Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Dinâmica nucleolar e a herança epigenética dos genes ribossomais

Natália de Sousa Teixeira e Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área da concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba 2014 Natália de Sousa Teixeira e Silva Bacharel em Ciências Biológicas

Dinâmica nucleolar e a herança epigenética dos genes ribossomais

Orientador: Prof. Dr. MATEUS MONDIN

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área da concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Silva, Natália de Sousa Teixeira e Dinâmica nucleolar e a herança epigenética dos genes ribossomais / Natália de Sousa Teixeira e Silva. - - Piracicaba, 2014. 72 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

Bibliografia.

1. rDNA 45S 2. Nucléolo 3. Constrição secundária 4. NOR 5. Metilação de DNA 6. Fibrilarina 7. Epigenética I. Título

CDD 574.8732 S586d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao meu pai, Ismael,

pelo apoio e incentivo incondicionais

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, e ao Departamento de Genética, pela oportunidade de realização deste mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

Ao professor Dr. Mateus Mondin pelas oportunidades, orientações e discussões, pela confiança em mim depositada, pela paciência e amizade durante todo o período do mestrado.

À técnica Silvia Cristina Menuzzo-Molina por toda ajuda e amizade em todo este período.

À professora Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira por ceder cordialmente o microscópio de epifluorescência para a conclusão das análises.

Ao Dr. André Arnosti e à Leica Microsystems Brasil, pela disponibilidade e atenção durante o treinamento em microscopia de fluorescência com ferramenta de deconvolução.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento intelectual e pessoal.

Aos colegas do CYNGELA e do Departamento de Genética, em especial aos mestrandos Amanda Avelar de Oliveira e Lucas Souza Lopes e a doutoranda Camelice Boff de Almeida, pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

Ao meu pai, Ismael, e minha mãe do coração, Ana Lúcia, agradeço pelo apoio, amor incondicional e confiança em mim depositada durante todos os momentos da minha vida.

À minha mãe Lenira pelo amor e apoio mesmo à distância.

Aos meus irmãos, Gabriel, Mariana, Thomaz e Luan, pelo companheirismo.

Ao meu namorado Rafael, pelo carinho nos momentos de aflição e pelo apoio e incentivo nas minhas escolhas.

Aos meus amigos e familiares, em especial à minha madrinha Lílian e primas Sabrina e Letícia, pela torcida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional durante esta conquista,

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

(Leonardo da Vinci)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Estrutura do nucléolo	17
2.2 Genes de rRNA	21
2.3 Nucleologênese	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material	29
3.2 Métodos	29
3.2.1 Germinação	29
3.2.2 Pré-tratamento das raízes com inibidores do fuso mitótico	29
3.2.3 Preparação das lâminas	30
3.2.4 Hibridação Molecular in situ Fluorescente (FISH)	30
3.2.5 Imunodetecção	32
3.2.6 Obtenção das fibras estendidas	32
3.2.7 Caracterização morfométrica dos sítios ribossomais	33
3.2.8 Microscopias e análise de imagens	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Imunodetecção da fibrilarina durante o ciclo celular	35
4.2 Dinâmica das constrições secundárias durante o ciclo celular	40
4.3 Caracterização morfométrica dos sítios ribossomais	42
4.4 Indexação epigenética da cromatina nucleolar	42
4.5 Mapeamento das metilações em fibras estendidas de DNA	47
4.6 Organização dos genes ribossomais de 18S e 26S em fibras estendidas	50
5 DISCUSSÃO	53
5.1 Comportamento do nucléolo durante o ciclo celular	53
5.2 A cromatina ribossomal segrega em um estado semi-condensado	54
5.3 Atividade dos sítios adicionais de rDNA 45S	54
5.4 Caracterização morfométrica dos sítios ribossomais	56
5.5 Padrão de metilação do rDNA 45S	58
5.6 Organização dos genes ribossomais em Crotalaria juncea L	60

6 CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	

RESUMO

Dinâmica nucleolar e a herança epigenética dos genes ribossomais

O nucléolo é uma organela subnuclear formada pela atividade transcricional dos genes ribossomais 18S-5.8S-26S (rDNA 45S) e consequente biogênese dos ribossomos. A atividade destes genes resulta na região organizadora do nucléolo (NOR), na forma de uma constrição secundária em cromossomos metafásicos. As constrições secundárias se condensam progressivamente durante a mitose e se descondensam ao final da telófase quando a reestruturação do nucléolo se inicia. Genomas que apresentam mais de um locus de rDNA 45S deve apresentar, obrigatoriamente, pelo menos um par de NORs, enguanto os demais loci poderão ou não serem expressos. O controle da expressão dos genes ribossomais e a formação da cromatina nucleolar são modulados por eventos epigenéticos. Embora alguns pontos sobre o funcionamento dos genes ribossomais e a formação do nucléolo estejam bem estabelecidos, questões como o padrão de condensação da cromatina nucleolar durante a mitose, o padrão de funcionamento de sítios adicionais de genes ribossomais, o papel das modificações epigenéticas na dinâmica da cromatina nucleolar e na expressão do rDNA 45S e o mecanismo de herança dos genes ativos, permanecem abertas. A espécie Crotalaria juncea (Leguminosae-Papilionoideae), com 2n=2x=16 cromossomos, que possui um locus de rDNA 45S no braço curto do cromossomo 1, que sempre forma constrição secundária, e um sítio adicional com atividade facultativa no braço curto do cromossomo 4, é um excelente modelo para o estudo destas questões. No contexto apresentado, foram estudadas a dinâmica de condensação das NORs durante o ciclo celular e sua correlação com a atividade dos genes ribossomais, incluindo o locus adicional, e ainda o papel da metilação da citosina do DNA durante estes processos. Os resultados demonstram que a cromatina da região organizadora do nucléolo segrega em um estado descondensado durante a mitose, na forma de constrição secundária, ou seja, tal estrutura não se condensa durante a metáfase e não volta a se distender no início da telófase. Aparentemente, o que causa correlações equivocadas entre a atividade nucleolar e a observação morfológica da constrição secundária na metáfase é a contração forçada da cromatina da NOR causada por agentes antimitogênicos. Este modelo de segregação em um estado aberto pode ser explicado pela descrição de diversas proteínas que permanecem diretamente ligadas ou indiretamente associadas à região da NOR durante a mitose, funcionando como uma barreira física para a compactação. Ambos os sítios, principais e adicionais, do rDNA 45S presentes em Crotalaria juncea apresentam atividade transcricional, embora o locus do cromossomo 4 mostre atividade facultativa. Ao contrário do que foi anteriormente proposto, uma vez ativo, o locus adicional permanece descondensado durante todo o ciclo mitótico, seguindo o mesmo comportamento dos sítios principais. As constrições secundárias e a cromatina nucleolar são hipermetiladas em nível citológico, independentemente de sua atividade. A aparente hipometilação observada no rDNA 45S em cromossomos mitóticos e núcleos interfásicos se deve ao menor grau de compactação da região organizadora do nucléolo e, consequentemente, à baixa densidade de cromatina.

Palavras-chave: rDNA 45S; Nucléolo; Constrição secundária; NOR; Metilação de DNA; Fibrilarina; Epigenética

ABSTRACT

Nucleolar dinamics and the epigenetic inheritance of ribosomal genes

The nucleolus is a subnuclear organelle formed as a result of transcriptional activity of ribosomal RNA genes 18S-5.8S-26S (45S rDNA) and subsequent ribosome biogenesis. This activity forms the nucleolar organizing region (NOR) as a secondary constriction in metaphase chromosomes. The secondary constrictions progressively condense during mitosis and decondense at the end of telophase, when nucleoli start to reassemble. Genomes presenting more than one 45S rDNA locus must have at least one pair of NOR bearing chromosomes, while other loci may be expressed or not. Ribosomal gene expression and nucleolar chromatin assembly are modulated by specific epigenetic events. Although some topics related to rDNA gene activity and nucleolus formation are well understood, guestions such as the behavior of nucleolar chromatin condensation during mitosis, standard functions associated with rDNA additional sites, role of epigenetic modifications in nucleolar chromatin and 45S rDNA expression processes, and inheritance mechanism of active genes, remain to be solved. Crotalaria juncea (Leguminosae – Papilionoideae) has 2n=2x=16 chromosomes and carries a 45S rDNA locus at the short arm of chromosome 1, always presenting a secondary constriction, and an additional site with facultative activity at the short arm of chromosome 4, being an excellent model to resolve these questions. Thus, this study aimed to study NOR condensation dynamics during the cell cycle and its correlation with ribosomal gene activity, including the additional *locus*, while analyzing the role of rDNA cytosine methylation during this process. The results show that NOR chromatin segregate in a decondensed way throughout mitosis, as a secondary constriction. In other words, this structure does not condense during metaphase and the NOR is not reassembled at the beginning of telophase. Misinterpretations relating nucleolar activity with morphological observations of secondary constrictions, appear to be induced by the artificial contraction of NOR chromatin caused by antimitotic drugs. This segregation model in an open state may be supported by strong diversity of proteins that are maintained attached to NORs during mitosis, serving as a physic barrier for condensation. Both principal and additional 45S rDNA sites of C. juncea are transcriptionally active, although the additional locus in chromosome 4 presented facultative activity depending upon ribosomal request. Unlike what was previously proposed, once the additional site is activated, it remains in an open configuration throughout the cell cycle, similarly to principal site behavior. Secondary constrictions and nucleolar chromatin are hypermethylated at cytological level, regardless of their activity. The seeming hipomethylated state of 45S rDNA in interphase nucleus and mitotic chromosomes is due to a lower compaction level of nucleolar organizing regions and subsequent low chromatin density.

Keywords: 45S rDNA; Nucleolus; Secondary constriction; NOR; DNA methylations; Fibrillarin; Epigenetics

1 INTRODUÇÃO

Células em atividade demandam uma constante produção de rRNA para assegurar o suprimento de ribossomos necessários à síntese protéica. Parte da biogênese ribossomal acontece no interior do nucléolo. Dentre seus componentes, um dos mais importantes são os *clusters* de genes de rRNA 45S (ou rDNA 45S) arranjados *in tandem*. O motivo do rDNA 45S compreende os genes de rRNA 18S, 5.8S e 26/28S intercalados por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e flanqueados por espaçadores transcritos externos (ETS1 e ETS2). Este arranjo gênico, por sua vez, é separado por um espaçador intergênico (IGS) que carrega sequências regulatórias, como o promotor gênico e diversos *enhancers*. Apesar dos *loci* de rDNA 45S possuírem de centenas a milhares de cópias, dependendo do organismo, apenas uma fração muito pequena destes genes é realmente expressa.

Os genes ribossomais tem sua expressão máxima durante a interfase e prófase. Ao final da prófase, a síntese de rRNA começa a declinar até que seja cessada, quando o nucléolo é desfeito. Deste modo, acredita-se que à medida que a síntese de rRNA decai, o nucléolo se desestrutura e a região da NOR, antes distendida, se condensa progressivamente ao longo do restante do ciclo. Consequentemente, durante a metáfase final, anáfase e telófase inicial o *locus* de rDNA 45S permaneceria condensado e, portanto, inativo. Somente ao final da telófase estes *loci* começariam a se distender novamente e os genes voltariam a entrar em atividade para formar novos nucléolos. Esta dinâmica de condensação e descondensação das constrições secundárias durante o ciclo celular é bem aceita entre os citologistas, embora não tenham sido feitos estudos específicos acerca deste comportamento.

Atualmente, acredita-se que o controle da expressão gênica é mediado por alterações na conformação da cromatina, mediante mecanismos epigenéticos, dentre os quais estão as modificações pós-translacionais nas caudas N-terminais das histonas e modificações covalentes nos nucleotídeos, como a metilação de citosinas do DNA. Algumas modificações são marcas específicas para certos tipos de controle, como por exemplo, a metilação da H3K9 e a hipermetilação de citosinas do DNA são relacionadas ao silenciamento gênico, enquanto a metilação da H3K4 e a hipometilação de citosinas do DNA são conhecidas como marcadores para eucromatina.

A metilação de citosinas do DNA tem sido o principal objeto de estudo acerca do controle epigenético da expressão dos genes ribossomais. A partir de dados citológicos é descrito na literatura que, a região da heterocromatina perinucleolar se apresenta hipermetilada, enquanto a eucromatina do rDNA 45S se encontra hipometilada, pelo fato das constrições secundárias de cromossomos metafásicos não apresentarem marcação quando imunodetectadas contra a 5'-metilcitosina. Apesar destas constatações, dados moleculares demonstraram que apenas uma pequena fração do total de genes possui apenas um curto trecho da região promotora hipometilada, sendo esta região responsável pela atividade ou não do gene downstream. A ambiguidade destas informações não permite conhecer, de fato, qual o padrão de metilação dos arranjos de rDNA 45S, talvez por não terem sido feitas análises minuciosas, utilizando-se de técnicas com resolução suficientemente capaz de detalhar tal padrão. Considerando que a metilação de citosinas do DNA é relacionada à compactação da cromatina, a condensação das constrições secundárias durante a mitose teria que resultar no aumento dos níveis desta modificação. Consequentemente, tais regiões se mostrariam tão brilhantes quanto as heterocromatinas perinucleolares durante toda a mitose, quando imunolocalizadas contra a 5'-metilcitosina. Porém, não se sabe ao certo qual o comportamento da metilação de citosinas do DNA e se existem flutuações desta indexação durante o ciclo celular.

