

EVIDENCIAS MORFOLOGICAS DE INTERACOES NUCLEOCITOPASMATICAS EM CELULAS DAS GLANDULAS SALIVARES LARVAIS DE LYCORIELLA PIMPLIFORMES (DIPTERA, SCIARIDAE)¹

Carminda da Cruz Landim²Regina L. M. Silva de Moraes²

SUMARIO

Las glándulas salivares larvales de *Lycoriella* fueron estudiadas através de la microscopia electrónica durante el 3er. instar. En este periodo fué observada la presencia tanto de nucleolas cromosómicas como micronucleolos extracromosómicos.

En la membrana nuclear fué observada la presencia de poros, conteniendo en su interior material nucleolar, el cual formaba acúmulos de lado citoplasmático. La presencia de

vesículas y túbulos conectados con la membrana nuclear fué notada frecuentemente, además de estructuras membranosas dispersos en el nucleoplasma.

Estos aspectos fueron interpretados como evidencias morfológicas de interacciones nucleocitoplasmáticas, representadas por el movimiento de material tanto del núcleo para el citoplasma, como de éste para el núcleo.

SUMMARY

The salivary glands of the third instar larvae of *Lycoriella* were studied through electron microscope. There was observed in this instar the presence of chromosomic nucleoli as well as of extra-chromosomic micronucleoli.

In the nuclear membrane there was observed the presence of pores containing nucleolar material, forming accumulations in the cytoplasmic side. The presence of vesicles and tubules connected with the nuclear membrane

was frequently noticed, in addition to membranous structures dispersed in the nucleoplasm. These observations were interpreted as morphological evidence of nuclear-cytoplasmic interaction, represented by the movement of material from the nucleus to the cytoplasm and vice-versa.

The microtubules were assigned a function linked to the nuclear morphology.

INTRODUCAO

A existência de interações no funcionamento do núcleo e do citoplasma das células eucarióticas são estudadas desde o século dezanove, embora ainda não haja uma definição clara para a natureza dessas interações. A colocação de Goldstein (1973) de que "núcleo e citoplasma constituem uma associação mutualística" mostra muito bem a extensão destas interações. Poder-se-ia definir uma interação núcleo-citoplasmática como uma atividade celular para a qual, tanto núcleo como citoplasma dessem sua contribuição. Tal seria a expressão fenotípica dos caracteres hereditários que ocorre no citoplasma, mas necessitando da contribuição dos mensageiros genéticos do núcleo.

As interações núcleo-citoplasmáticas têm sido estudadas através de vários métodos (Goldstein, 1964) os quais oferecem quase sempre, evidências indirectas dessas interações. Os métodos mais usados têm sido, de um lado, o acompanhamento da síntese e movimento do RNA nas células e da síntese de proteínas e a determinação da natureza do controle nuclear sobre essa síntese e, de outro lado, a análise da influência do meio citoplasmático na "maturação" nuclear, nos eventos da divisão celular, em atividade localizada de determinado cromossomo ou na especificidade da atividade genética (Goldstein, 1964).

Evidências morfológicas do movimento de material sintetizado, do núcleo para o citoplasma, foram encontradas por varios autores em diferentes tipos de células nas mais variadas situações, tais como ovogénese (Kato, 1968; Eddy, 1975; Kitajima e Cruz-Landim, 1974; Cruz-Landim, 1979), espermatogénese (Comings e Okada, 1972; Fuge, 1976; Russel e Frank, 1978; Cruz-Landim e Cruz-Höfling 1979) e também em tecidos somáticos (Cunha e cols, 1973,a; Daneholt 1975; Perry, 1966, entre outros), tanto em vertebrados como em invertebrados. Neste caso a movimentação

seria afetuada primordialmente através dos poros nucleares os quais, além de permitirem a passagem dos materiais que abandonam o núcleo em direção do citoplasma, poderiam ter, ainda, papel na organização dos cromossomos (Comings e Okada, 1970).

A possibilidade de outro tipo de comunicação entre núcleo citoplasma tem sido sugerida, particularmente pela formação de vesículas a partir da membrana nuclear que se separam no citoplasma como vesículas ou lâminas. Estas estruturas são revestidas por membranas derivadas do envelope nuclear (mas de acordo com Wischnitzer (1974) a importância desta vesiculação não está muito bem comprovada.

