DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alejandra Badaracco

Aspectos da estrutura da cromatina e da
atividade de transcrição induzida na glândula
salivar de *Rhynchosciara americana* (Diptera:
Sciaridae)

Aspects of chromatin structure and induced
transcription activity on salivary glands of
Rhynchosciara americana (Diptera: Sciaridae)

São Paulo

2014

Alejandra Badaracco

Aspectos da estrutura da cromatina e da
atividade de transcrição induzida na glândula
salivar de *Rhynchosciara americana* (Diptera:
Sciaridae)

Aspects of chromatin structure and induced
transcription activity on salivary glands of
Rhynchosciara americana (Diptera: Sciaridae)

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências Biológicas na
Área de Biologia (Genética).

Orientador: Prof. Eduardo Gorab

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Badaracco, Alejandra

“Aspectos da atividade de transcrição induzida pelo choque de temperatura e pela anestesia em *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae)”

75 (setenta e cinco) páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Rhynchosciara americana*
2. Estresse 3. Cromatina

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biología Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Eduardo Gorab
Orientador

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Prof. Eduardo Gorab, por ter-me dado a oportunidade de fazer este mestrado, por me ajudar no processo, tantos nas questões técnicas quanto na análise dos resultados, no entendimento dos mesmos e na escrita da dissertação. Agradeço-lhe também pela sua contagiosa curiosidade e por todas as conversas que mantemos nestes anos.

Agradeço a todas as pessoas que conformam e trabalham no Instituto de Biociências, sem as quais não seria possível pesquisa alguma. Em particular, quero agradecer a Deisy, por ter me ajudado sempre que precisei.

Agradeço a nossa pesquisadora visitante, Ann Stocker, por me ajudar no reconhecimento dos cromossomos, e ao Prof. Carlos Winter pela ajuda na análise das sequências.

Agradeço pela ajuda econômica que o CNPq me providenciou.

Agradeço às primeiras amigas que conheci na USP: Márcia, Christiane, Andressa e Susy. Sem elas, não poderia ter começado este mestrado; e menos acabá-lo.

Agradeço aos meus amigos argentinos de São Paulo: Melina, Pola, Karina, Luzia (argentina de coração), Seba, Walter, Diego, Ale, Tama, Max... Sempre é bom beber uns chimarrões juntos e comemorar quaisquer coisas.

Agradeço a várias amigas cuja experiência de maternidade chegou logo antes que a minha, e constituíram-se em fontes de consulta, ajuda e carinho: Silvana, Cora, Tamy, Kátia e Cat. Obrigada.

Agradeço ao Facebook e todos os contatos que me permitiu manter neste tempo longe da minha terra. Particularmente, agradeço aos grupos BET e Latinas em Sampa, que me permitiram obter informações que precisava e poder expressar os meus sentimentos no momento exato.

Agradeço aos meus amigos de Buenos Aires. São muitos, felizmente, e não cabem todos os seus nomes aqui. Faz alguns anos que acredito que a distância física não muda a distância dos corações, e vocês constituem a minha evidência.

Agradeço a minha cunhada Renata pela sua ajuda com a tradução ao inglês, e por sempre se preocupar e pensar no seu sobrinho.

Agradeço aos meus tios políticos Patricia e Enrique, por todos os bons sentimentos que colocam nas coisas que fazem, que são muitas, e todas as ajudas que nos proporcionam a mim e minha família.

Agradeço a Paula, Diego, Elian, Natan e Grisel, por estar sempre presentes na minha vida, por nos prestar muita ajuda nestes anos e pelos intercâmbios engraçados e fofos do whapps.

Agradeço a minha irmã Mariana, por sempre acreditar em mim, e me receber com o seu reconfortante sorriso todas as vezes que nos vemos. Agradeço a minha irmã Florencia, por ter me dado um maravilhoso sobrinho, Simón (e também agradeço por isso ao Mariano!), por ter me incentivado no momento de vir viver a São Paulo e por compartilhar a experiência de maternidade de perto, a pesar da distância. Agradeço ao meu irmão Agustín, por me disser sem medo o que passa pela sua mente, por sentir saudades de mim todos os dias, por escolher uma companheira, Soledad, que somou só coisas boas na vida dele, e por todo o carinho que recebo sempre dele, mesmo que não falemos por vários dias.

Agradeço aos meus pais, por tantas coisas que acabaria escrevendo uma outra dissertação inteira... Fundamentalmente, agradeço pela infinita ajuda nos momentos mais complicados e também nos momentos mais bonitos (às vezes coincidentes com os anteriores), por todo o amor que me brindaram desde que nasci até hoje, que é sem dúvida a fonte de energia de todos os meus empreendimentos, pelas palavras sábias, e por serem os meus modelos de vida, em todos os sentidos que isto significa.

Finalmente, agradeço à minha família: Sergio e Rafael. Sergio: graças por existir, por me conhecer, por me amar, por me incentivar e me ajudar na hora de acabar este mestrado, e graças por insistir em ampliar o nosso amor na forma de um filho, Rafael. E Rafael: obrigada por ter gerado em mim uma pessoa nova, disposta a tudo o que for necessário para cuidar o melhor possível de você. Obrigada por tanto amor.

Sumário

I. Resumo	8
II. Abstract	10
1. Introdução	12
1.1 Cromossomos politênicos	12
1.2 A resposta ao choque de temperatura	13
1.3 A resposta ao choque de temperatura em dípteros da Sub-Ordem Nematocera	16
1.4 A resposta à anestesia em <i>Trichomegalosphys pubescens</i>	17
1.5 Heterocromatina	18
1.6 Modificações epigenéticas e controle da expressão gênica	20
1.7 A proteína Sex-lethal em <i>Drosophila</i> e em espécies da família Sciaridae	21
1.8 Objetivos	23
2. Materiais e Métodos	24
2.1 Animais e Tratamentos experimentais	24
2.2 Preparação de lâminas cromossômicas para coloração, hibridação <i>in situ</i> e imunodeteção	24
2.3 Coloração com orceína	25
2.4 Hibridação endógena	25
2.5 Detecção citológica dos anticorpos	26
2.6 Microdissecção cromossômica	27
2.7 Amplificação de DNA microdissecado	27
2.8 Clonagem e sequenciamento dos produtos da amplificação	28
2.9 Marcação não radioativa do DNA	29
2.10 Hibridação <i>in situ</i>	29
2.11 Hibridação em “Southern-blot” de DNA provenientes de clones da microbiblioteca formada com os produtos de DOP-PCR	30
2.12 Algoritmos para a comparação das sequências dos clones com aquelas na base de dados do NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)	31
3. Resultados	33
3.1 Estudo da marcação de histona H3meK4 em cromossomos de larvas de <i>R. americana</i> submetidas ou não a estresse	33
3.2 Estudo da marcação de proteína Sex-lethal em cromossomos de larvas de <i>R. americana</i> submetidas ou não a estresse	38
3.3 Estudo de uma região dentro da secção A-9 do cromossomo A de <i>R. americana</i>	44
4. Discussão	59
4.1 Estresse por choque térmico e por anestesia em cromossomos de larvas de <i>R. americana</i>	59

4.2 Imunolocalização de proteína Sex-lethal em cromossomos de larvas de <i>R. americana</i>	61
4.3 Imunolocalização de histona H3meK4 em cromossomos de larvas de <i>R. americana</i>	62
4.4 A cromatina no sub-setor da secção A-9 de <i>R. americana</i>	64
4.5 Primeiras aproximações ao conhecimento das sequências de DNA da região A-9	65
5. Referências.....	68

I. Resumo

Os cromossomos politênicos da glândula salivar dos dípteros proporcionam condições excepcionalmente favoráveis à observação, em microscopia óptica, da estrutura da cromatina bem como da atividade gênica. Neste trabalho, a distribuição de modificações epigenéticas e de marcadores associados à atividade de transcrição foi estudada em cromossomos politênicos de larvas *Rhynchosciara americana* em condições normais de crescimento e também submetidas a tratamentos que levam ao estresse, um dos quais (anestesia por éter dietílico) realizado pela primeira vez nesta espécie. Na recuperação do estresse por anestesia, o *locus* do gene *hsp70* apareceu transcricionalmente ativo embora, frequentemente, a marcação de RNA polimerase II não ocupava todo o volume do pufe como ocorre usualmente na resposta ao estresse por choque térmico, sugerindo descondensação parcial do *locus*. A localização cromossômica da proteína Sex-lethal, postulada como um fator de *splicing* genérico em espécies da família Sciaridae, foi estudada pela primeira vez em larvas submetidas ao estresse. A ausência da mesma em *loci* cromossômicos que estão ativos em transcrição em condições estressantes sugere que Sex-lethal não seja um fator de *splicing* genérico. Além disto, a localização desta proteína em regiões transcricionalmente inativas durante o estresse sugere que Sex-lethal cumpra funções ainda não descritas. Entre os dados de localização de histona H3 metilada em lisina 4, marcador epigenético usualmente associado à transcrição, destacou-se a forte marcação de uma região particular dentro da secção cromossômica A-9. Esta região, entretanto, apresenta sinais muito fracos de anti-híbrido DNA/RNA e de RNA polimerase II, sugerindo atividade transcricional muito baixa ou ausente. Observou-se

também que o marcador epigenético conservado de heterocromatina, H3me3K9 (histona H3 trimetilada em lisina 9), não está presente na mesma; mas, por outro lado, detectou-se na região sinal significativo da proteína da heterocromatina de *Sciara coprophila*. Com o objetivo de conhecer sequências de DNA presentes na região, foi produzida uma biblioteca plasmidial produzida a partir de microdissecção cromossômica do sub-setor de A-9 seguida de DOP-PCR. O produto de amplificação foi usado como sonda em hibridação *in situ* e marcou, além da região microdissecada, extremidades cromossômicas não centroméricas, indicando que estas regiões compartilham sequências repetitivas. Algumas puderam ser identificadas após o sequenciamento, tais como repetições em *tandem* e elementos genéticos móveis enquanto que outras não apresentaram similaridade significativa com sequências disponíveis em bancos de dados. Os dados obtidos sugerem que o sub-setor de A-9 analisado assemelha-se à heterocromatina, porém composta de uma combinação aparentemente não usual de marcadores epigenéticos.