No sentido de comprovar tais hipóteses e ampliar os conhecimentos citológicos acerca da nucleologênese e do comportamento e indexação epigenética do rDNA 45S, o presente trabalho objetiva caracterizar:

I. a dinâmica da estruturação e desestruturação do nucléolo no ciclo mitótico;

- II. a atividade do organizador nucleolar adicional presente no cromossomo 4;
- III. o comportamento das constrições secundárias durante o ciclo celular;
- IV. o padrão de metilação das citosinas do DNA dos genes ribossomais;
- V. a organização dos genes ribossomais 18S e 26S no genoma,

a partir das metodologias de Hibridação Molecular *in situ* Fluorescente (FISH) utilizando como sonda o arranjo dos genes de rRNA 45S, ou os genes de 18S e 26S individualmente, da imunolocalização da fibrilarina, uma importante proteína nucleolar, e da imunodetecção da 5'-metilcitosina, principal modificação epigenética relacionada ao controle da expressão gênica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura do nucléolo

De acordo com a extensa revisão feita por Montgomery (1899), a primeira observação do nucléolo foi feita por Fontana (1781), a partir da descrição do tecido epidérmico de enguias. Este autor chamou o núcleo de "corpos oviformes" e o nucléolo de "une tache" (do francês, "uma mancha"). O termo nucléolo foi introduzido por Valentin (1836, apud SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983), decorrente da observação de preparações citológicas, onde foi visualizada uma mancha densamente corada no interior dos núcleos. O estudo do comportamento do nucléolo no ciclo celular foi primeiramente descrito por Quatrefage (1849), que observou, em meiócitos de vermes, que esta estrutura desaparecia ao longo da divisão celular. Leydig (1852) observou a presença de estruturas vacuolares no interior dos nucléolos, correspondendo à primeira descrição da complexidade estrutural deste subcompartimento nuclear. A partir da coloração com azul de toluidina, Ruzicka (1899) notou que no interior do nucléolo haviam corpúsculos densamente corados, aparentemente correspondentes ao que hoje se chama de centros fibrilares. Usando de técnicas de impregnação por nitrato de prata em estudos de neurohistologia, Cajal (1903) descreveu vários tipos nucleolares, notando grânulos altamente corados, porções de pouca coloração e alguns indicativos da presença de redes, formadas por material prata positivo no interior do nucléolo. Deste modo, o nucléolo foi tratado como uma estrutura comum no interior dos núcleos, antes mesmo da descrição dos cromossomos e do seu papel na divisão celular ter sido realizada (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983).

A primeira associação entre um segmento cromossômico específico e a formação do nucléolo na intérfase foi feita por Heitz (1931, apud SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983) e posteriormente chamado por McClintock (1934) de "organizador nucleolar". Quando ocorre a expressão deste *locus*, a região é então chamada "Região Organizadora do Nucléolo" (abrevia-se RON ou NOR). A aparição de um nucléolo é, portanto, o resultado da expressão desta fração cromossômica, correspondente ao conjunto de genes ribossomais, ou genes de rRNA ou rDNA (SÁEZ-VÁSQUEZ; MEDINA, 2008). A primeira correlação da constrição secundária ao aparecimento do nucléolo foi feita por McClintock (1934). Posteriormente, a partir

da imunolocalização de componentes do complexo da RNA polimerase I, tais como UBF (fator de ligação *upstream*), SL1/TIFIB, entre outras proteínas que permanecem ligadas às NORs em cromossomos metafásicos, as constrições secundárias passaram a ser associadas à atividade transcricional dos genes ribossomais (ROUSSEL et al., 1993). Tais proteínas podem ser localizadas nas NORs ativas a partir da impregnação por nitrato de prata (HOWELL, 1977). A técnica de coloração usando nitrato de prata (bandamento Ag-NOR) é conhecida por ser capaz de corar diferencialmente proteínas argirófilas envolvidas no controle da expressão e processamento dos genes ribossomais. As principais proteínas prata-positivas são a nucleolina e a proteína B23, detectadas durante a intérfase, e a subunidade maior da RNA polimerase I, a fibrilarina, juntamente a alguns fatores de transcrição, como o UBF e o SL1, que além de estarem presentes na intérfase, permanecem de alguma maneira associadas à contrição secundária durante a mitose (ROUSSEL; HERNANDEZ-VERDUN, 1994).

As extremidades da NOR se comportam como *knobs* heterocromáticos, cuja função, apesar de pouco conhecida, aparentemente está associada à estruturação do nucléolo. A heterocromatina perinucleolar de humanos, tanto em NORs ativas quanto nas inativas, é composta por blocos de DNA satélite que circundam a NOR e *clusters* de genes de rRNA silenciados (SULLIVAN et al., 2001). Além disso, foi observado que a desestruturação desta região constantemente condensada está relacionada a instabilidades no rDNA, a desintegração do nucléolo e a senescência celular. Por meio de translocações recíprocas em cromossomos de milho, McClintock (1934) mostrou que o *locus* de rDNA 45S é redundante, ou seja, tal região é constituída de um arranjo repetitivo *in tandem* onde apenas uma fração dos genes estão ativos (WALLACE; LANGRIDGE, 1971), embora genes inativos sejam potencialmente passíveis de transcrição. Esta conclusão pôde ser tirada uma vez que a região translocada, correspondente à heterocromatina perinucleolar, foi capaz de formar um novo nucléolo em um cromossomo anteriormente não portador de sequências de rDNA 45S (McCLINTOCK, 1934).

Diferente das demais estruturas celulares, o nucléolo não possui membrana, sendo um agregado estável de macromoléculas composto de genes ribossomais, rRNAs precursores e maduros, enzimas para o processamento dos rRNAs, snoRNAs (pequenos RNAs nucleolares), proteínas ribossomais e ribossomos parcialmente montados (WARNER, 1979). Com o avanço da microscopia e das

técnicas moleculares foi descoberto que o nucléolo é responsável, principalmente, pela síntese e processamento do rDNA 45S, bem como pela biogênese dos ribossomos (BUSCH; SMETANA, 1970). No entanto, na última década tem sido comprovado que as funções do nucléolo vão muito além das listadas anteriormente, como por exemplo, no controle do crescimento e do ciclo celular, envelhecimento, tumorigênese. maturação е montagem de RNAs não ribossomais е ribonucleoproteínas (RNPs) e no sequestro ou exclusão de macromoléculas ou complexos macromoleculares não ribossomais (PEDERSON, 1998; OLSON et al., 2002). Isso provavelmente explica o conceito de "nucléolo plurifuncional" estabelecido por Pederson (1998), uma vez que muitos fatores nada relacionados à síntese e biogênese ribossomal foram identificados em extrações nucleolares (ANDERSEN et al., 2005; BOISVERT et al., 2007). Exemplos destes fatores são as proteínas nucleostemina (POLITZ et al., 2005) e uma transcriptase reversa relacionada à manutenção dos telômeros (DEZ et al., 2006).

A biogênese dos ribossomos ocorre basicamente em três etapas, cada uma em um subcompartimento específico dentro do nucléolo, sendo que, durante a intérfase tais etapas são responsáveis por sua estrutura e organização (DIMARIO, 2004). É uma característica geral em todos os modelos de funcionamento do nucléolo que seus componentes sejam organizados de forma vetorial e concêntrica, de forma que a biogênese parte do centro para as bordas. De acordo com a revisão feita por Schwarzacher e Wachtler (1983) os principais componentes nucleolares passíveis de serem visualizados em microscopia eletrônica são: o centro fibrilar (FC), o componente fibrilar denso (DFC) e o componente granular (GC). Os centros fibrilares compreendem uma rede de fibras frouxas e relativamente espessas, medindo de 4 a 8 nm de espessura, e quando visualizados em microscopia eletrônica correspondem às regiões de baixo contraste. Estas regiões são conhecidas por carregarem os genes de rRNA 45S ativos e alguns complexos protéicos. O componente fibrilar denso é composto de fibras de 3 a 5 nm de espessura fortemente compactadas, onde em microscopia eletrônica corresponde à porção opaca de forte contraste ao redor do FC. Apesar da presença da RNA polimerase I no FC ter sido reportada (GILBERT et al., 1995), em trabalhos posteriores, a partir de incorporação de Br-UTP, foi detectada atividade transcricional apenas na periferia do FC e notável atividade na zona de transição FC-DFC e no próprio componente fibrilar denso (CMARKO et al., 2000). Deste modo, este subcompartimento é considerado o local de transcrição pela RNA polimerase I e processamento inicial dos rRNAs. Por fim, o componente granular é onde estão imersos os demais componentes (FC e DFC), correspondendo ao local de processamento final do rRNA e montagem dos ribossomos. Tal componente é formado por grânulos esféricos de cerca de 15 nm de diâmetro, que correspondem às partículas pré-ribossomais em vários estágios de maturação (revisão em SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983; RAŠKA et al., 2004). Além destes componentes, alguns nucléolos de plantas podem possuir um vacúolo grande, único e central. Os vacúolos podem estar presentes em nucléolos com atividade transcricional e processamento muito elevados, típicos de células proliferativas em estágio G2 do ciclo celular (DELTOUR; BARSY; DE, 1985).

Dependendo do estado funcional da célula o nucléolo terá determinada forma e tamanho, sugerindo que o tipo de nucléolo reflete os níveis de atividade transcricional (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983). Dentre os tipos de nucléolo podem ser citados basicamente três: os nucléolos em forma de anel, nucléolos com nucleolonema e os nucléolos compactos. O nucléolo em forma de anel possui um único centro fibrilar central, imerso em uma zona relativamente fina de componente fibrilar denso, que por sua vez é rodeado pelo componente granular. Este tipo de nucléolo está presente em células com baixa atividade transcricional e corresponde a uma NOR parcialmente distendida. O nucléolo com nucleolonema se caracteriza por apresentar uma rede de componente fibrilar denso em cujos loops estão alocados os centros fibrilares. O componente granular está presente ao redor de todo o componente fibrilar denso. Este segundo tipo corresponde às células em início de uma elevada atividade transcricional e, por isso, mostra uma NOR bastante distendida. Um nucléolo compacto possui vários centros fibrilares, rodeados por uma camada relativamente espessa de componente fibrilar denso e incorporados em grandes áreas de componente granular. Células altamente ativas estão associadas a este tipo de nucléolo, mostrando NORs ainda mais distendidas que nos nucléolos com nucleolonema (revisão em SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983; RAŠKA et al., 2004).

Há quase quatro décadas o processo de fusão nucleolar foi descrito como sendo um processo extremamente ativo e dinâmico que ocorre sempre que mais de um par cromossômico apresenta atividade nucleolar (ANASTASSOVA-KRISTEVA, 1977). Em células HeLa, durante o G1, a fusão de dois nucléolos leva menos de 3 minutos para ocorrer. Este comportamento explica o número médio de nucléolos observados na intérfase ser de apenas dois ou três nucléolos, enquanto o número de NORs ativas neste tipo celular geralmente são seis (SAVINO et al., 2001).

A manutenção dos centros fibrilares através da mitose, proposta por Schwarzacher e Wachtler (1983), provavelmente ocorra, uma vez que fatores transcricionais como o UBF são capazes de manter a cromatina dos genes ativos livre de nucleossomos e transmiti-las para as células filhas (SANIJ; HANNAN, 2009).

2.2 Genes de rRNA

O DNA ribossomal é um tipo de sequência repetitiva organizada *in tandem* presente no genoma de todos os eucariotos. Este arranjo repetitivo se organiza em forma de grandes *loci* em um ou mais pares de cromossomos. O motivo ribossomal é constituído dos genes de rRNA 18S, 5.8S e 26/28S intercalados por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e flanqueados por espaçadores transcritos externos (ETS1 e ETS2). Este arranjo gênico, por sua vez, é separado por um espaçador intergênico (IGS). No espaçador intergênico estão localizadas sequências regulatórias, como *enhancers* e o promotor gênico.

O repeat do rDNA 45S possui cerca de 10 Kb, podendo carregar de centenas a milhares de cópias gênicas (HESLOP-HARRISON, 2000). As regiões transcritas do rDNA 45S são altamente conservadas entre os organismos, enquanto os espaçadores intergênicos são altamente polimórficos, podendo variar amplamente mesmo entre espécies muito próximas (HESLOP-HARRISON, 2000). Devido a este polimorfismo, muitas vezes os espaçadores são usados em estudos filogenéticos (PAPAIOANNOU et al., 2013; LIU et al., 2013; SILVA et al., 2014).

A transcrição dos genes ribossomais de 45S tem por finalidade a formação das subunidades ribossomais menores (40S) e maiores (60S), que quando associados à complexos protéicos e o rRNA 5S, transcrito no nucleoplasma, originam os ribossomos.

A atividade transcricional do rDNA 45S e a formação do nucléolo são eventos intimamente relacionados, gerando um paradigma que diz que, não há formação de nucléolo sem a atividade destes genes, assim como os genes não podem entrar em atividade sem originar um nucléolo (McCLINTOCK, 1934). A atividade gênica do DNA ribossomal 45S tem como resultado o aparecimento de uma constrição

secundária no cromossomo metafásico, indicando que houve a formação de um nucléolo na intérfase precedente (CAPOA, DE et al., 1978). Porém, mesmo havendo expressão de determinado *locus*, pode ser que a constrição não permaneça distendida até o momento da metáfase, uma vez que o aparecimento desta estrutura é dependente da fase do ciclo celular em que se expressa e do tempo que permanece em atividade (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007). Por ocuparem posições bastante conservadas nos cromossomos, os *loci* de rDNA se tornaram importantes marcadores citológicos no estudo da evolução cariotípica (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2011).

Vários estudos moleculares têm sido feitos a fim de desvendar como se dá o controle da expressão dos genes ribossomais. Acreditava-se que os genes inativos permaneciam condensados em forma de heterocromatina perinucleolar, enquanto os genes ativos se encontravam dispersos no interior do nucléolo, agregando diversas macromoléculas necessárias à sua transcrição (revisão em SÁEZ-VÁSQUEZ; MEDINA, 2008). No entanto, observações em microscopia eletrônica, permitiram constatar que, mesmo dentro do nucléolo, uma grande porção da cromatina se encontra em estado condensado (BUSCH; SMETANA, 1970). Deste modo, apenas uma fração muito pequena do total de genes de rRNA é realmente expressa (FLAVELL; O'DELL; THOMPSON; et al., 1986). Isso ocorre em decorrência da redundância do rDNA 45S, que induz a ligação diferencial de proteínas e variações no estado de condensação do DNA entre genes do mesmo *locus*.