De acordo com Tashiro e cols (1968) pode haver ainda desaparecimento parcial da membrana nuclear e também, o transporte de material pode ser feito através de microtúbulos perinucleares (Scharrer e Wurzelmann, 1969). Szollosi (1965) evidenciou extrusão de nucléolos dos núcleos de ratos pela presença de material nucleolar envolvido por porções do envelope nuclear.

Durante estudos realizados sobre a atividade secretora das glândulas salivares larvais de *Lycoriella*, Silva de Moraes e Cruz-Landim (1979) verificaram a ocorrência de situações indicativas de trocas de materiais entre o núcleo e o citoplasma dessas células, cujo relato é feito no presente trabalho.

MATERIAL E METODOS

As glândulas salivares das larvas de *L. pimpliformis* (Lane, 1959) foram dissecadas e fixadas em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,08M, pH 7,4 durante 24 hs a 4°C. Após serem lavadas no tampão foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão durante 2 hs, também a 4°C. A desidratação foi feita em série de etanóis em concentrações crescente e a inclusão em Epon 812 (Luft 1:1), via óxido de propileno. Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalhas de vidro em ultramicrotomo Porter-Blum MT 2, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico Zeiss EM9 S2.

1. Trabalho realizado com auxílio da FAPESP (Proc. Biol. 77/0727) e CNPq (Proc. No. 3079/75). Recibido y aceptado para publicación, 17 agosto 1981.

2. Departamento de Biología, Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP - 13.500, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os núcleos das células das glândulas salivares de *L. pimpliformes* apresentam, como em todos os dípteros, cromossomos politênicos. Com a microscopia eletrônica as bandas e interbandas desses cromossomos apresentam-se bem visíveis, podendo ser apreciados aspectos morfológicos da síntese de material ao nível dos pufes, quando se pode observar material granular, eletrondenso acumulado ao redor da banda dilatada (Silva de Moraes e Cruz-Landim, 1980 e Cerri, 1980). Eventualmente esse material se agrupa para formar estruturas nucleolares mais compactas como a que pode ser observada na figura 1A. Os nucléolos nestes núcleos podem apresentar-se sob a forma de grandes nucléolos, ligados geralmente aos cromossomos nucleolares, ou sob a forma de micronúcléolos próximos das bandas onde foram sintetizados (Gabrušewycz-García e Kleinfeld, 1966) ou da membrana nuclear (fig. 1A).

A carioteca destes núcleos apresenta numerosos poros (fig. 1B, 2B e 3B) e com frequência pode ser percebida uma ligação entre o material dos nucléolos e os poros (fig. 2A). Do lado citoplasmático acumula-se, em correspondência com a situação descrita acima, material granular, bastante semelhante ao material disperso no nucleoplasma ou os ribossomos (fig. 1A, 2B, 3A e B).

Por outro lado, no interior do núcleo, aparecem estruturas membranosas vesiculares (fig. 1B, 2C, 3A e B) ou tubulares (fig. 3C) que parecem em alguns casos brotar do folheto interno da carioteca; outras parecem continuar-se por uma parte tubular através do espaço perinuclear, estabelecendo contacto com o seu folheto externo (fig. 3B). A formação destas vesículas e túbulos aparentemente ocorre nos intervalos entre os poros nucleares, não tendo com eles nenhuma ligação. Provavelmente as estruturas membranosas que se encontram nos núcleos, sem conexão com a carioteca (fig. 1A), originam-se também pelo processo descrito.

A situação parece indicar que material sintetizado ao nível dos cromossomos pode passar do núcleo para o citoplasma através dos poros nucleares. Este material, provavelmente, é constituído de ribonucleoproteínas, conforme acontece em muitos outros casos onde os autores puderam caracterizar citoquimicamente a sua natureza. Pelo aspecto morfológico, a maior parte desta ribonucleoproteína constituirá ribossomos no citoplasma. Por outro lado o material sintetizado no citoplasma pode passar para o interior do núcleo, através da formação de borbulhas ou túbulos a partir do folheto interno da carioteca.

As células da glândula salivar larval de *Lycoriella* são muito ricas em retículo endoplasmático granular e este, conforme demonstrado várias vezes, apresenta continuidade com a carioteca. O material sintetizado ao nível deste retículo circula por seus canais e cisternas, podendo, portanto, chegar ao espaço perinuclear e daí passar para o interior do núcleo pelo processo descrito. A própria carioteca apresenta ribossomos em seu folheto externo podendo ser também local de síntese proteica.