II. Abstract

Polytene chromosomes of dipteran salivary glands provide optimal visualization of chromatin structure as well as gene activity at the cytological level. In this work, the distribution of epigenetic and transcription-associated markers was studied in polytene chromosomes of *Rhynchosciara americana* larvae, either under normal growth or stressful treatments, one of which (anaesthesia by ether) has been observed for the first time in this species. During the recovery from the anaesthesia, the *hsp70* gene locus was transcriptionally active although RNA polymerase II detection did not occupy the entire volume of the puff –as usually happens during the heat shock response–, suggesting partial puff decondensation. The chromosomal localization of the sciarid Sex-lethal protein, which was supposed to be a general splicing factor, was studied for the first time in stressed larvae and was not detected in transcriptionally active loci. Hence, the Sex-lethal protein may not be a general splicing factor. Moreover, Sex-lethal localization in transcriptionally inactive regions during stress situations suggests it plays still unknown roles. Antibodies to histone H3 methylated at lysine 4 –an epigenetic marker of transcription– labeled strongly at a particular region within chromosome section A-9. This region, in contrast, displays very low levels of both DNA/RNA hybrid and RNA polymerase II, suggesting, if any, poor transcriptional activity. Interestingly, the conserved epigenetic heterochromatin marker H3me3K9 (histone H3 trimethylated at lysine 9) is not significantly present in this region, even though the *Sciara coprophila* heterochromatin protein was clearly detected. In order to sample DNA sequences contained in this region, a plasmid library was produced by performing a microdissection of A-9 sub-section followed by DOP-PCR. The total microdissection

product was used as a probe, and hybridized, in addition to the microdissected region, to non-pericentric chromosome ends, indicating that repetitive sequences are shared by these regions. Some sequences could be identify, after sequencing, such as *tandem* repeats and mobile elements, but others failed to display significant similarity to sequences deposited in databases. The results suggest that the sub-section analyzed resembles heterochromatin but being composed of an apparently unusual combination of epigenetic markers.

1. Introdução

1.1 Cromossomos politênicos

Descobertos no século XIX nas glândulas salivares do díptero *Chironomus* sp (Balbiani, 1881), a natureza cromossômica das estruturas descritas por Balbiani foi desvendada muito mais tarde com estudos realizados em larvas de *Bibio* sp e *Drosophila* sp (Heitz & Bauer, 1933; Painter, 1933). Os cromossomos politênicos estão presentes em células com intensa atividade metabólica, podendo alcançar dimensões cem vezes maiores do que cromossomos metafásicos do mesmo organismo.

Durante o desenvolvimento, os cromossomos politênicos resultam de replicações sucessivas do DNA sem que ocorram divisões nucleares ou celulares. Segundo a hipótese da politenía originalmente formulada por Koltzoff (1934), todas as cromátides permanecem alinhadas longitudinalmente durante os ciclos de replicação. Em determinados intervalos, a cromatina parece compactar-se formando estruturas que lembram contas e que são denominadas cromômeros. A justaposição dos cromômeros homólogos e a união das fibras de cromatina entre os cromômeros dão aos cromossomos politênicos sua conhecida morfologia de bandas e interbandas. Este padrão morfológico se mantém em qualquer tecido politênico de uma mesma espécie (Berger, 1940; Slizynski, 1950; Beermann, 1952; Pavan & Breuer, 1952). Durante anos, o interesse por estes cromossomos concentrou-se no cromômero, considerado a unidade de replicação cromossômica (Keyl & Pelling, 1963; Plaut, 1963) e também a unidade genética funcional (Beermann, 1972).

Anos após a redescoberta dos cromossomos politênicos, foram descritas alterações transitórias na estrutura dos mesmos (Beermann, 1952; Breuer & Pavan, 1952; Mechelke, 1953). Algumas bandas bem definidas perdiam seu aspecto compacto e se expandiam, originando uma estrutura que recebeu o nome de “pufe” (Poulson & Metz, 1938), denominação vinda do inglês (*puff*). Pesquisas posteriores revelaram que as fibras de cromatina componentes do cromômero se descondensavam na formação do pufe (Beermann & Bahr, 1954). A observação de que os puffes eram de localização distinta em diferentes tecidos ou períodos de desenvolvimento foi interpretada como consequência de atividade gênica diferencial (Beermann, 1952). A confirmação deste postulado veio com estudos autorradiográficos demonstrando que os puffes são locais de síntese intensa de RNA (Pelling, 1964). Expressão gênica diferencial como processo central na diferenciação celular e no desenvolvimento de organismos pluricelulares é um postulado que permanece atual, tendo sido derivado da observação dos cromossomos politênicos.

1.2 A resposta ao choque de temperatura

Os organismos estão adaptados ao crescimento e à reprodução numa faixa ampla de temperatura que pode variar do ponto de congelamento a valores superiores ao ponto de ebulição da água. No entanto, temperaturas moderadamente mais altas do que as normais de crescimento representam um desafio para a sua sobrevivência de qualquer organismo. Experimentos sobre os efeitos da temperatura em *Drosophila* sp já haviam sido iniciados na década de 1930. No entanto, a caracterização da resposta nuclear ao choque de temperatura nesta espécie veio mais tarde com a observação da

formação, após o choque, de pufes em regiões específicas dos cromossomos politênicos da glândula salivar (Ritossa, 1962).

O trabalho de Ritossa, na verdade, representa a descoberta da resposta ao choque de temperatura. Como fenômenos similares de resposta a temperaturas elevadas foram detectados tanto em outros eucariontes quanto em procariontes, a resposta ao choque de temperatura sugere ser um mecanismo extremamente conservado além de evolutivamente antigo. Trata-se de outro exemplo de descoberta de interesse geral em Biologia feita com a observação de cromossomos politênicos.

Nos anos seguintes, a identificação dos genes e das proteínas correspondentes tornou-se o foco da pesquisa sobre o estresse térmico (Ashburner & Bonner, 1979). Surgia na literatura a expressão “proteínas do choque de temperatura” (HSPs: *heat shock proteins*) e o estudo na área passou a se expandir em duas direções principais: regulação da resposta ao estresse e função das HSPs.

Os genes de resposta ao choque térmico são exemplos de genes cuja expressão encontra-se sob um controle comum. O elemento de controle está localizado em posição variável a montante (5') do sítio de início da transcrição de cada gene na forma de uma sequência de DNA denominada “elemento de resposta ao choque térmico” (HSE: *heat shock element*). Os HSEs, por sua vez, são reconhecidos por um ativador específico de natureza proteica, o fator de transcrição de choque térmico (HSF: *heat shock factor*; revisão em Morimoto *et al.*, 1990).

Os efeitos deletérios do choque de temperatura na organização celular não se restringem à denaturação de proteínas. Especialmente em eucariontes, danos celulares observados durante a resposta ao estresse incluem defeitos do citoesqueleto e suas consequências, como ser localização alterada das organelas e problemas no transporte

intracelular, entre outras coisas. Filamentos de actina podem se reorganizar após choque térmico moderado. Contudo, estresse térmico considerável resulta em agregação de proteínas constituintes de filamentos (vimentina, por exemplo), levando ao colapso de redes filamentosas intracelulares (revisão em Richter *et al.*, 2010).

Proteínas codificadas pelos genes de resposta ao choque térmico são genericamente denominadas “chaperonas”. São proteínas que têm a propriedade de ligar-se a peptídeos cuja conformação encontra-se alterada. A função das chaperonas é a de evitar a agregação de proteínas que sofreram mudanças em sua estrutura e também auxiliar na recuperação de sua conformação original. Dentro desta categoria agrupam-se cinco famílias de HSPs: HSPs100, HSPs 90, HSPs 70, HSPs 60 e sHSPs (*small heat shock proteins*), cuja numeração refere-se à sua massa aparente expressa em kilodaltons (revisão em Richter *et al.*, 2010). Existem na verdade outras classes de HSPs, algumas das quais são mencionadas a seguir. Uma delas faz parte de um sistema proteolítico encarregado da degradação de polipeptídeos agregados ou que apresentam conformação alterada. Enzimas de reparo de ácidos nucleicos danificados pelo estresse celular compõem outra classe de HSPs (Jantschitsch & Trautinger, 2003).

Hoje em dia assume-se que a acumulação de proteínas com estrutura alterada, cujo efeito é deletério, é o sinal que dá início à resposta ao estresse. Neste cenário, a célula pode responder a outros processos de estresse, além da temperatura, como por exemplo, o estresse oxidativo, metais pesados, anestésicos, etanol, e outros compostos tóxicos.

1.3 A resposta ao choque de temperatura em dípteros da Sub-Ordem Nematocera

Organismos da Sub-Ordem Nematocera são considerados evolutivamente mais primitivos do que representantes da Sub-Ordem Brachycera, onde se encontra *Drosophila* sp (Grimaldi & Engel, 2005). Espécies do gênero *Chironomus* sp (Diptera: Chironomidae) foram as mais estudadas dentro de Nematocera. Em geral, os resultados mostram a típica resposta ao choque vista em cromossomos politênicos de *Drosophila* sp, isto é, a formação de pufes específicos que transcrevem RNA abundantemente e diminuição concomitante dos níveis de transcrição na maioria das outras regiões cromossômicas (Lezzi *et al.*, 1981; Lezzi, 1984; Lezzi *et al.*, 1984; Sass, 1995). Contudo, uma das espécies deste gênero, *Chironomus riparius* (anteriormente denominada *C. thummi*), apresenta provavelmente a resposta ao choque térmico mais peculiar vista em dípteros até agora. Em *C. riparius*, além dos poucos pufes localizados em regiões intersticiais do cromossomo III, o choque de temperatura leva à formação de pufes teloméricos. Estes pufes terminais incorporam precursores de RNA, fatores de transcrição, RNA polimerase II (Morcillo *et al.*, 1994; Gorab *et al.*, 1996) e são ativos em transcrição de sequências repetitivas teloméricas que aparentemente não codificam para polipeptídeos (revisão em Díez *et al.*, 2009).

Na família Sciaridae, pertencente à Sub-Ordem Nematocera, dados publicados sobre a resposta ao choque de temperatura estão restritos a *Rhynchosciara americana* (Stocker *et al.*, 2006). Embora seja uma espécie típica de regiões de clima tropical, a tolerância à elevação da temperatura é significativamente baixa se comparada à *Drosophila* sp e espécies de Chironomidae. A resposta ao choque térmico é tipicamente a mesma caracterizada na maioria dos dípteros e demais eucariontes,

embora o número de *loci* cromossômicos detectados em *R. americana* que respondem à elevação de temperatura é menor do que aquele observado em *Drosophila* sp. Além disto, não se observou a formação de pufes com dimensões comparáveis aos observados em *Drosophila* sp. A região nuclear que contém o gene que codifica para a proteína HSP70 é aquela que durante o choque parece transcrever mais abundantemente do que as demais regiões cromossômicas (Stocker *et al.*, 2006).

1.4 A resposta à anestesia em *Trichomegalosphys pubescens*

Modelos animais, incluindo dípteros, têm sido empregados em estudos sobre anestesia. Biologia molecular aplicada à pesquisa neste campo tem dado relevância a genes cuja expressão possa fornecer bases bioquímicas do efeito anestésico (revisões em Gamo, 2002; Tanaka *et al.*, 2007). No entanto, com uma única exceção descrita a seguir, não existem dados publicados sobre mudanças na atividade gênica, que possam ser visualizadas em cromossomos ou núcleos, em resposta ao estresse induzido por anestésico.