A transcrição dos rDNAs nucleolares é regulada principalmente por fatores de remodelação da cromatina e eventos epigenéticos específicos (McSTAY; GRUMMT, 2008). Apesar de o IGS ser, em sua maior parte, desprovido de sequências regulatórias e ser composto de múltiplos arranjos repetitivos simples e alguns elementos transponíveis (SYLVESTER et al., 2004), é nele que se encontram sequências fundamentais, como o promotor gênico e motivos repetitivos que funcionam como *enhancers*, responsáveis por modular a expressão do gene *downstream* (McSTAY; GRUMMT, 2008). Esta região que separa unidades repetidas adjacentes é composta de *subrepeats* relacionados ao promotor gênico e outras sequências repetidas, sendo descritas em vários gêneros, como em *Xenopus* (REEDER, 1984), *Drosophila* (COEN; DOVER, 1982) e trigo (FLAVELL; O'DELL; SHARP; et al., 1986). As unidades completas do rDNA apresentam considerável

variação de tamanho devido à variabilidade entre as sequências do IGS, em razão do número de repetições que o compõe e do polimorfismo dos *subrepeats* (FLAVELL; O'DELL; THOMPSON; et al., 1986).

O espaçador intergênico (IGS) possui um grande número de sítios CpG. Vários trabalhos demonstraram que, em animais, a expressão dos rDNAs está associada à ausência de metilação em resíduos de citosina específicos (CEDAR, 1988; McSTAY; GRUMMT, 2008). Em plantas, existe uma forte controvérsia nesta situação, uma vez que a atividade gênica foi correlacionada a um estado de hipometilação (FLAVELL et al., 1986a; BIANCHI; VIOTTI, 1988). No entanto, Flavell et al. (1988) demonstrou que os genes de rRNA se encontram metilados em quase todos os sítios CCGG ou GCGC, e que uma fração pequena destes genes não estão metilados em algumas posições específicas. Sardana et al. (1993) demonstraram, em trigo, que grande parte dos genes de rRNA apresentam metilações em todos estes sítios, de modo que genes ativos, assim como em animais, mostram altas proporções de desmetilações em sítios específicos na região do promotor. Neste trabalho, também foi proposto que genes com espaçadores maiores carregam mais repeats que funcionam como enhancers, e apresentam, portanto, um maior número de desmetilações pontuais. Estes genes com promotor mais hipometilado geralmente correspondem a genes ativos. Os resultados obtidos por Lawrence et al. (2004) em Arabidopsis thaliana e seu alotetraplóide A. suecica, corroboram ainda mais esta hipótese. Em seu trabalho, por meio de sequenciamento de DNA mediado por bissulfito, além de mostrarem a pontualidade das hipometilações upstream ao promotor de genes ativos, também comprovaram a íntima associação entre a metilação de citosinas e modificações de histonas na modulação da cromatina e controle da expressão do rDNA 45S. A partir da técnica de sequenciamento mediado por bissulfito e dados de western blot, também em A. thaliana, Pontvianne et al. (2013) comprovaram a existência de regiões hipometiladas pontuais apenas nas redondezas do promotor, upstream ao gene de 18S. Além disso, demonstraram que a parte codante dos genes é altamente metilada.

Resultados citológicos em plantas têm considerado as constrições secundárias e, consequentemente, os genes que as compõe, como sendo regiões hipometiladas, e apenas a heterocromatina perinucleolar como hipermetilada (MARQUES et al., 2011). Porém a ambiguidade entre tais informações e dados moleculares de sequenciamento mediado por bissulfito (LAWRENCE et al., 2004;

PONTVIANNE et al., 2013) já descritos acima, são totalmente discordantes com relação à real indexação epigenética dos genes ribossomais. Nestes trabalhos foi mostrado que a indexação diferencial entre eucromatina e heterocromatina se restringe aos níveis de metilação do promotor gênico e suas redondezas, de modo que, genes da porção heterocromática têm seus promotores hipermetilados ou parcialmente metilados com maior frequência (40% e 23%) que aqueles da porção eucromática (16% e 4%). Do mesmo modo, os genes da porção eucromática possuem promotores mais frequentemente hipometilados (80%) que os promotores da região hetecromatinizada (37%). Embora não faça parte da formação do nucléolo, os genes de rRNA 5S são altamente metilados, mesmo quando em atividade (MATHIEU et al., 2003), demonstrando a possibilidade deste padrão se repetir no caso do rDNA 45S.

Considerando o que ocorre em Drosophila, organismo que não metila o DNA, algo além da metilação de citosinas precisa estar envolvido no processo de condensação e silenciamento da cromatina ribossomal inativa, uma vez que este mecanismo é altamente conservado entre todos os organismos vivos (PIKAARD, 2000a). A metilação do DNA tem sido considerada um sinalizador no recrutamento de desacetilases de histonas, mediado por proteínas de ligação a sítios metil-CpG (revisão em PIKAARD, 1999; EDEN et al., 1998). Deste modo, as metilações de citosinas funcionam como guias para o estabelecimento de um estado fechado da cromatina, impedindo o acesso da maquinaria de transcrição a promotores gênicos hipermetilados (revisão em PIKAARD, 2000b; KLOSE; BIRD, 2006). Esta poderia ser uma das explicações pela qual o rDNA 45S precisa estar altamente metilado em organismos superiores. Além disso, em humanos, foi constatado que a hipometilação do rDNA está relacionada ao decréscimo da estabilidade genômica, tornando estes genes mais acessíveis à maquinaria de recombinação que causa uma série de patologias (McSTAY; GRUMMT, 2008). Assim sendo, a metilação do rDNA 45S é necessária, embora sozinha não seja capaz de causar o silenciamento dos genes.

2.3 Nucleologênese

Durante muito tempo o nucléolo foi utilizado como modelo no estudo dos processos de desorganização nuclear durante a mitose e da reorganização de

domínios funcionais no início da intérfase (DIMARIO, 2004). Nos últimos anos, diversos estudos têm sido feitos a fim de decifrar e descrever o ciclo de estruturação e desestruturação nucleolar e a complexidade destes processos. Como explicado nos tópicos anteriores, o rDNA 45S é transcrito e processado no interior deste território subnuclear. Os rRNAs 18S, 5.8S e 26S são então associados à proteínas específicas para produzir as subunidades maior (5.8S, 26S e 5S rRNAs) e menor (18S) dos ribossomos.

Durante a intérfase, a configuração organizacional do nucléolo reflete a compartimentalização da maquinaria de transcrição, processamento e montagem das subunidades ribossomais (HERNANDEZ-VERDUN, 2011). Resumidamente, a iniciação da transcrição ocorre no limite do FC-DFC (centro fibrilar - componente fibrilar denso), o processamento inicial e montagem da subunidade menor no DFC e o processamento final e montagem da subunidade maior no GC (componente granular). Deste modo, a atividade e localização de marcadores específicos podem ser utilizadas para descrever e analisar a dinâmica de cada etapa da biogênese ribossomal.

A partir do início da mitose e no decorrer de seu curso, fosforilações em uma série de fatores transcricionais específicos do complexo da polimerase I, além de promoverem a supressão da transcrição, também são responsáveis pela manutenção deste estado ao longo de toda a divisão (revisão em HERNANDEZ-VERDUN, 2011). Este evento de parada da maquinaria de transcrição é o responsável por desencadear a desestruturação do nucléolo (OLSON; DUNDR, 2005). Os níveis destas fosforilações flutuam fortemente durante a prófase, marcando a parada dos processos de transcrição e processamento dos RNAs, nesta ordem, por intermédio da mesma via de sinalização. As fosforilações são então revertidas durante a anáfase, quando proteínas componentes da maquinaria da polimerase I e de processamento das partículas pré-ribossomais teriam que retornar aos seus locais de atividade, para reorganização do nucléolo durante a telófase. Tais constatações levam a crer que os complexos de transcrição e processamento do rDNA parecem ser reguladas pela mesma via durante a mitose. Porém, temporizações distintas devem ser consideradas durante a prófase, uma vez que, pré-rRNAs parcialmente processados se acumulam, indicando que a supressão do processamento é anterior a da transcrição (revisão em DIMARIO, 2004).

25

A transcrição do rDNA 45S em eucariotos superiores tem início ao final da telófase, aumentando consideravelmente na fase G1 da intérfase e com pico máximo em G2, quando decresce progressivamente até que, na prófase, a produção é cessada (revisão em HERNANDEZ-VERDUN, 2011). No início da prófase foi constatado um decréscimo de cerca de 30% na transcrição do rDNA (GÉBRANE-YOUNÈS et al., 1997). Deste modo, a parada da transcrição associada ao desprendimento de proteínas presentes no DFC e GC começa a causar alterações no formato e estruturação do nucléolo (GAUTIER et al., 1992). Dentre as principais proteínas ribossomais envolvidas neste processo estão a fibrilarina, a nucleolina e a Nopp140, componentes do DFC, e a NPM/B23, Bop1, Nop52, PM-Scl 100 e Ki67, localizada no CG. A proteína fibrilarina é uma das proteínas nucleolares mais abundantes relacionadas ao processamento inicial dos rRNAs recém sintetizados, funcionando como a principal metiltransferase dos RNAs ribossomais pela associação aos pequenos RNAs nucleares (snRNAs) U3, U8 e U13 (TOLLERVEY et al., 1993; NICOL et al., 2000; TYC; STEITZ, 1989). Porém, foi descrito um decréscimo progressivo da concentração de fibrilarina na periferia do DFC, indicando sua função no processamento inicial das partículas pré-ribossomais que ocorre na região intermediária do nucléolo (CERDIDO; MEDINA, 1995).

A maioria destas proteínas nucleolares, juntamente a vários snoRNAs e rRNAs 45S, se soltam de seus sítios de ligação e se associam a uma espécie de rede, para que possam transpassar pela mitose, formando o compartimento pericromossômico (revisão em HERNANDEZ-VERDUN, 2011; DIMARIO, 2004). No entanto, o mecanismo que estabelece a associação entre este compartimento e o cromossomo permanece desconhecido.

Ao final da prófase, quando a atividade da RNA polimerase I é cessada, o nucléolo não é mais visível, porém, diversas proteínas necessárias à formação do novo nucléolo nas células filhas são armazenadas e mantidas em diferentes locais no decorrer do ciclo celular (GÉBRANE-YOUNÈS et al., 1997). Embora ocorra a parada da transcrição, parte da maquinaria da RNA polimerase I permanece próxima ou diretamente associada à constrição secundária. Dados comprovam que fatores transcricionais, como o UBF, permanecem ligados por grandes extensões dos genes ribossomais, e especulações são feitas acerca do seu papel na formação da constrição secundária de NORs ativas (PRIETO; McSTAY, 2008).

A maquinaria necessária para a reorganização nucleolar é herdada pelas células filhas após a mitose. Em células HeLa foi observado que as proteínas fibrilarina e Nop52, que se associam aos PNBs (corpos pré-nucleolares), migram juntamente aos cromossomos durante a anáfase. A imunolocalização destas proteínas não mostra uma íntima associação com o cromossomo, mas aparecem na forma de pequenos corpúsculos próximos à região da NOR (SAVINO et al., 2001).

O processo de formação de um novo nucléolo tem início na telófase e se estende até o início da intérfase. Porém, consiste de eventos bastante complexos e pouco conhecidos, que ocorrem durante um longo período do ciclo celular. Em células HeLa, por exemplo, das 22 horas necessárias para que um ciclo celular se complete, 2 horas são direcionadas apenas para a reorganização do nucléolo (MURO et al., 2010). A estruturação de um novo nucléolo envolve a ativação da maquinaria de transcrição, bem como sua associação aos genes de rDNA, a formação dos PNBs e a translocação dos complexos RNPs, dos PNBs para os sítios de transcrição (HERNANDEZ-VERDUN, 2011). Embora a reorganização do nucléolo seja associada à reativação da transcrição pela RNA polimerase I, foi demonstrado que a transcrição dos genes ribossomais não é capaz de organizar um nucléolo completo. Este processo também depende de diversos fatores e moléculas, como as cerca de 80 proteínas ribossomais envolvidas, snoRNAs, bem como o rRNA produzido durante a prófase anterior que ainda não foi completamente processado (DOUSSET et al., 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

No presente estudo foi utilizado o acesso CJ-1 da espécie Crotalaria juncea L. (Família Leguminosae-Papilionoideae, seção Calycinae) pertencente ao banco de sementes do Departamento de Genética – ESALQ/USP. Este acesso apresenta um *locus* de rDNA 45S no braço curto do cromossomo 1, caracterizado como sendo o principal organizador nucleolar, e um sítio adicional menor no braço longo do cromossomo 4, com atividade facultativa.

3.2 Métodos

3.2.1 Germinação

As sementes foram germinadas de acordo com o protocolo descrito por Cuco et al. (2003). O procedimento consistiu na escarificação das sementes em ácido sulfúrico durante 15 minutos e posterior lavagem em água corrente para retirada do excesso de ácido. O material foi seco ao ar por 24 horas e armazenado a 4°C até o momento de uso. As sementes foram então colocadas em placas de Petri forradas, com papel de filtro umedecido, para emissão dos hipocótilos e posterior semeadura em *Sphagnum*, sob temperatura controlada, variando de 28 a 30°C. A coleta das raízes foi realizada quando estas atingiram cerca de 1 cm de comprimento. O material destinado às análises do ciclo celular foi coletado, imediatamente fixado em fixador de Carnoy (3 partes de álcool etílico : 1 parte de ácido acético) e armazenado a -4°C. Aquelas submetidas às preparações de imunocitoquímica foram fixadas em paraformaldeído a 4% em 1x PBS e mantidas em 1x PBS para serem imediatamente utilizadas.

3.2.2 Pré-tratamento das raízes com inibidores do fuso mitótico

As raízes coletadas foram pré-tratadas em solução de 8-hidroxiquinolina a 300 ppm durante 3 horas (CUCO et al., 2003) para inibição do fuso mitótico, permitindo o acúmulo de células em pro-metáfase e metáfase. Após o pré-

tratamento, o material foi fixado em solução de Carnoy (3 partes de álcool etílico : 1 parte de ácido acético) e conservado a -4°C.

3.2.3 Preparação das lâminas

As lâminas destinadas à FISH, seguida ou não de imunolocalização da citosina metilada do DNA, foram preparadas de acordo com os procedimentos convencionais da metodologia de esmagamento celular (SCHWARZACHER; HESLOP-HARRISON, 2000). A lamínula foi removida em nitrogênio líquido e a lâmina foi seca ao ar para posterior armazenamento a -20°C até o momento de uso.