Estes estudos foram realizados em larvas de 3º instar quando a glândula salivar se apresentava com o citoplasma completamente carregado de secreção (Silva de Moraes e Cruz-Landim, 1979). Segundo Cunha e cols (1973b), na fase correspondente ao auge da secreção glandular em *Rhynchosciara*, os cromossomos não formam pufes e não há síntese de material no núcleo, iniciando-se esta no final da vida larval e prosseguindo durante o período de pré-pupa. Neste caso a presença das borbulhas e túbulos mencionados, indicando a vinda de material do citoplasma para o núcleo, poderiam significar um comando do citoplasma para regular a atividade de genes específicos de certos cromossomos.

A passagem de material do citoplasma para o núcleo tem sido mais difícil de demonstrar e identificada principalmente durante a embriogênese. Experimentos autoradiográficos realizados por Di Bernardino e Hoffner (1975) mostraram um intenso acúmulo de proteínas não histonas nos núcleos de blástula e nos estágios iniciais de gástrula. Estes núcleos, quando transplantados para ovos enucleados perdiam rapidamente estas proteínas. Isto indica também uma reversibilidade no mecanismo de trocas nucleo citoplasmáticas.

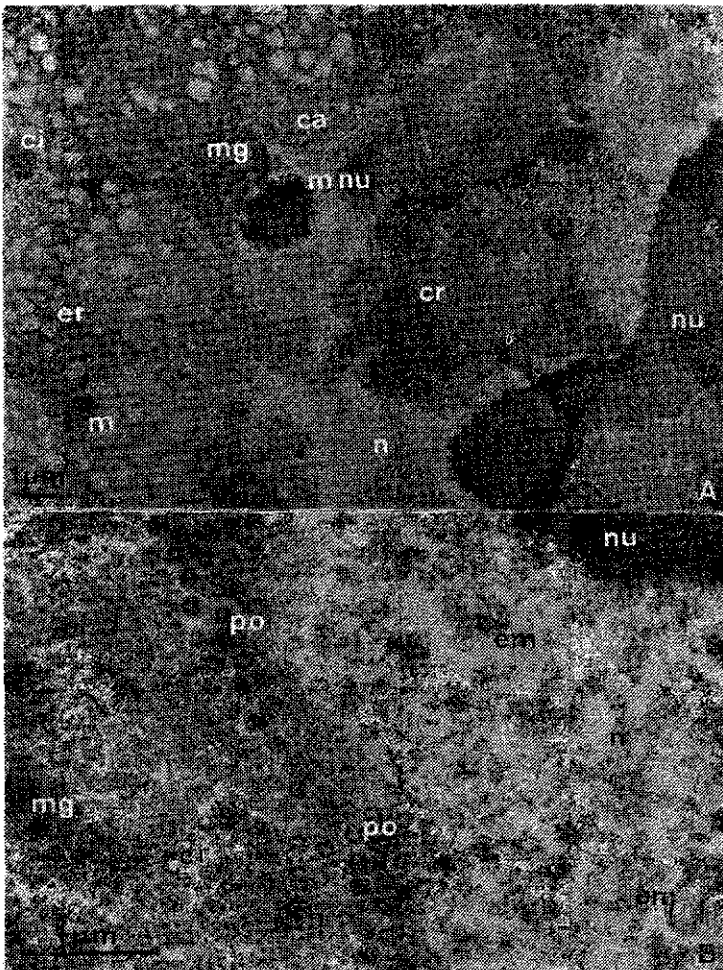


FIG. 1 A. Micrografia de uma célula glandular de *L. pimpliformes* vendo-se o material granular (mg) perinuclear.

B. Carioteca (ca) em corte tangencial mostrando os poros (po). n=núcleo; ci=citoplasma; nu=núcléolo; mnu=micronúcléolo; m=mitocôndrio; er=retículo endoplasmático granular; em=estrutura membranosa intranuclear; cr=cromatina; ca=carioteca.

