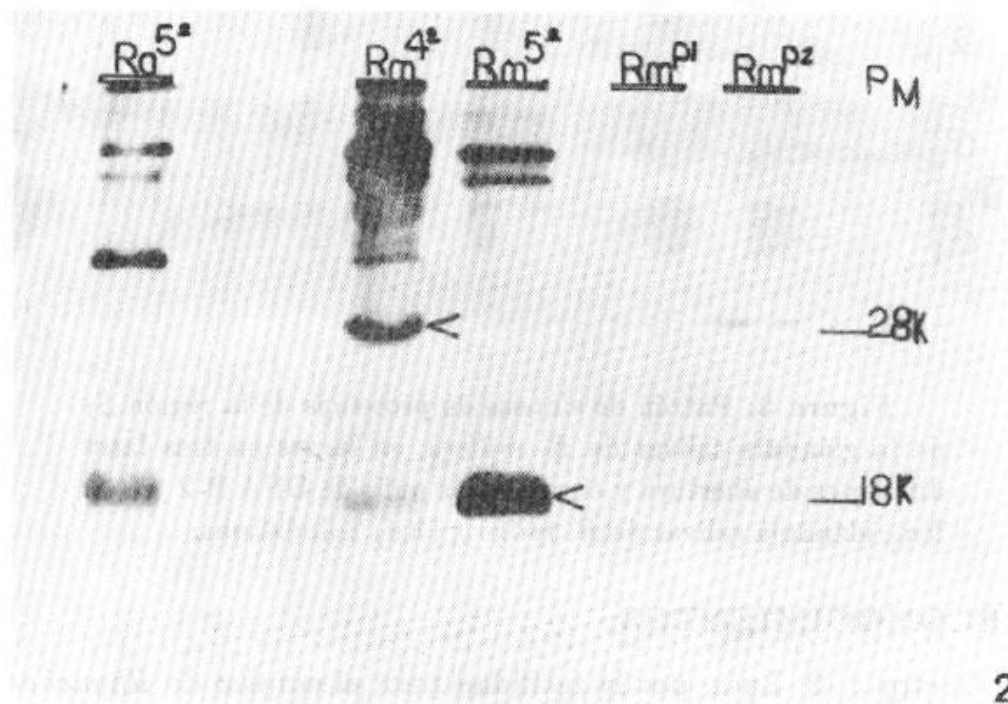


Figura 2: Patrón electroforético de la síntesis de proteínas de las glándulas salivares de *R. millery* en diferentes períodos del desarrollo larval. Patrón de síntesis de proteínas de glándulas salivares de *R. americana* en quinto período (Ra^{5°). (Rm) *Rhynchosciara millery*, los correspondientes se determinan sobre cada perfil electroforético.

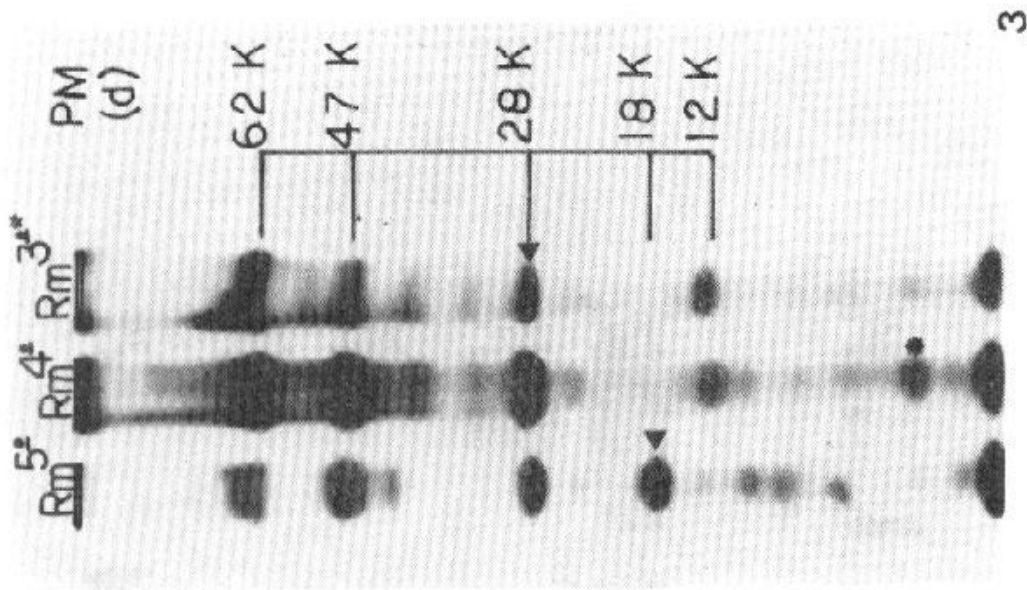


Figura 3: Patrón de síntesis de proteínas de la región S_1 de la glándula salivar de *R. millery*, en larvas en tres fases diferentes de abertura y cierre de los puffs de DNA B-2 y C-3. Rm- glándula salivar de *R. millery*; (Kd) Kilodaltons.

RECONOCIMIENTOS

Al Doctor J. S. Lara, por la facilidad para el empleo de *Rhynchosciara* y el equipo inicial empleado en este trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencias (CNPq) por la ayuda financiera parcial. A la Universidad del Valle por el auxilio de comisión de estudios.