Para a imunodetecção da proteína fibrilarina as pontas de raízes foram fixadas em paraformaldeído a 4% em 1x PBS por 10 minutos sob vácuo a 1 atm e a seguir lavadas em 1x PBS por 10 minutos, também sob vácuo. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento utilizando 1x PBS gelado para a dissociação do meristema. A lamínula foi removida em nitrogênio líquido e a lâmina foi mantida em 1x PBS a temperatura ambiente até o momento da imunodetecção.

3.2.4 Hibridação Molecular in situ Fluorescente (FISH)

Foram utilizadas como sondas para os sítios ribossomais os produtos das reações de PCR a partir do DNA genômico de *Crotalaria juncea*. Estas sondas consistiram da sequência dos genes de rDNA 45S (18S-5.8S-25S) (unidade de cerca de 6,5 Kb), e dos genes do rDNA 18S e 26S contendo, respectivamente 1,8 Kb e 1,6 Kb. Devido ao comprimento dos fragmentos as reações foram conduzidas com o kit GoTaq® Long PCR Master Mix (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. Os *primers* utilizados seguem as especificações da tabela 1, de modo que o *primer_F* usado para gerar o fragmento do 18S e do 45S é o mesmo, bem como o *primer_R* usado para obtenção das sondas de 26S e 45S é o mesmo. Estes *primers* foram desenhados de modo que o gene de 18S seja composto de uma porção do espaçador intergênico, possivelmente carregando a região promotora.

Tabela 1 - Lista de *primers* utilizados para geração das sondas de rDNA 18S, 26S e 45S usadas nos experimentos de FISH

Sonda	Primer Forward	Primer Reverse
18S	5' TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTC 3'	5' CAATGATCCTTCCGCAGGTTCAC 3'
26S	5' TTTAACAGCCTGCCCACCCTGG 3'	5' GCAAAGGATTGTACCCGCCGC 3'
45S	5' TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTC 3'	5' GCAAAGGATTGTACCCGCCGC 3'

As sequências de DNA foram marcadas com biotina via *nick translation* (BioNick[™] DNA Labeling System - Life Technologies®) ou com digoxigenina via *random priming* (Dig DNA Labeling and Detection Kit - Roche®), conforme recomendações dos respectivos kits.

A FISH seguiu os protocolos descritos por Mondin; Santos-Serejo; Aguiar-Perecin (2007). As preparações cromossômicas, previamente preparadas e conservadas em freezer a -20°C passaram por uma fase de permeabilização para melhor penetração de sondas e anticorpos. A permeabilização ocorreu através da incubação das lâminas em 1x PBST (0,1% Triton X100) por 40 minutos em câmara úmida a 37°C, seguida lavagens em 1x PBS e água, por 5 minutos. Em seguida as preparações foram desidratadas em série alcoólica (70%, 96% e 100%) por 5 minutos em cada concentração. As lâminas foram então submetidas às lavagens pré-hibridação com RNase (5µg/µl) e pepsina (5µg/µl) para remoção do RNA e do excesso de proteínas do material. Em seguida, fixadas em paraformaldeído a 4% e desidratadas em série alcóolica (70%, 96% e 100%).

A mistura para a hibridação foi composta por 50% formamida, 2x SSC, 10% dextran sulfato, 0,1% SDS, 1 mg/ml de "*herring sperm DNA*" e 6 ng/µl de rDNA 45S, 18S ou 26S. Esta mistura foi desnaturada a 95-98°C por 10 minutos e imediatamente imersa em gelo. Posteriormente, foram adicionados 25 µl da mistura de hibridação sobre cada lâmina. Estas foram seladas e em seguida colocadas em termociclador (PTC-100, MJ) onde foram aquecidas a 92°C por 10 minutos e a 37°C por 20 horas, para que ocorresse a hibridação. Após a hibridação, as preparações passaram por lavagens pós-hibridação, sendo uma vez em 2x SSC a 42°C por 5 minutos, duas lavagens em formamida a 20%/0.5x SSC a 42°C (74% de estringência) por 5 minutos e uma vez em 0,5x SSC 42°C por 5 minutos. A sonda de rDNA 45S, marcada com biotina, foi detectada com o anticorpo secundário "mouse" –

TRITC (Dako®) e "swine anti-rabbit" – TRITC (Dako®), enquanto as sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas com "sheep anti-dig" – fluoresceína (Roche®) seguido do anticorpo secundário "donkey anti-sheep" AlexaFluor® 488 (Life Technologies®). A concentração de todos os anticorpos secundários utilizados foi de 1:150. A contra-coloração foi realizada com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) a 0,2 µg/ml e a montagem das lâminas em 5 µl de Vectashield H-1000.

Nas preparações contendo fibras estendidas de DNA a mistura de hibridação foi colocada diretamente sobre a lâmina, sem a necessidade de permeabilização e lavagens pré-hibridação. Do mesmo modo não foram feitas lavagens com estringência. A detecção das sondas seguiu os procedimentos descritos anteriormente.

3.2.5 Imunodetecção

As preparações citológicas foram bloqueadas em solução de BSA a 1% em 1x PBST a 37°C por 60 minutos e então incubadas em anticorpo primário (1:500) a 37°C por 1 hora, e lavadas 2 vezes em 1x PBST por 5 minutos. Em seguida, foram incubadas em anticorpo secundário (1:150) a 37°C por 1 hora e então lavadas 2 vezes em 1x PBST por 5 minutos cada. As lâminas foram contra-coradas com DAPI e secas ao ar para montagem em 5µl de Vectashield H-1000.

Para a imunodetecção da metilação do carbono 5' da citosina do DNA, o anticorpo primário utilizado foi um anticorpo monoclonal "mouse anti-5'- methylcytosine" (Abcam® - ab10805) o qual foi detectado com um anticorpo secundário "rabbit-anti-mouse" – FITC (Dako®).

Para a imunolocalização da fibrilarina, o anticorpo primário utilizado foi um anticorpo monoclonal "mouse anti-fibrillarin" (Abcam® - ab4566) o qual foi detectado com um anticorpo secundário "rabbit anti-mouse" conjugado ao TRITC (Dako®).

3.2.6 Obtenção das fibras estendidas

Para obtenção de fibras estendidas de DNA, núcleos intactos foram isolados de folhas jovens e frescas, a partir da maceração em nitrogênio líquido e ressuspensão em tampão NIB (120mM KCI, 30mM NaCI, 1mM espermidina, 680mM sacarose, 30mM Tris base - de acordo com COLD SPRING HARBOR

PROTOCOLS, 2008) contendo β -mercaptoetanol a 0,1%. O macerado foi então filtrado em tecido de nylon (Mesh 100/150µm) e centrifugado a 2000g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 20ml de tampão NIB sem β -mercaptoetanol e contendo Triton X-100 a 0,5%. A suspensão foi mantida em gelo por 5 minutos e a seguir filtrada em tecido de nylon (Mesh 170/88µm). O filtrado foi novamente centrifugado conforme descrito anteriormente e o *pellet* ressuspendido em tampão NIB contendo Triton X-100. O processo foi repetido para filtragem com tecido de nylon de Mesh 200/62µm e de Mesh 400/37µm. Após a última filtragem e centrifugação o *pellet* foi ressuspendido em 1 ml de tampão NIB puro.

Para a preparação das lâminas, uma alíquota de 3 µl foi espalhada sobre uma lâmina silanizada Fisherbrand® (Fisher Scientific), deixando-a secar por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir foi colocado tampão de lise STE (0,5% SDS, 5 mM EDTA, 100 mM Tris pH 7,0) sobre toda a extensão da lâmina, deixando agir por 15 minutos em câmara úmida a 37°C. A lâmina foi então colocada imediatamente em posição vertical e com uma pipeta foi aplicado o tampão de lise STE sobre a amostra, deixando o líquido escorrer lentamente para que arrastasse o DNA para fora dos núcleos. O material foi imediatamente fixado por gotejamento em fixador de Carnoy gelado, para a completa extensão das fibras. Posteriormente a lâmina foi fixada por imersão na mesma solução durante 5 minutos. A amostra foi seca ao ar por 10 minutos e a seguir montada em 6µl de DAPI para verificação da qualidade das fibras. Para retirada da lamínula o material foi imerso em fixador Carnoy por cerca de 3 minutos. As preparações foram conservadas em freezer a -20°C até o momento de uso.

3.2.7 Caracterização morfométrica dos sítios ribossomais

Metáfases mitóticas, contendo todos os quatro sítios ribossomais condensados, foram selecionadas para análise morfomética dos *loci* de rDNA, por análise de imagem, e posterior transformação em unidades de mega pares de base (Mbp).

As imagens foram processadas usando a ferramenta análise do Adobe Photoshop CS5. Os seguintes parâmetros foram mensurados: área, níveis de cinza (médio), densidade ótica integrada (IOD) e perímetro. 3.2.8 Microscopias e análise de imagens

As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorecência DM 4000 B Leica® acoplado a câmara Leica® DFC 365 FX, na qual as imagens foram digitalizadas pelo *software* LAS AF6000. Alguns experimentos foram analisados em microscópio de epifluorescência DM5500 Leica® com ferramenta de deconvolução.

As análises e processamento das imagens digitalizadas e montagem das pranchas foram feitos com o *software* Adobe Photoshop CS5 Extended.

4 RESULTADOS

4.1 Imunodetecção da fibrilarina durante o ciclo celular

A proteína fibrilarina, um marcador de atividade nucleolar, foi usado para substituir a técnica de bandamento-NOR no mapeamento da nucleologênese durante o ciclo celular, bem como para a análise das diferentes configurações nucleolares na intérfase e prófase.

Em todas as células avaliadas a fibrilarina foi imunodetectada apenas no interior dos nucléolos, confirmando os dados descritos na literatura para vários grupos de organismos. Tal proteína se encontra no componente fibrilar denso dos nucléolos, já que é uma das responsáveis pelo processamento dos pré-rRNAs. A periferia do nucléolo aparece negativa, correspondendo ao componente granular (Figura 1a seta). Do mesmo modo, algumas porções circulares não marcadas no interior do componente fibrilar denso podem corresponder aos centros fibrilares (Figura 1a cabeça de seta).

Esta metodologia permitiu avaliar a atividades dos loci de genes ribossomais de acordo com o número e tamanho dos nucléolos. Em núcleos interfásicos foram observadas várias configurações nucleolares (Figura 1a-g), a começar da mais comumente observada, com nucléolo único grande e central (Figura 1a). Este tipo nucleolar corresponde ao estágio mais avançado da nucleologênese, onde todos os nucléolos anteriormente formados já se fundiram em uma única estrutura, configuração mais frequentemente observada. Núcleos com dois nucléolos apresentaram outros dois padrões, o primeiro mostrando dois nucléolos grandes e aproximadamente do mesmo tamanho, correspondentes à atividade do par 1 (figura 1b), e o segundo tipo com um nucléolo grande e um bem menor, levando a conclusão de que o maior corresponda à atividade do par 1 já fusionados e o menor à atividade de um dos cromossomos 4 (figura 1c). Também foram observadas duas configurações com três marcas de fibrilarina, sendo a primeira com dois nucléolos grandes, correspondentes, cada um, a um cromossomo 1, e um nucléolo muito pequeno, relativo a um dos cromossomos 4 (figura 1d seta). A segunda marcação com três nucléolos apresentou uma marca grande, correspondente à atividade do par 1 já fundidos, e duas outras marcas bem pequenas e aproximadamente do mesmo tamanho, relacionados, cada uma, a um dos cromossomos 4 (Figura 1e). O
quarto e último tipo de configuração em núcleos interfásicos mostrou quatro marcas, também com dois padrões distintos. No primeiro foram observados quatro nucléolos com tamanhos decrescentes, mostrando claramente a atividade dos sítios principais, correspondentes aos dois sinais maiores, e dos sítios adicionais, na forma de dois sinais menores (Figura 1f). No segundo padrão com quatro marcas observou-se um nucléolo grande, correspondente ao *locus* de um dos cromossomos 1, e outros três nucléolos pequenos, onde um deles é maior e de marcação mais intensa que os demais, certamente o homólogo do par 1 (Figura 1g seta), e os outros dois bem pequenos e correspondentes aos *loci* do par 4 (Figura 1g).

Nas prófases, foi possível observar a separação e desestruturação dos nucléolos à medida que as células entram na mitose (Figura 1h-l). Diversas configurações também puderam ser observadas. A primeira delas, em prófase inicial, apresentou nucléolo único grande e central, onde os loci em atividade se encontram fusionados (Figura 1h). Com o decorrer da prófase os nucléolos fusionados durante a intérfase comecam a se individualizar novamente, uma vez que a cromatina está em processo de condensação para a entrada na metáfase. Deste modo, são observadas células com três e quatro nucléolos (Figura 1i-j). Nos núcleos profásicos com três nucléolos os loci relativos ao cromossomo 1 já se separaram do nucléolo menor, correspondente ao par 4, e começam a se individualizar entre si (figura 1i). Foi observado que os sítios dos cromossomos 4 também se separam um do outro (Figura 1j). Ao final da prófase os nucléolos começam a se dissociar e o padrão de marcação fica mais difuso (Figura 1k setas). No início da pró-metáfase, quando a transcrição dos genes ribossomais decai, apenas os organizadores nucleolares principais (cromossomos 1) podem ser observados, com padrão de marcação ainda mais difuso (Figura 1I).