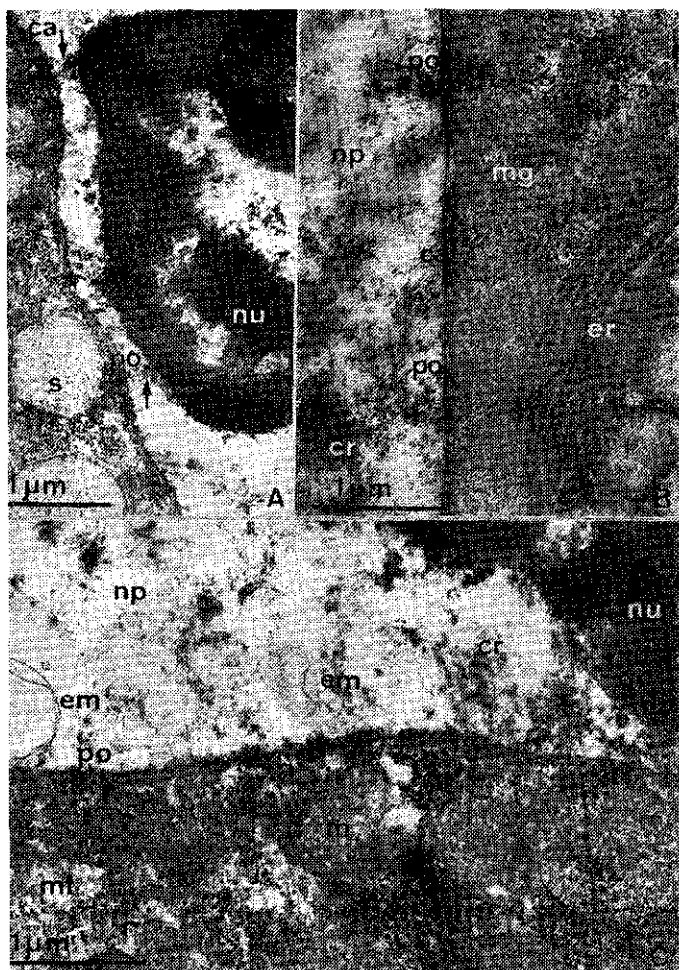


FIG. 2 A. Ligação entre o material (setas) nucleolar (nu) e os poros (po) de carioteca.
 B. Notar que los poros (po) da carioteca (ca) apresentam sempre material eletrondenso e às vezes ligacoes com a cromatina (cr) dispersa no nucleoplasma (np).
 C. Estruturas membranosas (em) intranucleares delgadas da carioteca (ca).
 er=retículo endoplasmático granular; s=grânulo de secreção; mg=materia granular perinuclear; m=mitocôndrio; mt=microtúbulo.