Larvas de *T. pubescens*, após serem submetidas a uma atmosfera saturada de éter dietílico ou clorofórmio, respondem com a formação de um pufe na secção 15E do cromossomo X, que incorpora precursores de RNA. Comparada ao efeito do choque de temperatura, a anestesia, à primeira vista, não pareceu inibir a atividade gênica de forma generalizada. É importante notar que o pufe X15E atinge sua máxima expansão durante a recuperação do estresse e não durante a exposição ao anestésico (Amabis & Janczur, 1978). Não se conhece o gene localizado neste pufe, mas pode-se especular que a função gênica do seu produto tenha alguma relação com a

recuperação à anestesia pelo éter. Estudos similares ainda não foram relatados em outras espécies da família Sciaridae ou mesmo em *Drosophila* sp.

1.5 Heterocromatina

A regionalização cromossômica em domínios eucromáticos e de heterocromatina é um aspecto ainda enigmático da organização dos genomas nos eucariontes multicelulares. A heterocromatina foi originalmente descrita por Heitz (1928), para referir-se às regiões cromossômicas que não se descondensam após a divisão celular, e permanecem compactadas ao longo da interfase. A heterocromatina pode ser constitutiva ou facultativa. A heterocromatina facultativa está regulada no desenvolvimento e restrita a determinados tipos celulares, como por exemplo, o cromossomo X inativo nos mamíferos. A heterocromatina constitutiva é encontrada em todos os tipos celulares e observada em compartimentos cromossômicos essenciais para a função celular como os centrômeros, telômeros e em regiões organizadoras do nucléolo (Heitz, 1928; McClintock, 1938). A heterocromatina é pobre quanto ao número de genes nela contido (Pimpinelli *et al.*, 1986) e seu DNA replica tardiamente na fase S (Lima de Faria & Jaworska, 1968).

Bioquimicamente, a heterocromatina é composta principalmente de DNA repetitivo complexado com proteínas histônicas e não-histônicas cuja caracterização em detalhe iniciou-se a partir da década de 1980. As histonas, proteínas básicas componentes dos nucleossomos, apresentam um domínio globular com uma extremidade amino-terminal. Essas caudas N-terminais das histonas são alvo de uma variedade de modificações pós-transcricionais, que incluem acetilação, fosforilação e metilação, modificações essas que estão associadas a processos biológicos específicos

como divisão celular (fosforilação); regulação da atividade gênica (metilação, acetilação); reparo e recombinação de DNA (acetilação). Têm chamado a atenção nestes estudos aqueles voltados às modificações pós-traducionais que ocorrem em histonas na heterocromatina (revisões em Carrol & Straight, 2006; Nightingale *et al.*, 2006). Por exemplo, regiões cromossômicas heterocromáticas geralmente possuem genes silenciados e são ricas em metilação de H3K9 (leia-se metilação de histona H3 em lisina na posição 9) e não apresentam histonas acetiladas, enquanto que em regiões eucromáticas são observadas histonas acetiladas e metiladas em H3K4 (leia-se “histona H3 acetilada ou metilada em lisina 4”) (Jenuwein & Allis, 2001). Em *Drosophila* sp, metilação em histonas H3K9, H3K27 e H4K20 são marcadores de heterocromatina pericêntrica (Ebert *et al.*, 2006) assim como H3K9 em *Rhynchosciara americana* (Madalena *et al.*, 2012). Entre os componentes não histônicos que contribuem para a formação da heterocromatina destacam-se as proteínas que contêm cromodomínios como é o caso da Proteína 1 da Heterocromatina (HP1) além daqueles envolvidos na maquinaria de interferência de RNA (revisão em Beisel & Paro, 2011).

O DNA presente na heterocromatina já apareceu muitas vezes na literatura chamado de DNA lixo (*junk DNA*) porque nenhuma função codificante podia ser atribuída a ele. Atualmente este conceito tem sido revisado e hoje sabemos que ele pode ter papel essencial na manutenção da função centromérica assim como em outros processos celulares além de processos evolutivos. Os principais componentes genômicos da heterocromatina em praticamente todos os eucariontes são, além de elementos móveis, famílias de DNA altamente repetitivo que aparecem em múltiplas cópias de unidades organizadas em tandem ou dispersas. Estas unidades podem divergir entre si quanto à sequência e mostram grande variação de complexidade e

tamanho. Principalmente nas últimas três décadas, famílias de DNA altamente repetitivo foram caracterizadas e mapeadas fisicamente na heterocromatina de *Drosophila melanogaster*, talvez o modelo mais importante para este tipo de estudo, usando diversas estratégias de clonagem (Hoskins *et al.*, 2002; Hoskins *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007).

1.6 Modificações epigenéticas e controle da expressão gênica

O termo “epigenética” refere-se a manifestações fenotípicas de certas formas de herança desvinculadas da informação contida nas sequências de bases do DNA cromossômico. O resultado de modificações epigenéticas em alelos será, portanto, a expressão diferencial em *loci* que contêm a mesma sequência de DNA. Alguns mecanismos epigenéticos já foram identificados e, para este projeto, destacam-se aqueles brevemente descritos a seguir.

Sabe-se que a expressão gênica e o silenciamento gênico são dependentes de um contexto de cromatina. O ambiente cromatínico por sua vez sofre a influência, entre outros fatores, de modificações nas caudas amino-terminais das histonas que participam da estrutura nucleossômica, como foi mencionado na secção anterior. Estas modificações ocorrem após o processo de tradução da mensagem para síntese de histonas e podem ocorrer em qualquer histona componente do octâmero. Estas mudanças são produzidas por enzimas dotadas de atividade metiladora (metil-transferases), acetiladora (acetil-transferases) e fosforiladora (fosforilases). Tais processos podem ser reversíveis, sendo o da desacetilação de histonas -catalisado pelas desacetilases- o melhor estudado até o presente. Estudos iniciados principalmente na década de 1980 têm permitido correlacionar estas alterações pós-

traducionais das histonas a processos nucleares específicos, o que já foi chamado muitas vezes de “código de histonas” (Turner, 2002).

Certas modificações relacionadas a processos de transcrição estão bem estabelecidas, como, por exemplo, acetilação de histona H4 em lisina 12 (H4acK12) e metilação de histona H3 em lisina 4 (H3meK4). Contudo, dados mais recentes mostram que modificações epigenéticas consideradas típicas de silenciamento gênico e formação de heterocromatina (por exemplo, metilação de histona H3 em lisina 9), previstas no código de histonas, estão presentes em regiões genômicas eucromáticas transcritas pela RNA polimerase II (Eissenberg & Shilatifard, 2006). O exemplo acima, portanto, sugere cautela no uso da expressão “código de histonas”. Um dos muitos aspectos deste tema ainda não estudados em dípteros da Sub-Ordem Nematocera refere-se às marcas epigenéticas conectadas à transcrição. Uma das perguntas propostas neste projeto é se estas marcas são mantidas ou apagadas durante a resposta ao estresse por choque térmico, quando a maioria dos *loci* cromossômicos encontra-se sob repressão gênica.

1.7 A proteína Sex-lethal em *Drosophila* e em espécies da família Sciaridae

O gene *Sex-lethal* (*Sxl*) é um gene fundamental nos processos de compensação de dose gênica e determinação sexual de *Drosophila*. Em relação a este último processo, este gene é um exemplo clássico de determinação sexual controlada por mecanismos de *splicing* alternativo. Em linhas gerais, a via se inicia com o *splicing* sexo-específico do RNA transcrito de *Sxl*, cujo *exon* 3 apresenta um códon de término que impede a síntese de uma proteína funcional. Este *exon* está presente exclusivamente no RNA mensageiro de machos, resultando na produção de proteína

apenas em fêmeas. A proteína Sex-lethal por sua vez atua no *splicing* do mensageiro de outro gene, o *transformer (tra)*. A presença de Sex-lethal impede o uso de um sítio de *splicing* normalmente acionado, fazendo com que outro sítio seja utilizado. Neste caso, um mensageiro que codifica para uma proteína específica de fêmeas é gerado (Ruiz *et al.*, 2003; Serna *et al.*, 2004).

A função de *Sxl* em *Drosophila* levantou uma questão relacionada à evolução deste gene e sua função em dípteros. Para respondê-la, o gene *Sxl* foi clonado em quatro espécies da família Sciaridae (Sub-Ordem Nematocera). Os resultados mostraram por um lado que, a exemplo de *Sxl* de *Drosophila* sp, *Sxl* de *Sciara ocellaris*, *Sciara coprophila*, *T. pubescens* (*Trichosia pubescens*) e *R. americana* compartilham regiões cuja tradução conceitual revela domínios protéicos de interação com RNA. Por outro lado, entretanto, não se detectou distribuição sexo-específica da proteína nas espécies estudadas como visto em *Drosophila* sp (Ruiz *et al.*, 2003; Serna *et al.*, 2004). A partir de dados de localização da proteína Sex-lethal em cromossomos politênicos, postulou-se que sua função é a de um fator de *splicing* genérico (Serna *et al.*, 2004). Não existem dados de distribuição da proteína Sex-lethal de Sciaridae na resposta nuclear ao estresse celular. A exploração do choque de temperatura e da anestesia pelo éter, com o uso de anticorpos gerados nos estudos citados acima, poderia contribuir com novas informações sobre o papel desta proteína em processos de transcrição.

1.8 Objetivos

O objetivo geral do projeto é investigar em cromossomos politênicos de *Rhynchosciara americana* aspectos da atividade transcricional em controles e induzida pelo choque térmico e também pelo éter dietílico. Mais especificamente deseja-se:

- 1- Investigar a atividade de transcrição em cromossomos politênicos de larvas controle e sob estresse através da detecção imunológica de RNA polimerase II.
- 2- Investigar a distribuição cromossômica de RNA polimerase II, histona H3meK4 e da proteína Sex-lethal em larvas controle e sob estresse através de imunodeteção, visando correlacionar esses dados com aqueles obtidos através da detecção imunológica de híbrido DNA/RNA.
- 3- Identificar sequências localizadas na secção cromossômica A-9 através de clonagem de DNA procedente de microdissecção cromossômica.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais e Tratamentos experimentais

Larvas de *Rhynchosciara americana* foram coletadas em Mongaguá, São Paulo. A manutenção de larvas desta espécie foi descrita em Stocker *et al.* (2006).

Para o choque térmico, as larvas foram mantidas em câmara úmida a 37 °C por 30 min. A anestesia seguiu o protocolo descrito a seguir e definido previamente (Amabis & Janczur, 1978). As larvas foram mantidas, por 2 min, em placa de Petri fechada à temperatura ambiente contendo algodão umedecido com éter dietílico. Em seguida, as larvas passaram a se recuperar da anestesia, em condições de temperatura ambiente e livres da atmosfera de éter, por um período de 40-60 min, após o qual foi feita a extração da glândula salivar para as preparações cromossômicas.