Figura 1 – Imunolocalização da proteína fibrilarina em núcleos interfásicos e profásicos de células meristemáticas de *Crotalaria juncea.* a) Intérfase com um nucléolo; b) intérfase com dois nucléolos correspondendo à atividade dos sítios principais presentes no cromossomo 1; c) intérfase com dois nucléolos mostrando a atividade dos sítios presentes no cromossomo 1 fusionados (nucléolo maior) e de um dos cromossomos 4 (nucléolo menor); d) intérfase com três nucléolos relativos à expressão do locus do par 1 (nucléolos maiores) e de um dos cromossomos 4 (nucléolo maior) e de ambos sítios presentes no cromossomo 1 fusionados (nucléolos menor); e) intérfase com três nucléolos mostrando a atividade dos sítios presentes no cromossomo 1 fusionados (nucléolo maior) e de ambos sítios adicionais presentes no cromossomo 1 fusionados (nucléolo maior) e de ambos sítios adicionais presentes no par 4 (nucléolos menores); f-g) núcleo interfásico evidenciando a atividade dos quatro loci de rDNA 45S em atividade; h) prófase com um nucléolo; i-k) prófases iniciais evidenciando a desestruturação nucleolar durante a condensação cromossômica para iniciação da mitose; l) prófase final indicando a permanência do nucléolo principal e padrão disperso de marcação da fibrilarina. Barra = 5 μm

Foi realizado o mapeamento de toda a nucleologênese ao longo do ciclo celular, a fim de descrever o processo de estruturação e desestruturação do nucléolo. Durante a intérfase o nucléolo se apresenta bastante estruturado com claras distinções entre seus componentes, como descrito anteriormente (Figura 1a; 2a). Durante a prófase, o nível transcricional dos genes ribossomais decai progressivamente, fazendo com que o padrão de marcação se torne cada vez mais disperso e difuso (Figura 2b-e). No início da metáfase, quando os cromossomos ainda estão se organizando na placa equatorial, podem-se observar resquícios desestruturados do nucléolo (Figura 2f). Porém, na metáfase propriamente dita, quando a célula já está pronta para entrar em anáfase, não é possível observar marcações, ou seja, o nucléolo foi completamente desfeito e os genes ribossomais se encontram inativos (Figura 2g). Este padrão é mantido durante toda a anáfase (Figura 2h-i). Ao final da anáfase e início da telófase, pequenos pontos e manchas ainda com certo grau de desorganização começam a ressurgir, indicando que o nucléolo está em vias de se reestruturar (Figura 2j-k). Por fim, na telófase, são observadas marcações bastante definidas dos sítios que se tornaram ativos novamente (Figura 2I), e que ainda não iniciaram o processo de fusão nucleolar. Estes dados corroboram as observações de Andrade (2011) e Mondin (2003), de que o sítio adicional presente no cromossomo 4 pode apresentar atividade.



Figura 2 – Imunolocalização da proteína fibrilarina durante o ciclo celular de células meristemáticas de Crotalaria juncea. a) Intérfase; b-d) prófases mostrando a desestruturação progressiva do nucléolo e dispersão do sinal; e) pró-metáfase evidenciando a permanência de apenas um *locus* ativo; f) metáfase inicial mostrando a retenção da fibrilarina à região da NOR; g) metáfase final sem marcação do anticorpo contra a fibrilarina; h-i) anáfases sem marcação contra a fibrilarina; j-k) telófases iniciais evidenciando o retorno da marcação na forma de pontos e aumento progressivo em quantidade; l) telófase evidenciando a reorganização do nucléolo. Barra = 5 μm

4.2 Dinâmica das constrições secundárias durante o ciclo celular

A fim de confirmar a hipótese de que as constrições secundárias ativas durante a intérfase se condensam progressivamente ao longo da mitose e se descondensam novamente ao final da telófase, e mostrar a dinâmica destas regiões ao longo do ciclo celular, foram feitos experimentos de FISH usando sondas de rDNA 45S.

Em núcleos interfásicos são observadas diversas configurações nucleolares, todas elas contendo as heterocromatinas perinucleoares mais fortemente marcadas e fibras difusas no interior do nucléolo com marcação menos intensa (Figura 3a). A imagem representativa da intérfase, provavelmente, corresponde a uma célula em G2, uma vez que as heterocromatinas se apresentam mais condensadas, indicativo de um estágio anterior à entrada na mitose. Durante a prófase, é possível observar os cromossomos em processo de condensação e os sítios de rDNA 45S ainda descondensados, tanto o par de cromossomos 1 (Figura 3a seta) quanto um dos cromossomos 4 (Figura 3b cabeça de seta). Durante a pró-metáfase inicial e final o mesmo padrão foi encontrado, sendo que, apesar dos cromossomos estarem mais condensados, as constrições ainda se apresentam distendidas (Figura 3c-d cabeças de setas), inclusive em um dos cromossomos 4. Na metáfase (Figura 3e setas) as constrições permaneceram distendidas mesmo já sem atividade transcricional dos genes ribossomais, como observado no mapeamento a partir da imunodetecção da proteína fibrilarina (Figura 2g). Do mesmo modo, e em desacordo com o que é estabelecido na literatura, durante a anáfase, inicial e final, os loci de rDNA 45S se mostraram distendidos na forma de uma constrição secundária, mesmo sem apresentarem atividade transcricional (Figura 3f-g cabeças de seta). Como esperado, durante a telófase os sítios de rDNA 45S estão distendidos e auxiliando no início da reestruturação do nucléolo (Figura 3h).



Figura 3 – Hibridação *in situ* florescente da sonda de rDNA 45S no ciclo celular de *Crotalaria juncea*. a) Intérfase; b) prófase; c) pró-metáfase; d) metáfase em vista equatorial; e) metáfase em vista polar; f) anáfase inicial; g) anáfase final; h) telófase. As setas e cabeças de seta indicam os sítios de rDNA 45S segregando com a cromatina semi-descondensada ao longo de todo o ciclo celular. Barra = 5 μm

4.3 Caracterização morfométrica dos sítios ribossomais

Objetivando a detecção de heteromorfismos entre sítios ribossomais homólogos, o tamanho em µm dos sinais obtidos pela técnica de FISH foi correlacionado ao tamanho em Mpb dos *loci* de rDNA 45, e posteriormente transformados em mega pares de base (Mpb). Dentre os parâmetros coletados, a área foi a que melhor correlacionou o tamanho do genoma aos sinais da FISH, sendo então utilizado para a transformação em Mpb. Parâmetros associados à densidade e brilho, como o valor de cinza e a densidade ótica integrada (IOD), não puderam ser usadas, uma vez que a substância utilizada na contra-coloração dos cromossomos e os fluoróforos utilizados na detecção dos sinais das sondas apresentam diferentes perfis espectrais, causando alterações destas medidas quando comparadas uma à outra. O perímetro também foi descartado devido às distorções ocasionais na morfologia cromossômica, causadas pela técnica de esmagamento durante a preparação das lâminas.

Foram analisadas 11 metáfases com o mesmo padrão de condensação e alta resolução morfológica de suas estruturas. O genoma da *Crotalaria juncea* possui um tamanho de genoma de 2396,10 Mpb (GUPTA, 1976). O *locus* de rDNA 45S mapeado no braço curto do cromossomo 1 teve, em média, 40,73 Mpb, variando de 35,63 a 45,83 Mpb. Já o sítio presente no braço longo do cromossomo 4, caracterizado como sendo um sítio adicional, apresentou em média 17,74 Mpb, oscilando de 16,40 a 19,08 Mpb.

4.4 Indexação epigenética da cromatina nucleolar

Diversos dados citológicos mostraram que a heterocromatina perinucleolar é uma região altamente metilada, enquanto a região eucromática do rDNA 45S se apresenta hipometilada. Esta seria uma explicação para as regiões intersticiais das constrições secundárias se mostrarem fracamente marcadas, quando imunodetectadas contra a 5'-metilcitosina, e suas porções terminais emitirem altos níveis de fluorescência. Porém, dados moleculares obtidos por western blot e sequenciamento por bisulfito mostram que a hipometilação do rDNA é restrita apenas a uma fração do promotor gênico dos genes transcricionalmente ativos. A fim de descrever e caracterizar o padrão de metilação e a possível presença de flutuações nestes níveis durante o ciclo celular, uma vez que os genes são desligados e reativados, foi empregada a FISH de rDNA 45S seguida de imunodetecção da 5'-metilcitosina em células meristemáticas pré-tratadas e não pré-tratadas com 8-hidroxiquinolina.

Em metáfases mitóticas submetidas à FISH foi possível confirmar o número e a posição dos sítios de rDNA 45S como descrito por Mondin (2003), mapeando um sítio maior localizado no braço curto do cromossomo 1, que forma constrição secundária em metáfases mitóticas, sendo o principal organizador nucleolar, e um sítio menor no braço curto do cromossomo 4 onde não é possível observar constrições secundárias neste tipo de tratamento (Figura 4). Quando imunodetectados contra a 5'-metilcitosina os cromossomos apresentaram forte marcação nos braços cromossômicos e apareceram negativos para as regiões centroméricas (Figura 4b, 4f). As constrições secundárias dos cromossomos 1 se apresentaram imunomarcadas, porém com coloração ligeiramente mais difusa, pelo fato da densidade da cromatina nestas regiões ser menor que no restante do cromossomo metafásico (Figura 4 seta). Do mesmo modo, os loci de rDNA 45S presentes nos cromossomos 4 também se encontraram metilados, mesmo quando, aparentemente, foram ativos na intérfase anterior (Figura 4 cabeça de seta). Foram selecionadas células apresentado níveis variados de condensação, sendo possível observar que a região da NOR, ativa ou não, se apresenta metilada (Figura 5). Estes resultados enfatizam o efeito das drogas anti-mitóticas no padrão de condensação dos cromossomos metafásicos, promovendo uma condensação forçada e artificial das contrições (Figura 4c; 4g seta vermelha; 5). Isso pode ser observado tanto no caso dos cromossomos 1 quanto nos cromossomos 4. Assim sendo, como o sítio adicional é bastante reduzido em número de cópias, ele rapidamente se condensa quando tratado com 8-hidroxiquinolina ou outras drogas, não sendo possível observar suas constrições, que permanecem sempre condensadas.



Figura 4 – Hibridação *in situ* florescente da sonda de rDNA 45S e imunodetecção da 5'-metilcitosina em metáfases mitóticas. Nota-se que as constrições secundárias apresentam sinais de marcação contra a 5'-metilcitosina e que os *loci* dos cromossomos 1 mostram contrições diferencialmente distendidas e os sítios dos cromossomos 4 compactadas, devido à ação do agente anti-mitogênico. Barra = 5 μm



Figura 5 – Compilação de cromossomos 1 e 4 com grau de condensação crescente submetidos à FISH com sondas de rDNA 45S e imunolocalização contra a 5'-metilcitosina. Cada coluna corresponde aos quatro cromossomos que carregam sítios ribossomais em uma mesma célula metafásica. Nota-se que, apesar de difuso, o sinal da 5'MC no interior das constrições secundárias pode ser observado, e que com o aumento do nível de compactação da constrição o padrão de marcação se torna cada vez mais intenso. Barra = 5 μm

O mapeamento dos níveis de metilação durante o ciclo celular mostrou que durante a prófase os sítios de rDNA 45S se encontram metilados e descondensados (Figura 6a-d cabeças de seta). Na pró-metáfase e metáfase, quando os cromossomos já estão com maior grau de condensação este padrão permanece, tornando mais evidente os níveis de metilação das regiões de constrições secundárias (Figura 6e-l setas). Como descrito acima, foi possível confirmar novamente que as constrições secundárias permanecem descondensadas durante todo o ciclo celular (Figura 3) e que, assim como no restante do ciclo, células em anáfase apresentam seus *loci* de rDNA 45S altamente metilados em toda sua extensão (Figura 6m-p cabeças de seta). Durante a telófase os sítios ribossomais apresentam marcação mais intensa e seguem metilados, quando reiniciam o processo de ativação dos genes e reestruturação do nucléolo (Figura 6q-t).



Figura 6 – Hibridação *in situ* florescente da sonda de rDNA 45S e imunodetecção da 5'-metilcitosina em células meristemáticas de *Crotalaria juncea*, evidenciando o padrão de marcação desta modificação epigenética durante as fases do ciclo celular. a-d) Prófase; e-h) pró-metáfase; i-l) metáfase; m-p) anáfase; q-t) telófase. Nota-se que as constrições secundárias permanecem distendidas e hipermetiladas durante todo o ciclo celular. Barra = 5 μm

4.5 Mapeamento das metilações em fibras estendidas de DNA

Os dados citológicos de imunodetecção da 5'-metilcitosina em metáfases e núcleos interfásicos mostram marcas tênues dentro das constrições, não permitindo descrever ou visualizar claramente qual o padrão de distribuição desta indexação ao longo do conjunto gênico. A técnica de *fiber*-FISH tem sido amplamente utilizada em uma vasta gama de experimentos relacionados ao estudo de genomas de plantas e animais, incluindo análise da estrutura e organização de sequências repetitivas, mapeamento de BACs, análises de DNA transgênico e mensuração de *gaps* em mapas físicos (JIANG; GILL, 2006). Além disso, associada à técnica de imunolocalização, a *fiber*-FISH pode ser utilizada para mapear modificações epigenéticas como a metilação de citosinas de DNA (KOO et al., 2011). Por isso, foram feitas preparações contendo fibras distendidas de DNA a partir de núcleos interfásicos intactos seguida de FISH das sondas de rDNA 18S e 26S e imunodetecção contra a 5'-metilcitosina.

Os genes foram utilizados separadamente a fim de verificar se há diferenças no padrão de metilação dentro do *repeat* ribossomal. O gene de rRNA 18S possui um trecho do espaçador intergênico (IGS) que carrega a região promotora.

Independente da sequência gênica utilizada como sonda, não foi possível observar grandes extensões de cromatina hipometilada ou desmetilada (Figura 7, 8), ou seja, tal como proposto por dados moleculares descritos na literatura, os genes de rDNA transcricionalmente ativos, assim como os silenciados, apresentam altos níveis de metilação de citosinas de DNA. Alguns fragmentos apresentaram marcas menos intensas depois de capturadas, porém devido a um artefato relacionado ao plano focal das fibras, e não propriamente à ausência de metilação. O padrão de marcação em *dots* observado como resultado da imunodetecção é comumente observado em experimentos de fibras estendidas, sendo considerado normal.