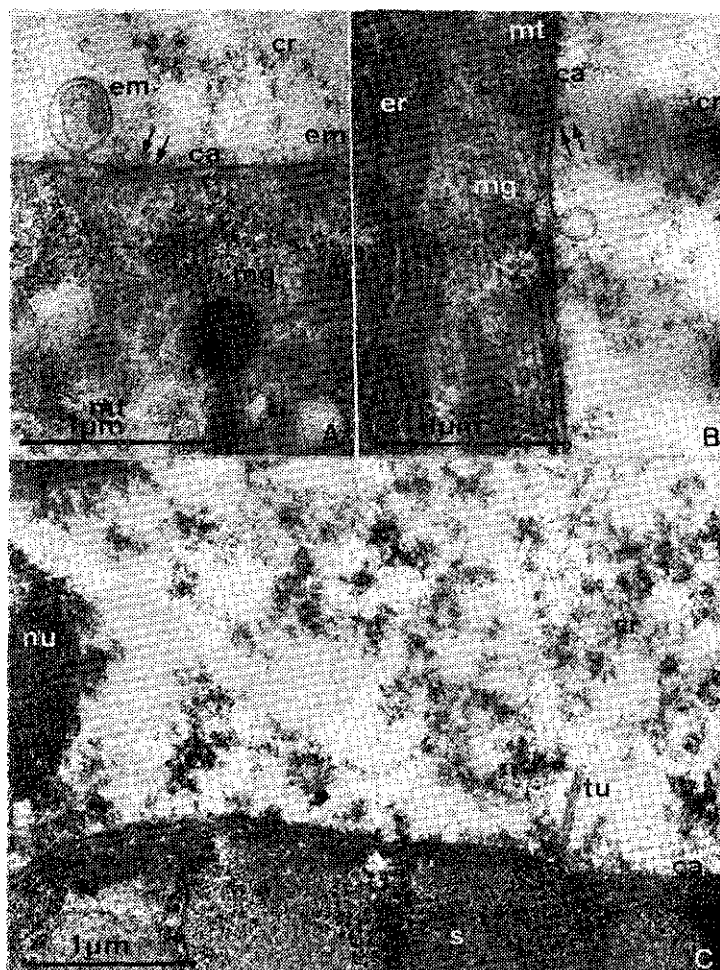


FIG. 3 Origem das estruturas membranosas (em) intranucleares. As setas duplas indicam passagem de material nuclear através dos poros.
 A. As estruturas membranosas (em) parecem brotar do folheto interno da carioteca.
 B. A borbulha parece continuar-se em um túbulo (seta simples) através do espaço perinuclear.
 C. Estrutura tubular (tu) originando-se do folheto interno da carioteca (ca).
 nu=núcléolo; mt=microtúbulos; s=grânulos de secreção no citoplasma; mg=materia granular perinuclear; cr=cromatina; er=retículo endoplasmático granular.

Hinsch (1970) interpretou a presença de membranas intranucleares como evidência de transporte de material do núcleo para o citoplasma em adição ao mecanismo de passagem de material fibroso ou granular através dos poros nucleares.

Nossa idéia é de que as estruturas membranosas encontradas nos núcleos da glândulas salivar larval de *Lycoriella*, sem conexão com a membrana nuclear, representem remanescentes das vesículas e/ou túbulos através dos quais é feito o transporte de material citoplasma - núcleo.

Do lado citoplasmático, na região onde se acumula o material de origem nuclear, podem ser observados microtúbulos. Segundo Gouraton e Folliot (1970), que verificaram situação semelhante em homópteros, estes microtúbulos estão, com frequência, presentes ao redor de núcleos que

sofreram endomitoses e apresentam-se lobulados e hipertrofiados, como ocorre também no caso presente. Segundo os autores mencionados, estes microtúbulos teriam uma função metabólica, pois encontram-se frequentemente associados com a secreção produzida pelas células.

Nas glândulas de *Lycoriella* os microtúbulos parecem desempenhar mais um papel morfológico, participando da manutenção da forma do núcleo, não se podendo excluir sua possível participação na dispersão da secreção.

CONCLUSOES

Dos resultados e discussão expostos pode ser concluído que nas glândulas salivares larvai de *Lycoriella* ocorrem trocas entre o núcleo e citoplasma, evidenciadas morfológicamente através da microscopia eletrônica.

A presença de poros nucleares, preenchidos por um material de natureza semelhante ao material nucleolar e aquele frequentemente acumulado do lado citoplasmático, foi interpretada como uma evidência morfológica do transporte de substâncias nucleolares para o citoplasma. Inúmeras vezes foi percebida a continuidade entre o material nucleolar e os poros.

Além deste tipo de transporte, muito comum nos diferentes tipos celulares, foi verificada a presença de vesículas e túbulos, formando-se a partir do folheto interno da membrana nuclear e projetando-se para o interior do núcleo.

Algumas destas estruturas apresentaram-se conectadas à membrana e outras foram evidenciadas livres no interior do núcleo, mostrando, na grande maioria das vezes, conteúdo de densidade eletrônica baixa. Estes aspectos do citoplasma para o núcleo.

A presença de microtúbulos foi interpretada mais como decorrência de um papel na manutenção da forma dos núcleos.