2.2 Preparação de lâminas cromossômicas para coloração, hibridação *in situ* e imunodeteção

As glândulas salivares foram dissecadas em Ringer 1X. Foram empregados dois tipos de fixação, mantendo-se o tempo de 5 min para ambos. No primeiro, as glândulas foram fixadas com uma mistura de etanol/ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente. No segundo método, a mistura de fixação conteve: formol 3,7% (Merck), K₂HPO₄ 21,6mM, NaCl 100mM, NP-40 2%. As glândulas foram então transferidas para uma gota de solução de ácido acético a 50% (para o primeiro tipo de fixação) ou uma gota de solução de ácido acético a 45% com formol a 3,7% (para o

segundo tipo de fixação) colocadas sobre uma lamínula siliconizada. Após despedaçar as glândulas com auxílio de estiletes, o material foi esmagado entre lâmina e lamínula por pressão da ponta de uma pinça. O excesso de líquido da montagem foi removido por pressão digital sobre a lâmina colocada entre uma tira de papel de filtro. As preparações foram então congeladas sobre gelo seco ou nitrogênio líquido onde permaneceram por 10-20 min. Em seguida, as lamínulas foram rapidamente removidas com um bisturi e as lâminas imediatamente imersas em etanol absoluto a -10°C, e mantidas em congelador até a sua utilização. Antes de qualquer procedimento de detecção, as lâminas mantidas em etanol foram re-hidratadas em solução contendo TBS 1X, Triton X-100 0,1% por 5 min.

2.3 Coloração com orceína

Glândulas salivares foram dissecadas e fixadas em mistura de etanol e ácido acético (3:1) por 2 min. Em seguida, as glândulas foram transferidas para uma gota de ácido acético a 50% sobre uma lamínula. Uma gota de orceína lático-acética foi adicionada ao material e a lamínula emborcada sobre uma lâmina de microscopia. As preparações foram esmagadas e as bordas da lâmina vedadas com esmalte. Os cromossomos foram fotografados em microscopia de campo claro ou contraste de fase.

2.4 Hibridação endógena

Este método baseia-se na formação do híbrido DNA/RNA em *loci* dos cromossomos politênicos ativos em transcrição a partir de RNA nascente e a

respectiva cadeia molde. As lâminas fixadas e esmagadas sem formol, mantidas em etanol no congelador foram brevemente re-hidratadas em TBS 1X ou PBS 1X e incubadas em ácido acético a 50% durante 2 min a 42°C (Gorab, 2003). Após lavagem das lâminas em TBS ou PBS, a detecção do híbrido RNA/DNA foi feita como descrita a seguir.

2.5 Detecção citológica dos anticorpos

Cada preparação foi incubada, em câmara úmida à temperatura ambiente, com 5-10 µl de uma solução de anticorpos primários diluídos em TBS 1X, Triton X-100 a 0,1% e leite em pó desnatado (Molico) a 2%. O tempo de incubação foi de 1 h. Após este período, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS 1X, Triton X-100 a 0,1% durante pelo menos 10 min cada vez. Em seguida, cada preparação foi incubada com 10-20 µl de anticorpos secundários conjugados a fluorocromos (FITC ou TRITC, Sigma) diluídos 1:100 na mesma solução descrita acima. Os anticorpos secundários foram contra IgGs de cabra, coelho ou camundongo, dependendo do anticorpo primário utilizado. Incubação em câmara úmida foi de 1 h à temperatura ambiente. Após este período, as preparações foram lavadas em TBS 1X, Triton X-100 0,1% por, pelo menos, 10 min. Após uma última lavagem de 10 min em TBS 1X, as lâminas foram montadas com uma solução “antifading” (Vectashield™) e observadas em microscópio de fluorescência (Nikon) equipado com filtros específicos para FITC ou TRITC e acoplado a uma câmera CCD. Foram usados os seguintes anticorpos primários: Anti-híbrido DNA/RNA (Stollar, 1970) diluído a 1:50; Anti-Sex-lethal (Ruiz *et al.*, 2003) diluído a 1:50; Anti-RNA polimerase II (monoclonal, Upstate Tech.) diluído a 1:100; Anti-histona H3 mono, di e trimetilada em lisina 4 (Upstate

Tech.) diluído a 1:100; Anti-histona H3 dimetilada em lisina 4 (Upstate Tech.) diluído a 1:100; Anti-histona H3 trimetilada em lisina 4 (Upstate Tech.) diluído a 1:100; Anti-histona H3 metilada em lisina 9 (Upstate Tech.) diluído a 1:100; Anti-proteína de heterocromatina de *Sciara coprophila* monoclonal (Greciano *et al.*, 2009) diluído 1:100.

2.6 Microdissecção cromossômica

Microbisturis foram preparados a partir de capilares inicialmente estirados na chama de um bico de Bunsen e posteriormente modelados em uma microforja (de Fonbrune). A microdissecção foi feita com micromanipulador (Narishige) acoplado a um microscópio Axiovert (Zeiss). O procedimento foi feito com o material desidratado, raspando-se a região cromossômica com o fragmento de interesse, que foi coletado com a ponta do bisturi e transferido a um tubo de PCR estéril, quebrando-se a ponta do mesmo no interior do tubo. O material foi mantido a -20°C até o procedimento de amplificação.

2.7 Amplificação de DNA microdissecado

O DNA obtido por microdissecção foi amplificado por DOP-PCR (“*degenerate oligonucleotide-primed PCR*”) usando um termociclador Perkin Elmer 2400 (Norwalk, CT, EUA). Esta técnica baseia-se no uso de iniciadores (“*primers*”) com sequências aleatórias e temperatura de hibridação dos *primers* (30°C) que favorece a amplificação de virtualmente todas as sequências presentes no DNA microdissecado (Telenius *et al.*, 1992). No procedimento foram omitidos os

tratamentos com topoisomerase e proteinase K. No tubo de PCR, foi colocada a seguinte mistura de reagentes: 0,2mM de cada nucleotídeo; tampão Taq 1X; Taq DNA polimerase 2,5U (Life Tech, Grand Island, NY, EUA); MgCl₂ 1mM; *primer* DOP 75 pM; H₂O até completar a 50µl. Anteriormente à amplificação, a mistura foi centrifugada brevemente. As condições da primeira amplificação foram: 4 min a 93°C, seguido de 8 ciclos de 1 min a 94°C, 90 s a 30°C e 3 min a 72°C. Esta primeira amplificação foi completada com 28 ciclos adicionais de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C e 3 min a 72°C. Para a segunda amplificação, 5µl do produto da primeira amplificação foram adicionados a 50µl à mistura de reagentes descrita acima. A rotina empregada foi: 4 min a 96°C seguidos por 26 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C e 3 min a 72°C; e uma extensão final de 5 min a 72°C. Após verificar os produtos da amplificação em géis de agarose, o produto da segunda amplificação foi purificado e eluído usando colunas GFX-PCR (GE Healthcare, Piscataway, NY, EUA).

2.8 Clonagem e sequenciamento dos produtos da amplificação

Os produtos do DOP-PCR foram ligados a vetor plasmidial apropriado conforme instruções do fabricante (pGEM-T Easy, Promega). Procedimentos destinados à transformação bacteriana, plaqueamento e crescimento bacteriano em meio líquido foram aqueles corriqueiramente empregados (Sambrook *et al.*, 1989). Na extração de DNA plasmidial, foram utilizados *kits* conforme protocolos do fabricante (Life Tech.). As reações para sequenciamento dos insertos plasmidiais foram feitas com "*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*" seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems) utilizando os *primers* M13 *Forward* ou *Reverse* e subsequentemente analisadas no Departamento de Bioquímica

do IQ-USP em sequenciador modelo ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

2.9 Marcação não radioativa do DNA

Para a marcação do DNA cromossômico amplificado, partiu-se de 5µl de produto da primeira amplificação ou, alternativamente, 5µl do produto purificado da segunda reação. O procedimento é o mesmo empregado na segunda amplificação (ver item 2.7) com uma única modificação: utilizou-se 5µl de uma mistura de dATP, dCTP e dGTP na concentração de 0,2mM e biotina-11-dUTP (Sigma, St. Louis, MD, EUA) a 0,1mM para um volume final de 50µl. Para a marcação do DNA plasmidial (1-2ng), *primers* M13 *Forward* ou *Reverse* substituíram os *primers* DOP usando a rotina descrita acima com uma modificação: o tempo de extensão foi reduzido de 3 min para 30 s.

2.10 Hibridação *in situ*

As preparações de cromossomos politênicos armazenadas em etanol absoluto foram secas ao ar e em seguida montadas com lamínulas de plástico em 6-8µl de mistura de hibridação com a sonda mercada que apresentou uma concentração final de formamida 40%, SSPE 2X e SDS 0,1%. As lâminas foram aquecidas em vapor durante 5 min a 70-80°C, e mantidas em caixa fechada a 37°C por 12-15 h. Após este período, as preparações foram lavadas duas vezes a 37°C em solução contendo SSPE 1X, SDS 0,2%. Em seguida, as preparações foram lavadas em TBS 1X e incubadas por 20 min à temperatura ambiente em solução de TBST (TBS 1X, Triton X-100

0,1%). As preparações foram então incubadas com IgG de cabra anti-biotina conjugada com TRITC (Sigma), diluída 1:100 na solução descrita acima contendo também DAPI (0,3 μ M). Após 1 h à temperatura ambiente, as preparações foram lavadas 3 vezes em TBST com agitação, de 10 a 15 min cada lavagem. Após uma última lavagem em TBS 1X, as lâminas foram montadas em meio “antifading” (Vectashield, Vector Lab) e inspecionadas em fotomicroscópio Nikon equipado com epifluorescência.

2.11 Hibridação em “Southern-blot” de DNA provenientes de clones da microbiblioteca formada com os produtos de DOP-PCR

Os procedimentos de preparação de géis de agarose e extração de DNA genômico aparecem descritas em Sambrook *et al.* (1989). Após corrida em géis de agarose de DNAs plasmidiais cortados com enzima *EcoRI*, amostras de DNA foram transferidas alcalinamente a membranas carregadas positivamente (Hybond N+) seguindo as instruções do fabricante (GE Healthcare). Após lavagem e secagem das membranas, os ácidos nucleicos foram fixados por UV (GS Gene-Linker, Bio Rad). A hibridação foi feita a 60°C durante 12-15 h em solução contendo Na₂HPO₄ 0,5M, SDS 2%. DNA genômico da glândula salivar de *R. americana* (aproximadamente 150ng) foi usado como sonda. A marcação foi feita por *random priming* com α^{32} P-dATP ou α^{32} P-dCTP conforme protocolo do fabricante (Life Tech). As membranas foram lavadas duas vezes a 60°C, 30 min cada vez, em solução Na₂HPO₄ 40mM, SDS 2%.

2.12 Algoritmos para a comparação das sequências dos clones com aquelas na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

Com o objetivo de analisar as sequências dos insertos, realizaram-se buscas de similaridade usando a ferramenta “Blast” do NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Para isso, primeiramente, foram demarcadas as sequências próprias dos insertos, usando como limites as sequências de finalização dos primers usados na DOP-PCR: 5'ATGTGG3' (*primer Forward*) e 5'CCACAT3' (*primer Reverse*). Para ajudar a encontrar ambas as sequências, localizaram-se também os sítios de corte da enzima EcoRI (5'GAATTC3').