Nas imagens submetidas à hibridação com o gene de 18S, podem ser observados alguns poucos *dots* que não se sobrepõem exatamente ao *dot* da metilcitosina. Porém, imediatamente ao lado, um sinal de metilação volta a aparecer (Figura 7 cabeças de seta). Provavelmente, estas pequenas regiões correspondem à sequência promotora presente na sonda e estão relacionadas ao estado altamente hipometilado do promotor observado a partir dos testes com bissulfito em *Arabidopsis thaliana* (LAWRENCE et al., 2004; PONTVIANNE et al., 2013). Devido

ao fato deste padrão ter sido observado em baixa frequência, pode ser que seja um artefato no momento da captura das imagens, uma vez que não foram utilizadas ferramentas de confocalização ou de microscopia de alta resolução.

A FISH com a sonda de 26S mostrou que raramente aparecem genes desmetilados, com frequência ainda mais baixa que nas marcações feitas com o gene *upstream* (Figura 8 cabeças de seta).



Figura 7 – Hibridação *in situ* florescente da sonda de rDNA 18S e imunodetecção da 5'-metilcitosina em fibras distendidas de DNA. Podem ser observados, embora com pouca frequência, genes aparentemente não metilado (cabeças de seta). Barra = 5 μm

Merae	Second Association						¥
E' MC			a construction of the second second	A second or more			
5 100	dett-ber ofgen i						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
26S rDNA							
	\checkmark						
Bertagtan Bertan		ayera 20 ar a th' espera to a total again	territor and a start for a specific	an all satisfies a	an adar B ^{an} ay ^a mina mana ana am	nana ni sa ayaan	
per regionistation	aligner our sesser of		titlite one server to a construction				
		ann an sin star an s		and a set of the first store		g the set of the base	(
	فر اوده دونه ورافاه سارسد.	gananaga ayo nasalandar ya				a gran and a strain	······································
				and the Same	يوموني وروبي	Y	
- and the first of the second second	an a gitte one angewegen gette	و عامید و الشمندونین والد				an and a second s	And I and And
- and a second s	, en algege entre geografie	aliticae a sub-				to the set of a	
And states of the states	an cara como a pop	Name and the Destination				e in the set the gave of the	
procession of the second							
Sugar Sec.				and the transformer		anda majarat dagi dara da m	
		and the second second			an the property of the	and and an and a second se	
shat description of	و و د د د د د د و سالیم		with any second states				- 40 D
Stationary in the			were with the soul's the				

Figura 8 – Hibridação *in situ* florescente da sonda de rDNA 26S e imunodetecção da 5'-metilcitosina em fibras distendidas de DNA. Podem ser observados, embora com pouca frequência, genes aparentemente não metilado (cabeças de seta). Barra = 5 μm

4.6 Organização dos genes ribossomais de 18S e 26S em fibras estendidas

Para verificar a eficiência da marcação e caracterizar a organização do arranjo repetitivo do rDNA 45S no genoma de *Crotalaria juncea* L. foi feita FISH com sondas de 18S e 26S.

Foi observado um arranjo *in tandem* com alternância das sequências no decorrer de quase toda extensão das fibras analisadas. O padrão de marcação se mostrou homogêneo ao longo da fibra com relação à ordem dos genes, de modo que, em fibras onde o primeiro gene é o 18S (verde) este sempre aparecerá primeiro, formando um padrão de marcas verde-vermelho. Quando o padrão se inicia com o gene 26S (vermelho), o padrão será sempre vermelho-verde.

Nas fibras analisadas não foi possível detectar inversões de grandes extensões, ou seja, em fibras onde há uma ordem 18S-26S, este padrão não se altera repentinamente para 26S-18S. Estas observações são um indicativo de que há uma alta estabilidade na organização destes arranjos para a espécie em estudo.

Gaps correspondentes ao espaçador intergênico (IGS) aparecem como regiões negativas nas imagens, por não conterem qualquer tipo de sinal fluorescente, como esperado (Figura 9 cabeça de seta vermelha). A presença de sequências não-canônicas foi detectada (Figura 9 cabeça de seta branca), sendo que nestes casos o padrão em *dots* de cores alternadas muda de direção em um pequeno trecho, porém, a frequência desta reorganização foi extremamente baixa.



Figura 9 – Hibridação *in situ* florescente das sondas de rDNA 18S e 26S em fibras distendidas de DNA. O espaçador intergênico (IGS) se apresenta negativo por não conter fragmentos das sondas utilizadas (cabeça de seta vermelha). Nota-se a existência de sequências não canônicas, embora com frequência extremamente baixa (cabeça de seta branca). Barra = 5 μm

5 DISCUSSÃO

5.1 Comportamento do nucléolo durante o ciclo celular

Ao final da intérfase e início da prófase foi visto que o nucléolo, detectado a partir da imunolocalização da fibrilarina, começa a se individualizar à medida que os cromossomos se condensam para entrada na mitose. A individualização do nucléolo marca o possível início da parada da maquinaria de processamento e transcrição (HERNANDEZ-VERDUN, 2011). À medida que a mitose avança o padrão de marcação do anticorpo passa a ser progressivamente mais difuso e conspícuo à região da NOR, indicando a existência de um compartimento pericromossômico como descrito por Gautier et al. (1992). No entanto, não foram observadas marcações durante a metáfase final e anáfase inicial, apesar de ter sido demonstrado que a fibrilarina migra através da mitose. Aparentemente, esta proteína não se mantém diretamente associada aos cromossomos durante todo o ciclo celular. Marcas na forma de pequenos pontos brilhantes começam a reaparecer no final da anáfase. Estes pequenos grânulos aumentam progressivamente, em número e tamanho, com a entrada na telófase e podem corresponder aos corpúsculos prénucleolares (PNBs), responsáveis pela reorganização do novo nucléolo (HERNANDEZ-VERDUN, 2011). Marcações citoplasmáticas para a fibrilarina, durante a metáfase final e anáfase inicial, foram reportadas por Makimoto et al. (2006), porém este padrão não foi observado no presente trabalho. Aparentemente, o que os autores caracterizaram como sendo marcas, são simplesmente backgrounds decorrentes da utilização do anticorpo. No entanto, os autores mostraram que na anáfase final pequenos pontos brilhantes de fibrilarina reaparecem, tal como foi aqui observado.

A questão que permanece em aberto é o motivo pela qual a marcação contra a fibrilarina desaparece ao final da metáfase e início da anáfase, uma vez que também não pôde ser vista dispersa no citoplasma ou compondo o compartimento pericromossômico. Não há relatos na literatura de possíveis modificações ou processos de desestruturação desta proteína que pudessem causar inespecificidades no anticorpo. Do mesmo modo, não foram reportados eventos de dispersão citoplasmática da fibrilarina não detectáveis em nível microscópico.

5.2 A cromatina ribossomal segrega em um estado semi-condensado

O mapeamento do rDNA 45S ao longo do ciclo celular permitiu descrever o comportamento das constrições secundárias durante a divisão mitótica. Apesar dos autores não deixarem claro, é aceito que até a metáfase as constrições secundárias se condensam totalmente e apenas voltam a se distender ao final da telófase, com o início da reorganização nucleolar. As observações aqui apresentadas mostraram que a constrição secundária permanece distendida por toda a mitose, ao contrário é proposto até o momento. A existência do compartimento do que pericromossômico, bem como a presença de alguns fatores de transcrição, como o UBF, que permanecem ligados ao promotor gênico durante a mitose, impedem que a constrição secundária se condense do mesmo modo que o restante do cromossomo (revisão em SANIJ; HANNAN, 2009). Para que tais regiões realmente se compactem, como o restante da cromatina do cromossomo metafásico, tais estruturas não poderiam estar associadas a esta região, por uma questão de espaço físico. Embora estas suposições sejam coerentes, nenhum trabalho científico havia demonstrado a existência e a manutenção das constrições secundárias durante a metáfase e anáfase.

Além disso, foi proposto por Huang et al. (2012) que constrições secundárias são sítios frágeis e, portanto, propensos a quebras e rearranjos genômicos. Uma vez que instabilidades nestas regiões não são encontradas com frequência no genoma dos eucariotos, a eucromatina da NOR deveria se condensar durante a mitose, evitando o risco de quebras. Quebras desta natureza somente foram reportadas em um caso de aparecimento de constrições terciárias não relacionadas ao rDNA 45S (KOO; JIANG, 2008). Deste modo, constrições secundárias não são sítios frágeis e segregam naturalmente em um estado menos compactado da cromatina.

5.3 Atividade dos sítios adicionais de rDNA 45S

A atividade dos sítios ribossomais de *Crotalaria juncea* foi anteriormente analisada, sendo estabelecido que, o sítio ribossomal do cromossomo 1 é o principal organizador nucleolar, enquanto o sítio adicional do cromossomo 4 tem atividade facultativa (MONDIN, 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007; ANDRADE, 2011). Entretanto, estes estudos utilizaram como marcador da atividade nucleolar a precipitação por nitrato de prata (bandamento Ag-NOR), que nem sempre permite uma clara visualização dos nucléolos, pela quantidade de *background* produzido pela técnica e por ser de baixa resolução nas fases finais da mitose.

A fim de estabelecer com maior precisão a atividade dos sítios ribossomais de *C. juncea*, principalmente do sítio adicional, o comportamento dos nucléolos durante o ciclo celular foi monitorado utilizando-se um anticorpo contra a fibrilarina como marcador de atividade. Durante a interfase a cromatina nucleolar ativa tem como característica a formação de um ou dois *knobs* heterocromáticos adjacentes a uma região DAPI negativa que indica a presença de um nucléolo. A imunodetecção da fibrilaria e contracoloração com DAPI comprova que estas regiões negativas são de fato nucléolos, mesmo aquelas muito pequenas, sugerindo serem resultantes da atividade do sítio adicional do cromossomo 4.

O experimento de FISH com sondas do rDNA 45S e o de imunodetecção da fibrilarina reforçam a observação anterior de que o sítio principal presente no cromossomo 1 está sempre ativo na intérfase. No entanto, nestes estudos SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, (MONDIN. 2003: MONDIN: 2007: ANDRADE, 2011), foi proposto que o sítio adicional presente no cromossomo 4 teria expressão em um momento específico, entre o final da anáfase e o final da fase G1, silenciando seu funcionamento a seguir. Estes mesmos autores chegaram à conclusão de que, mesmo quando o sítio menor tem uma atividade transcricional mais longa no ciclo celular, em nenhum momento é possível observar contrições secundárias em metáfases mitóticas. Entretanto, nestes estudos as análises das metáfases mitóticas utilizaram agentes anti-mitóticos que alteram a morfologia natural dos cromossomos, conforme será discutido mais a frente.

Os experimentos com fibrilarina comprovam a atividade dos sítios menores, uma vez que foram visualizados núcleos interfásicos, profásicos e células em telófase contendo três e quatro nucléolos. A observação de nucléolos adicionais em fases adiantadas do ciclo celular, principalmente na prófase e prometáfase, indicam que estes sítios permanecem ativos durante toda a interfase e que não ocorre um silenciamento nos estágios iniciais como proposto anteriormente.

Outros resultados que corroboram esta hipótese são os experimentos de FISH com sondas de rDNA 45S em células mitóticas. O mapeamento desta sonda confirma os dados anteriores com relação à intérfase, porém, durante a mitose foi

observado a presença de constrições secundárias nos sítios adicionais do cromossomo 4. Mesmo que apresentem baixo número de cópias e possivelmente uma baixa atividade, tais *loci* apresentam constrições que permanecem distendidas, quando ativas, durante todo o ciclo celular. O fato do processo de fusão nucleolar ocorrer em um curto espaço de tempo, no início do ciclo (SAVINO et al., 2001), poderia explicar a baixa frequência de três e quatro nucléolos observados durante a interfase.

Aparentemente, o que impede a visualização de contrições secundárias em cromossomos metafásicos, principalmente naqueles com loci pequenos, é a ação forçada da contração da cromatina quando tratados com agentes inibidores do fuso mitótico, como a 8-hidroxiquinolina, a colchicina, o α-bromonaftaleno, entre outros, comumente utilizados em estudos citogenéticos. Este efeito se mostrou ainda mais drástico em sítios ribossomais pequenos. Em muitos casos, para analisar a atividade dos sítios ribossomais, são utilizados os dados morfológicos em conjunto com a precipitação por nitrato de prata, que se liga a proteínas específicas, indicando a atividade destes sítios. Normalmente, nestes estudos, as constrições secundárias estão ausentes devido a contração artificial dos cromossomos e, ainda assim, existe precipitação por prata nos sítios que foram ativos, levando a conclusão errônea de que constrições secundárias são dispensáveis para determinação da atividade dos genes ribossomais. A partir de tais observações pode-se concluir que a ausência de constrições secundárias em preparações submetidas à ação destas drogas não remetem à ausência de atividade destes loci. Portanto, cuidados devem ser tomados na interpretação da atividade das NORs com base na caracterização morfológica dos cromossomos, uma vez que podem causar interpretações erradas sobre a atividade destes sítios. Neste sentido, os grupos de pesquisa em citogenética devem considerar a não utilização de agentes mitogênicos na inferência de atividade dos genes ribossomais.

5.4 Caracterização morfométrica dos sítios ribossomais

A técnica de FISH é capaz de mostrar a grande diversidade de tamanhos de sítios ribossomais entre e dentro de uma espécie (revisão em MONDIN; AGUIAR-PERECIN, 2011), não sendo incomum a presença de heteromorfismos entre cromossomos homólogos. No presente trabalho, a técnica apresentada se mostrou altamente sensível na detecção de heteromorfismos. Os resultados demonstram que há uma clara diferença de tamanho nos sítios ribossomais entre o par de homólogos do cromossomo 1 e do cromossomo 4. A imunodetecção da fibrilarina corrobora esta observação, mostrando que também existem variações no tamanho dos nucléolos. Estes heteromorfismos haviam sido detectados anteriormente a partir da impregnação por nitrato de prata (ANDRADE, 2011). Deste modo, pode-se dizer que o polimorfismo no tamanho dos nucléolos segue exatamente o mesmo padrão heteromórfico dos sítios ribossomais. Embora não tenham sido conduzidos experimentos conjuntos de FISH com sondas de rDNA 45S e imunodetecção da fibrilarina, tudo leva a crer que os sítios maiores são responsáveis pela formação dos nucléolos grandes, enquanto os sítios menores estariam associados aos nucléolos pequenos.