BIBLIOGRAFIA

- CERRI, Y.L.N.S. 1980. Glândula salivar larval de *Lixophaga diatraeae* Towns (Diptera Tachinidae). Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 94 pp.
- COMINGS, D.E. AND OKADA, T.A. 1970 Association of chromatin fibers with the annuli of the nuclear membrane. *Exptl. Cell Res.*, 62:293.
- COMINGS, D.E. AND OSAKA, T.A. 1972. The chromatoid body in mouse spermatogenesis: evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. *J. Ultrastruct. Res.*, 39:15.
- CRUZ-LANDIM, C. da 1979. Ultrastructural characterization of nuage in spermatocytes of *Myogryllus* sp. (Orthoptera). *The nucleus*, 22:67.
- CRUZ-LANDIM, C. DA E CRUZ-HÖFLING, M.A. 1979. Comportamento dos nucléolos e mitocôndrios durante a ovogênese de peixes teleosteos de agua doce. *Acta Amazônica*, 9: 723.
- CUNHA, A.B. da; RIESS, R.W.; PAVAN, C.; BIESELE, J.J.; MORGANTE, J.S. AND GARRRÍDO, M.C. 1973a. Studies on cytology and differentiation in Sciaridae. 5. Electron microscopic studies on the salivary glands of *Bradysia elegans* Morgante (Diptera, Sciaridae). *Differentiation*, 1:145.
- CUNHA, A.B. DA; MORGANTE, J.S.; PAVAN, C.; GARRRÍDO, M.C. AND MARQUES, J. 1973b. Studies on cytology and differentiation in Sciaridae. IV. Nuclear and cytoplasmatic differentiation in salivary glands of *Bradysia elegans* (Diptera, Sciaridae). *Carologia*, 26:83.
- DANEHOLT, B. 1975. Transcription in polytene chromosomes. *Cell*, 4:1.
- DI BERNARDINO, M.A. AND HOFFNER, N.J. 1975. Nucleo-cytoplasmic exchange of non-histone proteins in amphibian embryos. *Exp. Cell Res.*, 94:235.
- EDDY, E.M. 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.*, 43:229.
- FUGE, H. 1976. Ultrastructure of cytoplasmic nucleolus-like bodies and nuclear RNP particles in late prophase of tipulid spermatocytes. *Chromosoma*, 56:363.
- GABRUSE-EWYGC-GARCIA, N. AND KLEINFELD, R.G. 1966. A study of the nucleolar material in *Sciara coprophila*. *J. Cell Biol.*, 29: 347.
- GOLDSTEIN, L. 1964. Nucleocytoplasmic relationships. in "Cytology and Cell Physiology", Ed. Bourne. Academic Press, New York, 780 pp.
- GOLDSTEIN, L. 1973. Nucleocytoplasmic interactions in amaebae. In "The Biology of Amoeba". Kwang, J., ed. Academic Press, New York, pp. 479 - 504.
- GOURANTON, J. ET FOLLIOT, R. 1970. Présence de microtubules péri-nucléaires dans la glande salivaire d'un Insecte Homoptère, *Centrotus cornutus* L. C.R. Acad. Sc. Paris, 270.1819.
- HINSCH, G.W. 1970. Possible role of intranuclear membranes in nuclear-cytoplasmic exchanges in spider crab oocytes. *J. Cell Biol.*, 47:531.
- KATO, K. 1968. Cytochemistry and fines structure of elimination chromatin in Dysticidae. *Exptl. Cell Res.*, 52:507.
- KITAJIMA, E.W. AND CRUZ-LANDIM, C. da 1974. Nucleo-cytoplasmic relationship in the nurse cells from ovarioles of parthenogenetic femae aphids (Homoptera: Aphididae). II Congresso Latino Americano de Microscopia Eletrônica, Ribeirão Preto, S.P. 52.
- PERRY, R.P. 1966. On ribosome biogenesis. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 23:527.
- RUSSEL, L. AND FRANK, B. 1978. Ultrastructural characterization of nuage in spermatocytes of the rat testis. *Anat. Res.*, 190: 79.
- SHARRER, B. AND WURZELMANN. 1969. II. The microtubulir apparatus of the nuclear membrane. *Z. Zellforsch.*, 191:1.
- SILVA DE MORAES, R.L.M. E CRUZ-LADIM, C. DA. 1979. Aspectos ultrastructurais da secreção em glândulas salivares de *Lycoriella plimifformis* (Diptera, Sciaridae). *Dusenja*, 11: 189.
- SILVA de MORAES, R.L.M. E CRUZ-LANDIM, C. DA 1980. Ultra estrutura da glândula salivar larval de *Gnophomya (Neognophomya) imraculipennie* (Alexander) (Diptera, Tipulidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 40:335.
- SZOLLOSI, D. 1965. Extrusion of nucleoli from pronuclei of the rat. *J. Cell Biol.*, 25:545.
- TASHIRO, Y., MATSUURA, S.; MORIMOTO, T. AND NAGATA, N. 1968. Extrusion of nuclear materials into cytoplasm in the posterior silk gland cells of silkworm, *Bombyx mori* J. *Cell Biol.*, 36: C5.
- WISCHNITZER, S. 1974. The nuclear envelope: its ultrastructure and functional significance. *Endeavour*, 33:137.