Usaram-se duas estratégias de busca para cada inserto. Os parâmetros utilizados em cada uma descrevem-se a continuação:

1. “Blast n”

“Database: Others (nr etc.): Nucleotide collection (nr/nt)”

“Optimize for: Somewhat similar sequences (blastn)”

2. “Blast x”

“Genetic code: Standard(1)”

“Database: Non-redundant protein sequences (nr)”

Quando foram achadas mais de uma sequência na base de dados com similaridade à sequência do clone, as mesmas foram alinhadas usando a ferramenta

“Clustal Omega” (www.clustal.org/omega/). Os parâmetros usados indicam-se a continuação:

```
“program: clustalo; version: 1.2.1;  
”guidetreeout: false; dismatout: false; dealign: false;  
”mbed: true; mbediteration: true;  
”iterations: 0; gtiterations: -1; hmmiterations: -1;  
”outfmt: clustal; order: aligned; stype: protein”
```

No caso da comparação da sequência GL22367 com o banco de dados do NCBI, uso-se o algoritmo “tblastn”, que permite comparar sequências de aminoácidos com sequências de nucleotídeos. Os parâmetros utilizados foram os providenciados na página web do Blast por *default* (Altschul *et al.*, 1997).

3. Resultados

3.1 Estudo da marcação de histona H3meK4 em cromossomos de larvas de *R. americana* submetidas ou não a estresse

O descobrimento accidental da resposta ao estresse por temperatura que Ritossa (1962) observou em células de mosca foi, tempo mais tarde, encontrado também em organismos procarióticos e em outros eucariontes, assim como em plantas, demonstrando a conservação deste mecanismo ao longo da evolução. *Drosophila* sp tornou-se um importante modelo animal na caracterização da resposta a estresse; e, ao mesmo tempo, foram surgindo evidências de que várias condições adversas (e não só as temperaturas elevadas) ativavam este mecanismo defensivo. Porém, até o momento de começar este mestrado, os conhecimentos sobre resposta ao estresse na família Sciaridae estavam restritos à anestesia por éter em *T. pubescens* (Amabis & Janczur, 1978) e ao choque de temperatura em *R. americana* (Stocker *et al.*, 2006).

Com o objetivo de iniciar uma caracterização do estado da cromatina em controles e em condições de estresse, decidiu-se localizar, mediante a técnica de imunodeteção, as proteínas H3meK4 (modificação que usualmente aparece em regiões eucromáticas transcricionalmente ativas) e RNA polimerase II. Como condições de estresse, larvas de *R. americana* foram submetidas ao choque de temperatura ou à anestesia por éter.

A imunodeteção de H3meK4 em larvas controle identificou uma grande quantidade de bandas, as quais nem sempre apresentavam marcação de RNA

polimerase II. Por questões técnicas de causas ainda desconhecidas, não foi possível observar com clareza esses resultados em algumas preparações cromossômicas (Fig. 1). Eles podem ser melhor observados na Fig. 2. Contudo, chamou a atenção a forte marcação da H3meK4 na secção A-9 do cromossomo A, que será analisada adiante com mais profundidade (ver secção 3.3 deste trabalho).

No processo de recuperação do estresse por anestesia, observa-se que nos cromossomos de larvas de *R. americana*, a marcação de H3meK4 não está necessariamente acompanhada de marcação da RNA polimerase II (Fig. 2). Interessantemente, estas imagens mostram que o *locus* do gene *hsp70* encontra-se ativo transcricionalmente.

Por outro lado, como era esperado, o *locus* do gene *hsp70* mostra-se fortemente ativo em transcrição em cromossomos de larvas de *R. americana* submetidas a estresse por temperatura, a julgar pela forte marcação do anticorpo anti-RNA polimerase II (Fig. 3). Entretanto, não foram detectadas marcas de H3meK4 nesta região. Mesmo sendo esta região muito ativa em transcrição nestas condições, isso não significa que marcas epigenéticas típicas de transcrição, como é o caso de H3meK4, não estejam presentes.

Fig. 1. (A) Imunodetecção de histona H3 metilada em lisina 4, (B) de RNA Polimerase II e (C) coloração com DAPI no cromossomo politênico A de larva de *R. americana* em condição controle. (D) Sobreposição das imagens A, B e C. A ponta de seta assinala a região A-9, que apresenta importante incorporação de histona H3 metilada em lisina 4.

Fig. 2. (A) Imunodeteção de histona H3 metilada em lisina 4, (B) de RNA Polimerase II e (C) coloração com DAPI em cromossomos politênicos de larvas de *R. americana* na recuperação do estresse por anestesia (éter dietílico). (D) Sobreposição das imagens A, B e C. A ponta de seta assinala o locus do gene *hsp70*, que se encontra ativo em transcrição.

Fig. 3. (A) Imunodeteccção de histona H3 metilada em lisina 4, (B) de RNA Polimerase II e (C) coloração com DAPI em cromossomos politênicos de larvas de *R. americana* sob condições de estresse por temperatura. (D) Sobreposição das imagens A, B e C. A ponta de seta assinala o *locus* do gene *hsp70*, que se encontra transcricionalmente ativo.

3.2 Estudo da marcação de proteína Sex-lethal em cromossomos de larvas de *R. americana* submetidas ou não a estresse

O conhecimento do fator de *splicing* Sex-lethal de *Drosophila* sp e o seu respectivo homólogo em espécies da família Sciaridae levantou a questão de qual seria o comportamento da mencionada proteína, particularmente em situações de estresse. Com o objetivo de começar uma primeira aproximação nesta temática, foram feitas repetitivas imunodeteções conjuntas da proteína Sex-lethal e de RNA-polimerase II em cromossomos de larvas de *R. americana* em situações controle, de estresse por temperatura e de recuperação após anestesia.

Primeiramente, foi avaliada a localização da proteína Sex-lethal nos cromossomos de larvas de *R. americana* em situação controle. Observaram-se casos em que a fluorescência se sobrepunha em muitas regiões cromossômicas embora a intensidade de marcação de cada anticorpo podia variar significativamente (Figs. 4 e 5). Isto sugere, a primeira vista, que, por exemplo, no caso do anticorpo anti-Sex-lethal, ele não está presente em regiões ativas em transcrição, como inferidas pela presença de RNA polimerase II. Neste caso, é difícil discernir se existem regiões cromossômicas em que apenas um dos marcadores estudados está presente.

Na situação de recuperação da anestesia, chamou a atenção a incorporação do anticorpo anti-RNA polimerase II no *locus* do gene *hsp70* (Fig. 6). A figura ilustra também um fato observado reiteradamente: o grau de descondensação do pufe deste *locus* era diferente ao achado em outras situações de estresse, tanto pela anestesia como pelo choque de temperatura (ver Fig. 7). No caso particular da recuperação da anestesia, a descondensação do *locus hsp70* parece ser parcial, e foi observada em várias preparações de larvas submetidas a estresse por éter. Observou-se também

neste *locus* que, claramente, não há incorporação do anticorpo anti-Sex-lethal na mesma intensidade que o anticorpo anti-RNA polimerase II.

No caso do estresse por temperatura, como esperado, o *locus* do gene *hsp70* encontra-se muito ativo e descondensado. O *locus* do gene da HSP70 incorpora RNA polimerase II massivamente a julgar pelo nível de marcação do anticorpo anti-RNA polimerase II. Entretanto, a proteína Sex-lethal não parece interagir com o *locus* já que o anticorpo anti-Sex-lethal não foi detectado na região. Isto foi observado também em uma região do cromossomo B que exibe forte marcação do anticorpo anti-RNA polimerase II (Fig. 7).

Em condições de choque de temperatura, outro fato marcante foi a detecção da proteína Sex-lethal com níveis de fluorescência muitas vezes elevados em regiões cromossômicas caracterizadas pela ausência, ou sinais muito fracos, de detecção de RNA polimerase II.

Fig. 4. (A) Imunodeteccção de proteína Sex-lethal, (B) de RNA Polimerase II e (C) coloração com DAPI em cromossomos politênicos de larvas de *R. americana* em condição controle. (D) Sobreposição das imagens A, B e C.

Fig. 5. (A) Imunodeteccção de proteína Sex-lethal, (B) de RNA Polimerase II e (C) coloração com DAPI no cromossomo B de larvas de *R. americana* em condição controle. (D) Sobreposição das imagens A, B e C.

Fig. 6. (A) Imunodeteccção de proteína Sex-lethal, (B) de RNA Polimerase II e (C) coloração com DAPI em cromossomos politênicos de larvas de *R. americana* na recuperação do estresse por anestesia (éter dietílico). (D) Sobreposição das imagens A, B e C. A ponta de seta assinala o locus do gene *hsp70*, que se encontra ativo em transcrição.

Fig. 7. (A) Imunodeteção de proteína Sex-lethal, (B) de RNA Polimerase II e (C) coloração com DAPI em cromossomos politênicos de larvas de *R. americana* sob condições de estresse por temperatura. (D) Sobreposição das imagens A, B e C. O asterisco assinala o *locus* do gene *hsp70*, que se encontra ativo em transcrição. A ponta de seta assinala uma região do cromossomo B que mostra importante incorporação de RNA Polimerase II. As setas apontam a dois *loci* do cromossomo B que respondem ao tratamento de estresse por temperatura.

3.3 Estudo de uma região dentro da secção A-9 do cromossomo A de *R. americana*

O interesse no conhecimento da localização cromossômica de H3meK4 em *R. americana* não se restringia simplesmente ao mapeamento desta modificação epigenética nos quatro cromossomos desta espécie, já que este tema ainda atual não foi estudado em dípteros da Sub-Ordem Nematocera. Era também objetivo do projeto verificar se esta marca particular conectada à transcrição sofria alguma redistribuição em resposta ao estresse pelo choque térmico e pela anestesia. Os resultados por um lado, não permitiram visualizar mudanças na localização cromossômica de H3meK4 após os tratamentos experimentais. Os anticorpos são detectados em muitas faixas cromossômicas (Fig. 8), dificultando a comparação entre cromossomos dos animais controle e daqueles que sofreram tratamentos experimentais. Além disto, a descondensação cromossômica local decorrente de transcrição usualmente leva à diminuição da intensidade de fluorescência indicativa da presença dos anticorpos. Obviamente, não se pode afirmar nestes casos que as modificações epigenéticas relacionadas à transcrição sofreram alguma alteração com a expressão gênica.

Por outro lado, os resultados de imunolocalização produziram um dado que chamou a atenção. Uma região particular do cromossomo A mostrava em larvas controle intensidade de fluorescência elevada quando comparada a qualquer outra região dos quatro cromossomos desta espécie (Fig. 8). A forte marcação no local se manteve quando as larvas foram submetidas ao choque térmico ou ao anestésico. Examinando os mapas cromossômicos de *R. americana* (Stocker *et al.*, 1993), esta região constitui um sub-setor dentro da secção A-9.