Bibliografía

1. KAFATOS, F. C. 1976. *Sequential cell polymorfism: A fundamental concept in developmental biology*. Adv. Insecr Physiol., 12: 1-15.
2. WINTER, C. E. 1978. *Caracterizacáo e síntese das proteínas da secrecao salivar de Rhynchosciara americana*. tese de Doutoramente apresentada ao Depto. de Bioquímica do Instituto de Química da USP. Brasil.
3. WINTER, C. E.; de BIANCHI, A. G.; TERRA, W. R.; LARA, F. J. S. 1977 a. *Relationships between newly synthesized proteins an*

- DNA puffs patterns in salivary glands of Rhynchosciara americana.* Chromosoma (Berl.), 61: 193.
4. WINTER, C. E.; de BIANCHI, A. G.; TERRA, W. R.; LARA, F. J. S. 1977 b. *The giant DNA puffs of Rhynchosciara americana codés for polypeptides of the salivary gland secretion.* J. Insect Physiol., 23: 1455.
 5. BONALDO, M. F.; SANTELLI, R. V.; LARA, F. J. S. 1979. *The transcript from a DNA puff of Rhynchosciara and its migration to the cytoplasm.* Cell, 17: 827-33.
 6. MARQUES, M. D. 1976. *Aspectos analômicos e histológicos dos estágios imaturos de Rhynchosciara americana.* Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociencias.
 7. BREUER, M. E. & PAVAN, C. 1955. *Behavior of polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae at different stages of larval development.* Chromosoma (Berl.), 7: 371-86.
 8. BEERMAN, W. 1952. *Chromomerenkonstanz und Spezifische modifikation der Chromosomestruktur in der stwicklung und organdifferenzierung von Chironomus tentans.* Chromosoma. (Berl.) 5: 139.
 9. PAVAN, C. & CUNHA, A. B. 1969. *Chromosomal activities in Rhynchosciara and other Sciaridae.* Ann. Rev. Genet., 3: 425-50.
 10. LARA, F. J. S.; TAMAKI, H.; PAVAN, C. 1965. *Laboratory Culture of Rhynchosciara angelae.* Am. Natur. 99: 189-191.
 11. TERRA, W. R. 1972. *Aspectos bioquímicos da hemolinfa e do casulo coletivo de Rhynchosciara americana.* Tese de Doutorado apresentada ao Depto. de Bioquímica do Instituto de Química da USP.
 12. TERRA, W. R.; de BIANCHI, A. G.; GAMBARINI, A. G.; LARA, F. J. S. 1973. *Haemolymph aminoacids and related compounds during cocoon production by the larvae on the fly Rhynchosciara americana.* J. Insect Physiol. 19: 2097-2106.
 13. DANNEHOLDT, B. 1972. *Giant RNA transcript in a balbiani ring.* Nature New Biol. 240: 229-33.

14. GARCIA VALLEJO, J. F. 1984. *Amplificação génica em Rhynchosciara americana: Análise da estrutura, amplificação e metilação de sequências contidas no pufe C₃*. Tese de Doutorado. Instituto de Química da Universidade do Sao Paulo. Brasil.
15. FLECK, A. & MUNRO, H. N. 1962. *The precision of ultra violet absorption measurements in the Schimidt-Thaunhauser procedure for nucleic acid estimation*. Biochim. Biophys. Acta, 55: 571-83.
16. MANEGHINI, R.; ARMELIN, H. A.; LARA, F. J. S. 1968. *Change in patterns on inhibition by actinomycin D of Uridine 3H in incorporation into salivary gland RNA of Rhynchosciara at different larval ages*. Biochem. Biophys. Res. Comm.
17. LAEMLI, U. K. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227: 680-85.
18. BONNER, W. M. & LASKEY, R. A. 1974. *A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polycrilamide gels*. Eur. J. Biochem., 46: 83-8.
19. MAIZZEL, J. V. Jr. 1974. *Poliacrilamide gel electrophoresis of viral proteins*. In: *Methods in Virology*. Eds. MARAMOROSH, K. & KOPRAWASKY, H., v. 5. Academic Press, New York, pp. 179-246.
20. TERRA, W. R.; BIANCHI, A. G.; GAMBARINI, A. G.; PUEYO, M. T. & LARA, F. J. S. 1975. *A medium for short-term incubation of salivary glands based on the haemolymph composition of the fly Rhynchosciara americana*. Cien. Cult. 28: 654-47.
21. ALVARENGA, C. A. S. 1980. *Influencia de ecdisonas sobre a síntese de RNA proteínas nas glandulas salivares de Rhynchosciara*. Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica do instituto de Química da Universidade de Sao Paulo.
22. LARA, F. J. S. & OKRETIC, M. C. 1975. *A micro method for the assay of polyadenylate-containing ribonucleic acid by gel electrophoresis*. Biochem. J., 151: 575.
23. AMABIS, D. C.; AMABIS, J. M. 1984. *Hormonal control of gene amplification and transcription in the salivary gland chromosomes of Trichosia pubescens*. Dev. Biol. 101: 10.

24. TOLEDO, S. M. de 1981. *Puffs de DNA e a síntese de RNA mensageiro em, Rhynchosciara americana*. tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de Sao Paulo, Brasil.
25. MAXAM, A. M.; GILBERT, W. 1977. *A new method for sequencing DNA*. proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 560-563.