O tamanho do sítio ribossomal tem papel central na forma de expressão dos genes que o compõe, sendo diretamente associado ao número e estrutura dos motivos, já que o número de cópias gênicas exerce influência efetiva no recrutamento de fatores de transcrição, onde regiões com menor número de cópias tem capacidade de recrutamento reduzida (PIKAARD, 2000).

A variação encontrada no tamanho dos *loci* de rDNA 45S de *C. juncea*, mensurada a partir da sua caracterização morfométrica, é causada pela ocorrência de rearranjos entre regiões homólogas do rDNA. Aparentemente, o principal rearranjo é a recombinação desigual, responsável por produzir configurações homozigóticas e heterozigóticas entre pares cromossômicos. Os mecanismos de origem de tais variações podem ser revisados em Schubert (2007). A manutenção de homozigotos e heterozigotos para o tamanho do sítio ribossomal, tem sido por nós interpretada como resultado de uma possível segregação ao acaso dos cromossomos.

A caracterização da variabilidade no tamanho dos sítios ribossomais é importante para se estabelecer a ordem hierárquica de expressão destes sítios (PIKAARD, 2000). Em híbridos interespecíficos, este fenômeno é conhecido como dominância nucleolar (NAVASHIN, 1927), porém como se trata de uma espécie diplóide, talvez o melhor termo seria hierarquia de expressão. Assim sendo, pode-se chegar à conclusão de que existe uma hierarquia de expressão dos *loci* ribossomais em *C. juncea*, onde o sítio maior presente no cromossomo 1 é preferencialmente ativo sobre o sítio menor presente no cromossomo 4. Igualmente, entre homólogos,

também existe esta competição por atividade, de modo que o sítio menor sempre se expressa menos em detrimento ao sítio maior.

5.5 Padrão de metilação do rDNA 45S

Grummt (2003); Flavell et al. (1986b) mostraram que apenas uma fração muito pequena do total de genes ribossomais é realmente expressa, correspondendo a cerca de 5%. Apesar de ser bem estabelecido na literatura que, de maneira geral, a metilação de citosinas do DNA em longas regiões esteja relacionada ao silenciamento gênico (PIKAARD, 2000b), com o aumento da resolução das técnicas moleculares, Flavell et al. (1988), Lawrence et al. (2004) e Pontvianne et al. (2013) demonstraram que em genes ribossomais ativos, o promotor gênico, uma porção bastante restrita do IGS, apresenta desmetilações pontuais. Isto significa que, em nível microscópico, seria impossível observar longas regiões cromossômicas, como a constrição secundária, como sítios inteiramente hipometilados. A metilação do DNA, observado em nível citológico nas fribras distendidas, indicam um padrão contínuo desta modificação epigenética, onde longos gaps hipometilados não foram observados, tal como esperado. Nossos dados indicam que as técnicas de imunodetecção em núcleos interfásicos e cromossomos metafásicos, não são capazes de diferenciar sítios específicos hipometilados em regiões densamente metiladas como o rDNA. Por outro lado, nas fibras estendidas não foi possível distinguir regiões ribossomais do restante da cromatina nuclear, uma vez que ambas se apresentaram igualmente metiladas. Portanto, toda constrição secundária é um sítio hipermetilado em nível microscópico, mesmo no caso do núcleo interfásico, quando a cromatina dentro do nucléolo está muito distendida e produz uma marcação pouco brilhante em relação à heterocromatina perinucleolar e o restante da cromatina.

Em fibras estendidas, regiões hipometiladas são raríssimas de serem observadas. Nas figuras apresentadas neste trabalho são indicadas com setas apenas sete regiões, para o gene de 18S, e quatro para o gene de 26S, que aparentam ser hipometiladas. Porém, ainda não é possível concluir se estes genes são, de fato, hipometilados. Devido ao padrão de marcação em *dots* observado na técnica de *fiber*-FISH, artefatos técnicos podem ser gerados, como *gaps* sem marcação, e por isso uma maior extensão de fibras deve ser analisada para que

sejam tiradas conclusões definitivas. Apesar de existirem relatos da existência de longas regiões cromossômicas não metiladas próximas aos centrômeros dos cromossomos de milho (KOO et al., 2011), reforçamos que não existem evidências de que estes casos ocorram no caso da cromatina nucleolar.

No caso de plantas, nota-se que grande parte dos artigos que tentaram correlacionar as contrições secundárias à regiões hipometiladas, não consideraram os dados moleculares que indicam que isto não é possível, como por exemplo nos trabalhos de Marques et al. (2011) e Gong et al. (2013). Estes autores claramente não perceberam que o que estavam interpretando como hipometilação, na verdade, se trata de um artefato citológico devido a baixa densidade da cromatina dentro do nucléolo e da constrição secundária. É sabido que o rDNA presente em NORs ativas se encontra em um estado de cromatina aproximadamente 10 vezes menos condensado que a região de DNA satélite adjacente, no caso de células humanas (HELIOT et al., 1997). Este é um dos motivos pela qual as constrições não são vistas como regiões com fluorescência intensa quando a citosina metilada é imunolocalizada, e, portanto, são erroneamente interpretadas como hipometiladas. Assim sendo, a técnica de FISH associada à imunodetecção da 5'-metilcitosina, seja em metáfases mitóticas, núcleos interfásicos ou mesmo durante a mitose, não possui resolução para discriminar nem genes nem NORs como sendo ativas ou inativas.

Se a metilação estivesse diretamente relacionada ao controle da condensação da cromatina ribossomal, esta marca teria que apresentar flutuações durante o ciclo celular, porém, este comportamento não foi observado. Em células em mitose, na fase de metáfase e anáfase, quando a atividade transcricional está silenciada, não é possível observar um aumento na intensidade do sinal da 5'-metilcitosina. Como discutido no tópico anterior, as constrições secundárias não se condensam e, consequentemente, não ocorrem flutuações no nível de fluorescência e no padrão de marcação para este anticorpo. Este é mais um indício de que a metilação de citosinas do rDNA 45S está mais envolvida no controle da expressão gênica em nível do promotor do que diretamente ao empacotamento da cromatina.

5.6 Organização dos genes ribossomais em Crotalaria juncea L.

O arranjo dos genes ribossomais apresenta uma ordem bastante definida e muito bem aceita. O motivo do rDNA normalmente se inicia com um espaçador intergênico (IGS), seguido do gene de rRNA 18S, um espaçador transcrito (ITS-1), o gene de rRNA 5.8S, um novo espaçador transcrito (ITS-2) e termina com o gene de rRNA 26S. Este motivo é repetido de dezenas a milhares de vezes in tandem, dependendo da espécie e do tamanho do locus. No caso de Crotalaria juncea este padrão de repetição é bastante típico e conservado, com raríssimos rearranjos, uma vez que não foi evidenciada alta frequência de repetições não-canônicas. Não há na literatura trabalhos detalhados sobre a organização dos motivos do rDNA 45S em plantas. Porém, no caso de humanos, os sítios ribossomais são extremamente rearranjandos, com uma frequência de até 1/3 de sequências não-canônicas (CABURET et al., 2005). Os mesmos autores demonstraram que estas sequências não canônicas geralmente carregam palíndromes. Deste modo, de acordo com McStay e Grummt (2008), tais sequências não são funcionais, e a célula tende a silenciar estes repeats para evitar a possibilidade de pareamento anti-senso, que pode comprometer drasticamente a biogênese ribossomal. Certamente, estas observações não podem ser extrapoladas para o caso das plantas, e um grande conjunto de arranjos ribossomais deveriam ser estudados para que qualquer conclusão de maior proporção pudesse ser tomada.

5.7 Uma proposta de modelo de herança dos genes ribossomais ativos

Como foi extensivamente descrito e discutido anteriormente, a cromatina ribossomal segrega em um estado aberto durante toda a mitose. Deste modo, neste tópico será proposto um modelo de segregação para os genes ativos, uma vez que, como estes genes são mantidos descondensados, certamente existe um mecanismo de herança envolvido neste processo.

O UBF (fator de ligação *upstream*) é uma subunidade do complexo da DNA polimerase I, responsável pelo recrutamento do PIC (complexo de pré-iniciação) e, portanto, peça fundamental na regulação da transcrição dos genes ribossomais (SANIJ; HANNAN, 2009). Além de sua alta afinidade por diversos sítios da região promotora dos DNAs ribossomais ativos, também se apresenta ao longo de toda a

extensão da região codante do gene. Nos motivos silenciados esta frequência é bastante baixa, apesar de existir (O'SULLIVAN; SULLIVAN; McSTAY, 2002). Este fator possui afinidade por regiões adjacentes ao octâmero de histonas, e tem a propriedade de deslocar a histona H1, impedindo sua associação a vários segmentos da cromatina (KERMEKCHIEV; WORKMAN; PIKAARD, 1997; revisão em SANIJ; HANNAN, 2009). Foi mostrado que genes ativos possuem menos histonas H1, do mesmo modo com que genes silenciados possuem níveis mais baixos de UBF (SANIJ et al., 2008). Além disso, quando na forma de dímero, o fator upstream tem a propriedade de girar a fita de DNA formando um loop de 360°, de igual diâmetro e volume ao octâmero de histonas. A esta estrutura se dá o nome de enhancessomo (STEFANOVSKY et al., 2001). A partir de testes usando crosslinking com psoralen, foram observados ambos estados da cromatina, uma fração contendo nucleossomos periodicamente espaçados e uma fração livre de nucleossomos. Estas frações não se alteram da intérfase para a metáfase, indicando que durante a segregação cromossômica a cromatina tem comportamento estável (revisão em SANIJ; HANNAN, 2009)I.

A partir destas constatações e dos resultados aqui observado é possível concluir que a cromatina da NOR de fato segrega em estado descompactado, sem a necessidade de apresentar atividade transcricional. Isto se deve ao fato dos genes ativos, presentes no interior da constrição, se apresentarem livres de nucleossomos e usarem da estabilidade proveniente da ligação do UBF para se manterem descondensados. Foi reportado que a presença do UBF causa descompactação cromatínica, tal como sua remoção causa condensação e inativação dos genes ribossomais (SANIJ et al., 2008). Por este motivo, os genes ativos e inativos de um mesmo *locus* são sempre os mesmos nas gerações de células filhas produzidas por mitose.

6 CONCLUSÃO

A partir das observações aqui expostas e discutidas, é possível concluir que sítios ribossomais são altamente metilados, independente de sua atividade, e que a metilação do DNA não contribui diretamente para a condensação desta região durante a mitose. Sítios de rDNA 45S ativos sempre formam constrições secundárias e segregam na mitose sem que ocorra total condensação da cromatina. No caso de sítios adicionais ativos este mesmo padrão é mantido ao longo de todo o ciclo celular. Tanto sítios principais quanto sítios adicionais, apresentam padrão de indexação da cromatina idêntico.

REFERÊNCIAS

ANASTASSOVA-KRISTEVA, M. The nucleolar cycle in man. **Journal of cell science**, London, v. 25, p. 103–110, Oct. 1977.

ANDERSEN, J.S.; LAM, Y.W.; LEUNG, A.K.L.; ONG, S.-E.; LYON, C.E.; LAMOND, A. I.; MANN, M. Nucleolar proteome dynamics. **Nature**, London, v. 433, p. 77–83, Jan. 2005.

ANDRADE, L.M. Arquitetura da cromatina da região organizadora do nucléolo e o seu papel no controle da expressão dos genes ribossomais. 2011. 80 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BIANCHI, M.W.; VIOTTI, A. DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage protein genes of maize. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, n. 2, p. 203–214, Apr. 1988.

BOISVERT, F.-M.; KONINGSBRUGGEN, S. VAN; NAVASCUÉS, J.; LAMOND, A.I. The multifunctional nucleolus. **Nature reviews**, London, v. 8, n. 7, p. 574–585, July 2007.

BUSCH, H.; SMETANA, K. The nucleolus. New York: Academic Press, 1970. 626 p.

CABURET, S.; CONTI, C.; SCHURRA, C.; LEBOFSKY, R.; EDELSTEIN, S. J.; BENSIMON, A. Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. **Genome research**, New York, v. 15, n. 8, p. 1079–85, July 2005.

CAJAL, S.R. Un sencillo método de coloración del reticulo protoplasmico y sus efectos en los diversos centros nerviosos de vertebrados é invertebrados. **Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biologicas de la Universidad de Madrid**, Madrid, v. 2, p. 129-221, 1903.

CAPOA, A. de; FERRARO, M.; MENENDEZ, F.; MOSTACCI, C.; PELLICCIA, F.; ROCCHI, A. Ag staining of the nucleolus organizer (NO) and its relationship to satellite association. **Human genetics**, New York, v. 44, n. 1, p. 71–77, Feb. 1978.

CEDAR, H. DNA methylation and gene activity. **Cell**, Cambridge, v. 53, p. 3–4, Apr. 1988.

CERDIDO, A.; MEDINA, F.J. Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. **Chromosoma**, Berlin, v. 103, n. 9, p. 625–634, Jan. 1995.

CMARKO, D.; VERSCHURE, P.J.; ROTHBLUM, L.I.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; AMALRIC, F.; Van DRIEL, R.; FAKAN, S. Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 113, n. 3, p. 181–187, Dec. 2000. COEN, E.S.; DOVER, G.A. Multiple Pol I nitiation sequences in rDNA spacers of *Drosophila melanogaster*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 10, n. 21, p. 7017–7026, Sept. 1982.

COLD SPRING HARBOR PROTOCOLS. **Nuclear isolation buffer (NIB 2X).** 2008. Disponível em: http://cshprotocols.cshlp.org/content/2008/12/pdb.rec11574.short. Acesso em: 02 abr. 2014.

CUCO, S.M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 17, n. 3, p. 363–370, dez. 2003.

DELTOUR, R.; BARSY, T. de. Nucleolar activation and vacuolation in embryo radicle cells during early germination. **Journal of Cell Science**, London, v. 76, p. 67–83, Jan. 1985.

DÍEZ, J.L.; VILARIÑO, V.R.; MEDINA, F.J.; MORCILLO, G. Nucleolar localization of a reverse transcriptase related to telomere maintenance in *Chironomus* (Diptera). **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 126, n. 4, p. 445–452, Apr. 2006.