É interessante destacar que esta sub-secção cromossômica já havia chamado a atenção de Marta Breuer em suas observações citológicas (Fig. 9) que levaram à elaboração dos primeiros mapas dos cromossomos politênicos de *R. americana*, espécie descrita naquela ocasião como *R. angelae* (Breuer, 1967). A autora assinalou esta região particular da secção 9 como um dos dois “pontos especiais de referência” do cromossomo A, além de “zona de constituição especial sem faixas evidentes”. A ausência de bandas mencionada por Breuer pode ser observada com clareza em preparações feitas no laboratório, tanto em microscopia de campo claro como também em contraste de fase (Fig. 10). Outra característica a ser destacada é o conteúdo de DNA na sub-secção, aparentemente baixo se comparado a outras regiões a julgar pelo nível de fluorescência local obtido com DAPI (Figs. 1 e 8) e pelo nível de incorporação de precursores radioativos de DNA (dados não mostrados). Além disto, a ausência aparente de bandas se refletiu também na marcação dos anticorpos que parece ser homogênea na região e sem bandas fluorescentes.

Os resultados de imunodeteção foram inicialmente obtidos com anticorpos que reconhecem simultaneamente monometilação, dimetilação e trimetilação de H3K4. A continuidade do trabalho se fez então com outros dois anticorpos, empregados separadamente, que reconhecem especificamente dimetilação e trimetilação de H3K4. Os resultados obtidos com os dois anticorpos foram idênticos e reproduziram aqueles observados com os anticorpos que reconhecem as três formas de metilação de H3K4.

Fig. 8. (A) Imunodeteccção de histona H3 metilada em lisina 4, (B) de RNA Polimerase II e (C) coloração com DAPI no cromossomo A de larvas de *R. americana* em condição controle. (D) Sobreposição das imagens A, B e C.

Fig. 9. Mapa modificado do cromossomo politênico A de *R. americana* feito por Marta Breuer (1967). O retângulo vermelho assinala a região da secção A-9 estudada no trabalho. Notar que esta região já havia sido assinalada por Marta Breuer em sua publicação.

Fig. 10. (A) Cromossomo politênico A de larva de *R. americana* corado com orceína e fotografado em campo claro; (B) Cromossomo politênico A de larva de *R. americana* fotografado em contraste de fase; (C) Detecção de híbrido DNA/RNA em cromossomo A de larva de *R. americana*. As pontas de seta assinalam uma região particular dentro da secção 9.

Fig. 11. (A) Localização de híbrido DNA/RNA no cromossomo A de larva de *R. americana* em situação controle e (C) sob estresse por temperatura. (B) Contraste de fase da imagem vista em (A). (D) Contraste de fase da imagem vista em (C). As pontas de seta assinalam a região particular em estudo dentro da secção A-9. O asterisco indica o *locus* do gene *hsp70*, que se encontra transcritionalmente ativo.

A detecção de RNA na forma híbrida DNA/RNA foi empregada para avaliar a atividade de transcrição no sub-setor da secção A-9. O método usado tem uma etapa de exposição das preparações ao ácido acético aquecido o que resulta normalmente em perda considerável da qualidade do bandamento cromossômico quando observado em contraste de fase. Isto dificulta a identificação das regiões, particularmente quando estas não apresentam sinais mais intensos de detecção do híbrido DNA/RNA. Apesar da dificuldade, foi possível notar a ausência de sinais consideráveis da presença de híbrido DNA/RNA no interior da secção A-9 em controles e também após o choque de temperatura (Fig. 11).

O contraste entre nível reduzido de expressão gênica e marcas epigenéticas significativas de expressão gênica no sub-setor cromossômico de interesse levantou outra questão relacionada à estrutura da cromatina local. Esta região no interior de A-9 não está distante da heterocromatina pericentromérica do cromossomo A que abrange as secções 10, 11 e 12 (Breuer, 1967). Estas se caracterizam pela presença de bandas com alta deposição de H3me3K9 (Madalena *et al.*, 2012), modificação evolutivamente conservada na heterocromatina pericêntrica. Como esta marca se conecta à repressão gênica usualmente observada em ambiente heterocromático, ela poderia estar presente na sub-secção de A-9 e portanto correlacionar-se aos resultados de detecção de híbrido DNA/RNA na região. O exame em detalhe da localização de H3me3K9 no cromossomo A mostrou claramente que os sinais mais intensos se encontram nas secções 10-12 e que outras regiões também aparecem marcadas pelo anticorpo embora com fluorescência muito mais baixa. A fraca marcação com o anticorpo se aplica igualmente ao sub-setor de A-9 e, portanto, os dados não permitem comparar esta região à heterocromatina pericentromérica quanto à ocorrência massiva desta modificação epigenética (Fig. 12).

Decidiu-se então buscar outros marcadores que pudessem fornecer informações sobre a região que Marta Breuer descreveu como dotada de “composição especial”, além de não exibir um padrão de bandas como as demais. Em relação a esta última característica, ela pode estar presente em regiões heterocromáticas dos cromossomos politênicos de alguns dípteros. Contudo, os níveis de H3me3K9 observados na sub-secção de A-9 não foram os esperados para uma região heterocromática. Por este motivo, a continuação do estudo se deu com o emprego de outro marcador proteico de heterocromatina. Este marcador é um anticorpo monoclonal que reconhece uma proteína de *Sciara coprophila* (Diptera: Sciaridae) que contém um cromodomínio, e que se localiza na heterocromatina pericêntrica desta espécie (Greciano *et al.*, 2009). Como *Sciara* sp e *Rhynchosciara* sp pertencem à mesma família de Diptera, o anticorpo monoclonal poderia reconhecer a proteína nas duas espécies e por isso ele foi testado pela primeira vez nos cromossomos politênicos de *R. americana*. A exemplo do anticorpo contra H3me3K9, o anticorpo da proteína de *Sciara* interagiu fortemente com a heterocromatina pericentromérica dos quatro cromossomos de *R. americana* (dados não mostrados). Entretanto, uma diferença importante foi vista no cromossomo A já que, além da região pericêntrica, o anticorpo marcou significativamente a sub-secção de A-9. A intensidade de fluorescência detectada no sub-setor de A-9 é comparável àquela observada em bandas das secções A-10, A-11 e A-12 (Fig. 13).

A composição peculiar da cromatina do sub-setor de A-9 levou a uma última questão relacionada ao conteúdo informacional da região na forma de sequências de DNA. Dados de caracterização de sequências repetitivas de *R. americana* não mostraram que as sequências clonadas se encontram enriquecidas nesta região (Madalena & Gorab, 2005; Rossato *et al.*, 2007; Madalena *et al.*, 2010a; Madalena *et*

al., 2010b; Fernandes *et al.*, 2012). Dada a inexistência de sondas capazes de acessar a região, o passo seguinte foi o da microdissecção cromossômica para amplificação do DNA e posterior clonagem dos produtos de PCR. Inicialmente, todo o produto de PCR obtido foi marcado com biotina para ser usado como sonda em hibridação *in situ*. Isto foi feito com o intuito de confirmar que os procedimentos de microdissecção e amplificação haviam sido bem sucedidos. Os resultados revelaram não apenas que DNA do sub-setor se encontra no produto de PCR mas também que estas sequências estavam presentes em outras regiões cromossômicas (Fig. 14).

A primeira opção de estudo do DNA desta região era a de submeter todo o produto do PCR ao sequenciamento usando a plataforma Solid 454. Por razões ainda desconhecidas, muito DNA amplificado se perdia com a passagem por colunas visando remover os *primers* dos produtos de PCR. Por isso, não foi possível obter quantidade suficiente de DNA necessária à aplicação do método. Os produtos de PCR foram então ligados a vetor plasmidial, seguindo-se a transformação bacteriana, extração e análise do DNA plasmidial proveniente de colônias individuais. Restringiu-se a amostra a ser analisada ao DNA procedente de 61 colônias. Os DNAs plasmidiais foram cortados com a enzima *EcoRI*, analisados eletroforéticamente e então transferidos a membranas. Na triagem de insertos de interesse, foi usado como sonda DNA total da glândula salivar de *R. americana*. Embora pareça inespecífica à primeira vista, esta abordagem é extremamente útil na identificação de insertos de DNA repetitivo. Somente os insertos de sequências que estejam significativamente reiteradas no genoma hibridam fortemente com a sonda, o que foi visto igualmente no presente trabalho (exemplo na Fig. 15). Este método tem sido corriqueiramente empregado no laboratório para tal finalidade (Madalena & Gorab, 2005; Rossato *et al.*, 2007; Madalena *et al.*, 2010a; Madalena *et al.*, 2010b; Fernandes *et al.*, 2012) e

Fig. 12. (A) Imunodeteccção de histona H3 trimetilada em lisina 9 e (B) coloração com DAPI em cromossomos politênicos de *R. americana*. (C) Sobreposição das imagens A e B. O asterisco assinala uma região particular em estudo no interior da secção A9. As secções pericentroméricas de cada cromossomo que incorporam fortemente a histona modificada aparecem identificadas como feito por Breuer (1967).

Fig. 13. (A) Imunodeteccção de proteína da heterocromatina de *Sciara coprophila* (Greciano *et al.*, 2009) e (B) coloração com DAPI do cromossomo politênico A de larva de *R. americana*. (C) Sobreposição das imagens A e B. O asterisco assinala a região da secção A9, marcada pelo anticorpo. A região pericentromérica do cromossomo A, que incorpora fortemente a proteína da heterocromatina, aparece identificada conforme Breuer (1967).

Fig. 14. (A e D) Localização cromossômica da sonda do produto amplificado da microdissecção da região A-9 e (B e E) coloração com DAPI de cromossomos politênicos de larvas de *R. americana*. (C e F) Sobreposição das imagens à esquerda. A ponta de seta assinala a região A-9. Notar nestas imagens a localização da sonda em regiões terminais dos cromossomos.

B

Fig. 15. (A) Eletroforese em gel do inserto que contém a sequência repetitiva controle (M-22; Rossato *et al.*, 2007) e dez insertos de clones da microbiblioteca (39-48). Os insertos foram liberados do vector cortando-se os DNAs plasmidiais com EcoRI. (B) DNA do gel mostrado em A foi transferido a uma membrana e hibridado com DNA total de *R. americana*. Observa-se que os insertos 42 e 46 contem sequências repetitivas.

resulta em enorme economia de tempo e de materiais. Do contrário, todos os DNAs plasmidiais deveriam ser marcados com biotina para triagem individual por hibridação *in situ*.

O sequenciamento dos insertos foi então realizado, tendo sido os portadores de sequências repetitivas os primeiros a serem analisados. A comparação destes dados iniciais com aqueles depositados em bancos de dados permitiu a identificação das sequências, exceto a de número 42 (Tabela 1). A sequência 11 (Fig. 16) apresenta alto grau de similaridade com sequências predominantemente localizadas nas regiões subteloméricas dos cromossomos A e X de *R. americana* (Rossato *et al.*, 2007). As sequências 33, 37 e 46 correspondem ao transposon *mariner* (Madalena *et al.*, 2010a). Como esperado para este elemento móvel, ele aparece localizado em inúmeras regiões cromossômicas desta espécie (Fig. 17). O inserto 42 foi também usado como sonda em experimentos de hibridação *in situ* e marcou várias regiões cromossômicas de *R. americana* embora em número aparentemente menor do que aquele observado com a sonda do transposon *mariner* (Fig. 18).

Em relação às sequências de *R. americana* que não foram caracterizadas como repetitivas nos experimentos de hibridação em *Southern-blot*, duas mereceram destaque: 7 e 35. A tradução conceitual das mesmas mostrou identidade significativa com uma proteína de *Drosophila* sp ainda não estudada em detalhe (Fig. 19A). Quando confrontada às bases de dados do NCBI, esta proteína de *Drosophila* sp revelou similaridade com um retrotransposon de *D. melanogaster* (Fig. 19B).

Clone N°	Alinhamentos com (organismo)	Primeiro/s alinhamento/s (RefSeq)	Comentário
4	Plantas	XP_004516277	análise da similaridade em andamento
5	Peixe	GQ505858.1	análise da similaridade em andamento
7	<i>Drosophila persimilis</i> , <i>D. ananassae</i>	XP_002029416.1	genes e proteínas similares ainda não estudados
8	Plantas	XP_004510124.1	análise da similaridade em andamento
10	Vírus	ABW75124.1	análise da similaridade em andamento
11	<i>Rhynchosciara americana</i>	AY141125.1	<i>Rhynchosciara americana</i> clone pRa-43 minisatellite sequence
12	---	---	não foi achada similaridade
13	---	---	não foi achada similaridade
14	---	---	não foi achada similaridade
15	Fungi	XM_003836147.1	análise da similaridade em andamento
16	Gorila	XP_004044438.1	análise da similaridade em andamento
17	<i>Homo sapiens</i> / Camundongo	AC023119.8 / BAC33246.1	análise da similaridade em andamento
18	---	---	não foi achada similaridade
19	Bactéria	YP_003121572.1	análise da similaridade em andamento
20	---	---	não foi achada similaridade
21	Fungo	ETI21983.1 EHY55844.1	análise da similaridade em andamento
23	Bactéria	EIQ62143.1 WP_001346047.1	análise da similaridade em andamento
32	---	---	não foi achada similaridade
33	<i>Rhynchosciara hollaenderi</i>	GU442124.1	<i>Rhynchosciara hollaenderi</i> mariner transposon Rhmar1
34	<i>Homo sapiens</i>	NG_032046.1 AC104460.2	análise da similaridade em andamento
35	<i>D. persimilis</i> , <i>D. ananassae</i>	XP_002029416.1	genes e proteínas similares ainda não estudados
37	<i>R. americana</i>	HM588700.1	<i>Rhynchosciara americana</i> clone pRaB1-03 transposon mariner
38	Peixe	GQ505858.1	análise da similaridade em andamento
40	Peixe	EU008541.1	análise da similaridade em andamento
41	<i>Homo sapiens</i>	NG_033880.1	análise da similaridade em andamento
42	---	---	não foi achada similaridade
44	<i>Homo sapiens</i>	NG_033880.1	análise da similaridade em andamento
45	---	---	não foi achada similaridade
46	<i>R. americana</i>	HM588700.1	<i>Rhynchosciara americana</i> clone pRaB1-03 transposon mariner
47	---	---	não foi achada similaridade
48	Plantas e Nematodes	XP_004500470.1	análise da similaridade em andamento
49	<i>Homo sapiens</i>	AL512658.12	análise da similaridade em andamento
50	---	---	não foi achada similaridade
51	---	---	não foi achada similaridade
52	<i>Homo sapiens</i>	AL158047.9	análise da similaridade em andamento
53	---	---	não foi achada similaridade
54	Bactéria	HG322949.1	análise da similaridade em andamento

Tabela 1. A tabela resume os dados de similaridade de sequência obtidos na confrontação dos clones provenientes da região microdissecada com os bancos de dados do NCBI. Algumas das sequências obtidas (em andamento) requerem análise adicional para concluir se a similaridade é significativa ou não. Além dessas sequências, outros 24 insertos foram obtidos; após várias tentativas de sequenciamento, não foi possível a leitura por razões ainda desconhecidas. As sequências repetitivas no genoma de *R. americana*, inferidas após análises por hibridação em *Southern-blot*, aparecem em fundo azul. Em negrito são ressaltadas as sequências de *R. americana* analisadas neste trabalho que apresentaram similaridade significativa com dados previamente depositados em bancos de dados.

pRaA-11	acagacagatggacggacgga-ggacggggggacagacggacagaggacagacggacag	59
pRa-43	ACAGACAGATGGACGGACGGACGGACAGAGGGACAGACGGACAGAGGAACAGACGGACAG	60
pRaA-11	acagacagacagacggacggacggacggacggacggacggaAGGGGAGAAAAGGTGCTTCGATC	119
pRa-43	ACAGACAGACGGACGGACGGACGGACGGACGGACGGACGGGAGAAAAGGTGCTTCGATC	120
pRaA-11	ATTTGATCAACTTCTCCGGGCTCTGACTAAGACCAAGTCATGCAGTTAGACATGGCTTGAG	179
pRa-43	ATTTGATCAACTTCTCCGGGCTCTGACTAAGACCAAGTCATGCGGTTAGACATGGCTTGAG	180
pRaA-11	TTCCAAATGGCAGCCTATTCCCGGTATAGTGCACTACTTTTATGGTCCTAGTCAACAGTA	239
pRa-43	TTCCAAATGGCAGCCTATTCCCTGTATAGTGCACTACTTTTATGGTCCTAGTCAACAGTA	240
pRaA-11	GTTGAGGCATAAAGAGACATAGCGGacacacacacacacacacacac	286
pRa-43	GTTGAGGCATAAAGAGACATAGCGGACACACACACACACACACAC	287

Fig. 16. Alinhamento do clone 11 (pRaA-11) com o clone pRa-43, correspondente a uma sequência de *R. americana* de localização sub-telomérica (Rossato *et al.*, 2007).

Fig. 17. (A) Localização do inserto do clone 46 com sonda marcada com biotina e (B) coloração com DAPI em cromossomo A de larva de *R. americana*. (D) Localização do inserto do clone 46 com sonda marcada com biotina e (E) coloração com DAPI em cromossomo B de larva de *R. americana*. (C, F) Sobreposição das imagens à esquerda.

4. Discussão

4.1 Estresse por choque térmico e por anestesia em cromossomos de larvas de *R. americana*

A resposta ao estresse por choque térmico é amplamente conhecida e vem sendo estudada desde que descoberta (revisado em Richter *et al.*, 2010). Entretanto, a resposta ao estresse por anestesia, pelo menos do ponto de vista cromossômico, não é tão sabida nem analisada. O estudo do efeito da anestesia por éter em *T. pubescens* (Amabis & Janczur, 1978) e do choque de temperatura em *R. americana* (Stocker *et al.*, 2006) representam os únicos antecedentes notáveis em espécies da família Sciaridae.

Existem algumas fontes bibliográficas em vertebrados que se relacionam aos achados do presente trabalho. Em 1991, Udelsman *et al.* acharam que a resposta ao estresse –que definiram como expressão de HSP70- observa-se em alguns tecidos de ratos submetidos à anestesia. Já trabalhos mais recentes relatam um aumento da expressão de HSP70 no miocárdio de ratos hipertensos submetidos à anestesia (Li *et al.*, 2010) e em cérebro de ratos submetidos à hipotermia (Kaneko & Kibayashi, 2012). Em *R. americana*, o gene *hsp70* encontra-se localizado em um *locus* do cromossomo A, referido como A14F/15A, e apresenta a maior expansão (pufe) em situações de choque térmico (Stocker *et al.*, 2006). No presente trabalho, foi possível observar o mesmo na resposta ao choque por temperatura (v. Fig. 7), como era esperado. Na situação da recuperação do estresse por anestesia, o *locus* do gene *hsp70* também mostrou atividade transcricional; mas, inesperada e interessantemente, a

marcação de RNA polimerase II aparecia com frequência mais fortemente nos limites do pufe, do que no centro do mesmo (v. Fig. 6). Isto pode ser interpretado como uma diferença na maneira de descondensação do *locus* no momento da transcrição em resposta à anestesia, em comparação com a resposta ao choque térmico. Existem na literatura situações parecidas no que se refere a puffes formados em cromossomos politênicos. O caso mais conhecido e estudado é o dos “Anéis de Balbiani”, formados em cromossomos da glândula salivar de dípteros da família Chironomidae (Kutsenko *et al.*, 2014). Esta diferença na reação morfológica do *locus* ao estresse produzido por dois agentes distintos poderia ser indicativa de uma diferença na sinalização molecular da resposta celular ao ambiente adverso. Os resultados obtidos neste trabalho representam provavelmente a primeira descrição em invertebrados da ativação do gene *hsp70* frente ao estresse por anestesia feita com éter dietílico.

Continuando a análise dos resultados, as respostas cromossômicas a estes dois tipos de estresse conduzem à observação de que a quantidade de *loci* que permanecem ativos em transcrição no caso da resposta ao éter é maior do que na resposta ao choque térmico (v. Figs. 2, 3, 6 e 7). Tendo em consideração que, em geral na resposta ao estresse e particularmente nos processos de resposta a estresse pela temperatura, a atividade transcricional geral da célula apresenta uma importante queda e o metabolismo parece priorizar o controle de possíveis danos celulares, este resultado sugere que o choque térmico constitui, no nível gênico de *R. americana* e provavelmente de outros organismos, uma adversidade mais difícil de ser contornada do que a anestesia por éter.

No referente ao estresse por anestesia, o trabalho de Amabis & Janczur (1978) mostra a formação de um pufe na região X15E do cromossomo X de *T.*

pubescens. Os autores também fazem menção a outros pufes, mesmo que não tão chamativos quanto ao já explicitado, a saber: X18D, X11D, C6C, B4E e B10G-H. No presente trabalho, puderam observar-se muitos *loci* ainda ativos no período de recuperação da anestesia nos cromossomos de larvas de *R. americana* (v. Figs. 2 e 6), o que contrasta com a aparente baixa quantidade de *loci* relatados por Amabis & Janczur (1978) nas mesmas condições em *T. pubescens*. Esta diferença pode ser explicada por uma subestimação dos *loci* que permanecem ativos em transcrição nas larvas de *T. pubescens* submetidas a estresse por éter, já que os cromossomos não foram mostrados integralmente. Uma maneira de testar este suposto seria repetir as experiências realizadas neste trabalho, em larvas de *T. pubescens*. Cabe destacar que em *R. americana*, à diferença de *T. pubescens*, o *locus* com maior intensidade de sinal de RNA polimerase II é o do gene *hsp70* localizado no cromossomo A, como já foi destacado. O trabalho realizado em *T. pubescens* não mostrou, na recuperação da anestesia por éter, ativação gênica no braço curto do cromossomo A onde se encontra o gene *hsp70* nesta espécie (dados não mostrados).