DIMARIO, P.J. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. **International Review of Cytology**, New York, v. 239, p. 99–178, Oct. 2004.

DOUSSET, T.; WANG, C.; VERHEGGEN, C.; CHEN, D.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; HUANG, S. Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 11, n. 8, p. 2705–2717, Aug. 2000.

EDEN, S.; HASHIMSHONY, T.; KESHET, I.; CEDAR, H.; THORNE, A.W. DNA methylation models histone acetylation. **Nature**, London, v. 394, n. 6696, p. 842, Aug. 1998.

FLAVELL, R.B.; O'DELL, M.; THOMPSON, W.F. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 204, n. 3, p. 523–534, June 1988.

FLAVELL, R.; O'DELL, M.; SHARP, P.; NEVO, E.; BEILES, A. Variation in the intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 3, n. 6, p. 547–558, June 1986a.

FLAVELL, R.; O'DELL, M.; THOMPSON, W.F.; VINCENTZ, M.; SARDANA, R.; BARKER, R.F. The differential expression of ribosomal RNA genes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 314, n. 1166, p. 385–397, Nov. 1986b.

FONTANA, F. Traité sur le vénin de la vipere, avec des observations sur la structure primitive du corps animale. [s.l.: s.n.], 1781. 363 p.

GAUTIER, T.; ROBERT-NICOUD, M.; GUILLY, M.N.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis: a study by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Cell Science**, London, v. 102, pt. 4, p. 729–737, Apr. 1992.

GÉBRANE-YOUNÈS, J.; FOMPROIX, N.; HERNANDEZ-VERDUN, D. When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. **Journal of Cell Science**, London, v. 110, pt. 1, p. 2429–2440, July 1997.

GILBERT, N.; LUCAS, L.; KLEIN, C.; MENAGER, M.; BONNET, N.; PLOTON, D. Three-dimensional co-location of RNA polymerase I and DNA during interphase and mitosis by confocal microscopy. **Journal of Cell Science**, London, v. 108, pt. 1, p. 115–125, Sept. 1995.

GONG, Z.; XUE, C.; ZHANG, M.; GUO, R.; ZHOU, Y.; SHI, G. Physical localization and DNA methylation of 45S rRNA gene loci in *Jatropha curcas* L. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e84284, Dec. 2013.

GRUMMT, I. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. **Genes & Development**, New York, v. 17, n. 14, p. 1691–1702, 2003.

GUPTA, P.K. Nuclear DNA, nuclear area and nuclear dry mass in thirteen species of *Crotalaria* (Angiospermae, Leguminosae). **Chromosoma**, Berlin, v. 54, n. 2, p. 155–164, Nov. 1976.

HELIOT, L.; KAPLAN, H.; LUCAS, L.; KLEIN, C.; BEORCHIA, A.; DOCO-FENZY, M.; MENAGER, M.; THIRY, M.; O'DONOHUE, M.-F.; PLOTON, D. Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 8, n. 11, p. 2199–2216, Nov. 1997.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. **Nucleus,** Austin, v. 2, n. 3, p. 189–194, June 2011.

HESLOP-HARRISON, J.S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 5, p. 617–636, May 2000.

HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 62, n. 4, p. 361–367, Mar. 1977.

HUANG, M.; LI, H.; ZHANG, L.; GAO, F.; WANG, P.; HU, Y.; YAN, S.; ZHAO, L.; ZHANG, Q.; TAN, J.; LIU, X.; HE, S.; LI, L. Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e35139, Apr. 2012.

JIANG, J.; GILL, B.S. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome**, Ottawa, v. 1068, p. 1057–1068, Sept. 2006.

KERMEKCHIEV, M.; WORKMAN, J.L.; PIKAARD, C.S. Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. **Molecular and Cellular Biology**, London, v. 17, n. 10, p. 5833–5842, Oct. 1997.

KLOSE, R.J.; BIRD, A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdan, v. 31, n. 2, p. 89–97, Feb. 2006.

KOO, D.-H.; JIANG, J. Extraordinary tertiary constrictions of *Tripsacum dactyloides* chromosomes: implications for karyotype evolution of polyploids driven by segmental chromosome losses. **Genetics**, Austin, v. 179, n. 2, p. 1119–1123, Apr. 2008.

KOO, D.-H.; HAN, F.; BIRCHLER, J.; JIANG, J. Distinct DNA methylation patterns associated with active and inactive centromeres of the maize B chromosome. **Genome Research**, New York, v. 21, p. 908–914, Feb. 2011.

LAWRENCE, R.J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z.J.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C.S. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 599–609, Feb. 2004.

LEYDIG, F. Anatomische Notizen über *Synapta digitata*. Archiv für Anatomie und **Physiologie**, Leipzig, p. 507-519, 1852.

LIU, H.; PAN, G.; LUO, B.; LI, T.; YANG, Q.; VOSSBRINCK, C. R.; DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B. A.; ZHOU, Z. Intraspecific polymorphism of rDNA among five *Nosema bombycis* isolates from different geographic regions in China. **Journal of invertebrate pathology**, San Diego, v. 113, n. 1, p. 63–69, Feb. 2013.

MARQUES, A.; FUCHS, J.; MA, L.; HECKMANN, S.; GUERRA, M.; HOUBEN, A. Characterization of Eu- and Heterochromatin of citrus with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 134, p. 72–82, Feb. 2011.

MATHIEU, O.; JASENCAKOVA, Z.; VAILLANT, I.; GENDREL, A.-V.; COLOT, V.; SCHUBERT, I.; TOURMENTE, S. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 12, p. 2929–2939, Nov. 2003.

McCLINTOCK, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of nucleolo in *Zea mays*. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, Berlin, v. 21, p. 294–328, Mar. 1934.

McSTAY, B.; GRUMMT, I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 24, p. 131–157, July 2008.

MONDIN, M. Estudo da evolução cariotípica do gênero Crotalaria L. (Leguminosae-Papilionoideae) com o emprego de técnicas de bandamento cromossômico e hibridação *in situ* gluorescente (FISH). 2003. 115 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Heterochromatin patterns and ribosomal DNA loci distribution in diploid and polyploid *Crotalaria* species (Leguminosae, Papilionoideae), and inferences on karyotype evolution. **Genome**, Ottawa, v. 726, p. 718–726, May 2011.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. **Genetics and Moleculae Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 1, p. 65–72, June 2007.

MONTGOMERY, T.H. Comparative cytological studies with especial regard to the morphology of the nucleolus. **Journal of Morphology**, New York, v. 15, p. 265–583, 1899.

MORALES, A.G.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MONDIN, M. Karyotype characterization reveals an up and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae) species of the section Hedriocarpae subsection Macrostachyae. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Secaucus, v. 59, n. 2, p. 277–288, Mar. 2011.

MURO, E.; GÉBRANE-YOUNÍS, J.; JOBART-MALFAIT, A.; LOUVET, E.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The traffic of proteins between nucleolar organizer regions and prenucleolar bodies governs the assembly of the nucleolus at exit of mitosis. **Nucleus**, Austin, v. 1, n. 2, p. 202–211, Apr. 2010.

NAVASHIN, M. Changes in number and form of chromosomes as a result of hybridization. **Zeitschrift für Zellforschung and mikroskopische Anatomie**, Viena, v. 6, p. 195-223, 1927.

NICOL, S.M.; CAUSEVIC, M.; PRESCOTT, A.R.; FULLER-PACE, F.V. The nuclear DEAD box RNA helicase p68 interacts with the nucleolar protein fibrillarin and colocalizes specifically in nascent nucleoli during telophase. **Experimental Cell Research**, New York, v. 257, n. 2, p. 272–280, Mar. 2000.

OLSON, M.O.J.; DUNDR, M. The moving parts of the nucleolus. **Histochemistry** and **Cell Biology**, Berlin, v. 123, n. 3, p. 203–216, Mar. 2005.

OLSON, M.O.J.; HINGORANI, K.; SZEBENI, A. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. **International Review of Cytology**, New York, v. 219, p. 199–266, Mar. 2002.

O'SULLIVAN, A.C.; SULLIVAN, G.J.; MCSTAY, B. UBF binding *in vivo* is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. **Molecular and Cellular Biology**, London, v. 22, n. 2, p. 657–668, Jan. 2002.

PAPAIOANNOU, I.A.; DIMOPOULOU, C.D.; TYPAS, M.A. Structural and phylogenetic analysis of the rDNA intergenic spacer region of *Verticillium dahliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 347, n. 1, p. 23–32, July 2013.

PEDERSON, T. The plurifunctional nucleolus. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 26, n. 17, p. 3871–3876, June 1998.

PIKAARD, C.S. Nucleolar dominance and silencing of transcription. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 4, n. 12, p. 478–483, Dec. 1999.

_____. Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, n. 2/3, p. 163–177, Mar. 2000a.

_____. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 16, n. 11, p. 495–500, Nov. 2000b.

POLITZ, J.C.R.; POLENA, I.; TRASK, I.; BAZETT-JONES, D.P.; PEDERSON, T. A nonribosomal landscape in the nucleolus revealed by the stem cell protein nucleostemin. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 16, p. 3401–3410, Apr. 2005.

PONTVIANNE, F.; BLEVINS, T.; CHANDRASEKHARA, C.; MOZGOVÁ, I.; HASSEL, C.; PONTES, O.M.F.; TUCKER, S.; MOKROŠ, P.; MUCHOVÁ, V.; FAJKUS, J.; PIKAARD, C.S. Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. **Genes & Development**, New York, v. 27, n. 14, p. 1545–1550, June 2013.

PRIETO, J.-L.; MCSTAY, B. Pseudo-NORs: a novel model for studying nucleoli. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1783, n. 11, p. 2116–2123, July 2008.

QUATREFAGE, A. Etudes embryogéniques. Mémoire sur l'embryogénie des tarets. **Annales des Sciences Naturelles**, Paris, p. 3-11, 1849.

RAŠKA, I.; KOBERNA, K.; MALÍNSKÝ, J.; FIDLEROVÁ, H.; MAŠATA, M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. **Biology of the Cell**, Paris, v. 96, n. 8, p. 579–594, May 2004.

REEDER, R.H. Enhancers and ribosomal gene spacers. **Cell**, Cambridge, v. 38, n. 2, p. 349–351, Sept. 1984.

ROUSSEL, P.; ANDRÉ, C.; MASSON, C.; GÉRAUD, G.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. **Journal of Cell Science**, London, v. 104, pt. 2, p. 327–337, Nov. 1993.

ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. **Experimental Cell Research**, New York, v. 214, p. 465–472, May 1994.

RUZICKA, V. Zur Geschichte und Kenntnis der feineren Structur der Nucleolen centraler Nervenzellen. Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger, Jena, v. 16, p. 557-563, 1899.

SÁEZ-VÁSQUEZ, J.; MEDINA, F. The plant nucleolus. **Advances in Botanical Research**, London, v. 47, p. 1–46, May 2008.

SANIJ, E.; HANNAN, R.D. The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. **Epigenetics**, Barcelona, v. 4, n. 6, p. 374–382, Aug. 2009.

SANIJ, E.; POORTINGA, G.; SHARKEY, K.; HUNG, S.; HOLLOWAY, T. P.; QUIN, J.; ROBB, E.; WONG, L.H.; THOMAS, W.G.; STEFANOVSKY, V.; MOSS, T.; ROTHBLUM, L.; HANNAN, K.M.; MCARTHUR, G.A.; PEARSON, R.B.; HANNAN, R.D. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 183, n. 7, p. 1259–1274, Dec. 2008.

SARDANA, R.; O'DELL, M.; FLAVELL, R. Correlation between the size of the intergenic regulatory region, the status of cytosine methylation of rRNA genes and nucleolar expression in wheat. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 236, n. 2/3, p. 155–162, Mar. 1993.

SAVINO, T.M.; GÉBRANE-YOUNÈS, J.; MEY, J. de; SIBARITA, J.B.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 153, n. 5, p. 1097–1110, May 2001.

SCHUBERT, I. Chromosome evolution. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, n. 2, p. 109–115, Feb. 2007.

SCHWARZACHER, H.G.; WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. **Human Genetics**, London, v. 63, p. 89–99, Nov. 1983.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. **Practical** *in situ* hybridization. Oxford: Bios Scientific, 2000. 203 p.

SILVA, F.P. da; VECHIATO, M.H.; HARAKAVA, R. EF-1α gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* polyphyletic origin of strains. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 64–73, Jan. 2014.

SOLTIS, D.E.; ALBERT, V.A; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C.D.; PATERSON, A.H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; de PAMPHILIS, C.W.; WALL, P.K.; SOLTIS, P.S. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 96, n. 1, p. 336–348, Jan. 2009.

STEFANOVSKY, V.Y.; PELLETIER, G.; BAZETT-JONES, D.P.; CRANE-ROBINSON, C.; MOSS, T. DNA looping in the RNA polymerase I enhancesome is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 15, p. 3241–3247, June 2001.
SULLIVAN, G.J.; BRIDGER, J.M.; CUTHBERT, A.P.; NEWBOLD, R.F.; BICKMORE, W.A.; McSTAY, B. Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 2867–2874, Apr. 2001.

SYLVESTER, J.E.; GONZALES, I.L.; MOUGEY, E.B. Structure and organisation of vertebrate ribosomal DNA. In: OLSON, M.O. **The nucleolus.** New York: Kluwer Academic; Plenum, 2004. p. 58–72.

TOLLERVEY, D.; LEHTONEN, H.; JANSEN, R.; KERN, H.; HURT, E. Temperaturesensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. **Cell**, Cambridge, v. 72, p. 443–457, May 1993.

TYC, K.; STEITZ, J.A. U3, U8 and U 13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 3113–3119, July 1989.

WALLACE, H.; LANGRIDGE, W. Differential amphiplasty and the control of ribosomal RNA synthesis. **Heredity**, London, v. 27, p. 1–13, Aug. 1971.

WARNER, J.R. Distribution of newly formed ribosomal proteins in HeLa cell fractions. **The Journal of Cell Biology**, London, v. 80, p. 767–772, Mar. 1979.