4.2 Imunolocalização de proteína Sex-lethal em cromossomos de larvas de *R. americana*

A proteína Sex-lethal, fator de *splicing* sexo-específico em *Drosophila* (Ruiz *et al.*, 2003), foi postulada como um fator de *splicing* genérico em espécies da família Sciaridae (Serna *et al.*, 2004). No presente trabalho, e com o objetivo de indagar com mais detalhes neste assunto, realizaram-se imunodeteccões desta proteína em cromossomos de larvas de *R. americana* submetidas, ou não, a estresse por choque

térmico ou por anestesia (éter). Observou-se que na situação controle, a proteína Sex-lethal coincide, em muitos *loci*, com a localização da RNA polimerase II (v. Figs. 4 e 5), o que não refuta a hipótese feita por Serna *et al.* (2004), de que se trata de um fator geral de *splicing*.

Contudo, na resposta ao estresse, esta proteína não se encontrou presente em todos os *loci* ativos em transcrição inferidos pela presença de RNA polimerase II (v. Fig. 7). Possíveis explicações para este fato são que, ou bem ela não está presente porque os transcritos nestes *loci* são desprovidos de *introns* e, portanto, não requerem a presença de Sex-lethal, ou bem estes transcritos têm *introns* e o *splicing* é realizado por outros fatores. Caso a última hipótese seja a correta, a proteína Sex-lethal não pode ser vista como fator geral de *splicing*.

Uma análise mais detalhada das imagens na resposta ao estresse permitiu observar que a detecção de Sex-lethal não era necessariamente acompanhada de marcação simultânea de RNA polimerase II (v. Figs. 6 e 7). Esta observação reforça a ideia de que a proteína cumpra outras funções não relacionadas à transcrição. Os dados aqui obtidos não permitem, em princípio, formular hipóteses para tais funções e são, para tal fim, requeridas novas abordagens experimentais.

4.3 Imunolocalização de histona H3meK4 em cromossomos de larvas de *R. americana*

Inicialmente descoberta em testis de truta (Honda *et al.*, 1975), a histona H3meK4 foi ligada, em subseqüentes estudos, à ativação transcricional em várias

espécies de eucariontes (revisado em Martin & Zhang, 2005). Com o conhecimento disto, iniciou-se nesta tese uma comparação da imunolocalização desta marca epigenética em cromossomos de larvas de *R. americana*, submetidas, ou não, a situações de estresse, ao mesmo tempo que se imunolocalizava também a RNA polimerase II. Os resultados mostraram, para todas as condições, que não sempre existia marcação de H3meK4 quando a RNA polimerase II estava presente (v. Figs. 1, 2 e 3). Porém, isto não exclui o fato de que outras marcas epigenéticas de atividade transcricional estejam presentes nesses setores, e que possam ser procuradas futuramente. Por exemplo, marcações como H3me3K36 ou presença de proteínas SU(VAR)3-10 –entre muitas outras-, que são indicadoras de eucromatina em *Drosophila* sp (Filion *et al.*, 2011; van Bemmelen *et al.*, 2013), poderiam estar presentes nestas regiões.

Como foi mencionado nos Resultados, a marcação de histona H3meK4 apresenta-se nos cromossomos de larvas de *R. americana* como um conjunto muito extenso de bandas, o que dificulta a sua interpretação e estudo (v. Fig. 8). Contudo, uma região dentro do setor A-9 apareceu fortemente marcada (v. Figs. 1 e 8) e, dadas as suas características restritas às observações feitas por Marta Breuer (1967), a indagação da composição cromatínica da mesma constituiu-se um objetivo da presente tese (v. secção 4.4).

4.4 A cromatina no sub-setor da secção A-9 de *R. americana*

Nos últimos anos, acompanhando o sequenciamento massivo dos genomas de diversos modelos experimentais, aprofundou-se o conhecimento sobre as propriedades epigenéticas da cromatina. Especialmente interessante para esta tese, resultam as originais informações achadas em *Drosophila* sp. Por exemplo, definiram-se três tipos básicos de heterocromatina em *Drosophila* sp (Filion *et al.*, 2010), um dos quais –chamado de heterocromatina “clássica” ou “verde” - caracteriza-se pela presença de histona H3me2K9 e geralmente também de H3me3K9 (Filion *et al.*, 2010; van Bommel *et al.*, 2013). Como se mostrou neste trabalho, esta marcação epigenética H3me3K9 não está presente na região A-9 do cromossomo A de *R. americana* (v. Fig. 12). Mas, como vimos, esta região apresenta sinais de baixa ou mesmo ausente ativação transcricional, caracterizando-se por ter praticamente inexistentes marcações de anti-híbrido DNA/RNA e de RNA polimerase II (v. Figs. 11 e 1, respectivamente), além de sinal significativo de proteína de heterocromatina de *S. coprophila* (v. Fig. 13). Frente a estes resultados indicativos de marcações epigenéticas ligadas à heterocromatina, obteve-se, em contraste, sinal claro e intenso de histona H3meK4 na região (v. Figs. 1 e 8)–marcação geralmente ligada a eucromatina (Jenuwein & Allis, 2001; Ringrose & Paro, 2004; Ruthenburg *et al.*, 2007). Como mencionado anteriormente, este resultado motivou o estudo da região A-9 no nível de sequência de DNA. Cabe destacar que, na bibliografia, encontram-se vários exemplos de genes de *Drosophila* sp contendo marcações epigenéticas bivalentes: ou seja, nos quais coexistem sinais típicos de eucromatina e de heterocromatina, e cuja expressão muitas vezes depende do contexto genômico (Riddle *et al.*, 2011; Kharchenko *et al.*, 2011). O que chama a atenção neste sub-setor

da secção A-9 são os níveis anormalmente altos de H3meK4 a julgar pela forte marcação do anticorpo quando comparada às demais regiões dos cromossomos politênicos. Neste sentido, é possível que estejamos diante de um tipo particular de heterocromatina cuja composição aparece descrita pela primeira vez neste trabalho.

4.5 Primeiras aproximações ao conhecimento das sequências de DNA da região A-9

Com o objetivo de começar a estudar as sequências de DNA contidas na região A-9 de *R. americana*, realizou-se uma microdissecção do setor de interesse. A partir desta, obteve-se uma sonda que, como já foi indicado nos Resultados, marcou também extremidades não centroméricas dos cromossomos de *R. americana*. Portanto, não estaria errado afirmar que regiões terminais e o sub-setor de A-9 compartilham sequências de DNA. Uma destas características suspeitou-se -e nesta tese confirmou-se- ser a presença de sequências repetitivas, algumas das quais descritas em trabalhos já publicados. Dentro das sequências clonadas, cinco resultaram repetitivas no genoma de *R. americana* quando analisadas através da técnica de *Southern-blot*: sequências 11, 33, 37, 42 e 46 (v. Tabela 1).

Como foi adiantado, os dados de sequenciamento obtidos neste projeto revelaram que de fato existem algumas sequências repetitivas que são comuns às duas regiões: o minissatélite da sequência 11 (previamente estudado em Rossato *et al.*, 2007; v. Fig. 16) e o transposon *mariner* (sequências 33, 37 e 46; v. Fig. 17 e Madalena *et al.*, 2010) são exemplos claros disto.

Por outro lado, quando confrontada à base de dados do NCBI, a sequência 42 não foi identificada (v. Tabela 1). Trata-se, portanto, de uma nova sequência repetitiva (v. Figs. 15 e 18). Contudo, ela deve estar representada parcialmente já que o DOP-PCR não deve ter amplificado toda a sua extensão. Esta sequência poderia ser parte de um elemento móvel não descrito até o momento nesta espécie, ou também parte de uma sequência repetitiva dispersa no genoma sem capacidade de mobilização.

Outro apoio à existência, no sub-setor de A-9, de DNA repetitivo enriquecido em regiões terminais não pericêntricas veio de resultados de hibridação *in situ* usando como sonda o DNA do sub-setor de A-9 inicialmente amplificado por DOP-PCR. Este produto de amplificação altamente diluído foi usado em novo PCR com um único *primer* que é capaz de amplificar uma sequência repetida em tandem, denominada M-22, que aparece enriquecida em extremidades cromossômicas não centroméricas de *R. americana* (Rossato *et al.*, 2007; Madalena *et al.*, 2010). Esta nova sonda foi marcada com biotina e hibridou exclusivamente nas cinco extremidades cromossômicas não centroméricas de *R. americana* (dados não mostrados). O resultado sugere que M-22 encontra-se presente no sub-setor de A-9 com representatividade provavelmente abaixo do limite de detecção por hibridação *in situ*.

Finalmente, foi encontrada uma sequência, representada nos clones 7 e 35, com características de um gene cuja tradução conceitual resulta significativamente similar a um polipeptídeo de *Drosophila* sp. O único alinhamento informativo mostrou identidade com parte do retrotransposon *pilger* (v. Fig. 19B). Não é possível dizer se esta sequência é expressa na glândula salivar de *R. americana*. Caso seja expressa neste órgão, seu nível de expressão deve ser baixo a julgar pelos resultados de hibridação endógena vistos no sub-setor de A-9. No entanto, um dado intrigante

chama a atenção: os experimentos de hibridação em *Southern-blot* não indicaram ser esta uma sequência reiterada no genoma de *R. americana*. Trata-se de aparente contradição, já que elementos móveis geralmente mostram graus de reiteração genômica variáveis e que podem ser detectados pelo método empregado neste trabalho. Permanece portanto a dúvida quanto ao significado do alinhamento encontrado das sequências traduzidas dos clones 7 e 35. Com independência a esta questão, a amostra de sequências analisada, embora pequena, sugere que sequências repetitivas no sub-setor de A-9 aparecem com frequência comparável àquela observada em regiões cromossômicas terminais não pericêntricas. Tal afirmação tem apoio no número de clones contendo sequências repetitivas que foi obtido por microdissecção, clonagem e sequenciamento de DNA da extremidade cromossômica politênica B-1 de *R. americana* (Madalena & Gorab, 2005). Embora não se descarte a existência de genes no sub-setor de A-9, os dados deste trabalho parecem delinear uma região em que a atividade de transcrição, aparentemente muito baixa, se deve em parte às sequências repetitivas e elementos móveis que podem estar presentes em maior proporção do que aquela inferida pelos dados preliminares de sequenciamento obtidos até aqui.

5. Referências

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, e Lipman DJ (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402

Amabis JM (1974) Estudo dos cromossomos de *Trichosia pubescens*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

Amabis JM, Janczur C (1978) Experimental induction of gene activity in the salivary gland chromosomes of *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae). J Cell Biol 78: 1-7

Amorim DS (1992) A catalogue of the family Sciaridae (Diptera) of the Americas South of the United States. Revta Bras Ent 1: 55-77

Ashburner M, Bonner JJ (1979) The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. Cell 17: 241-254

Balbiani EG (1881) Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de Chironomus. Zool. Anz. 4: 637-641.

Beermann W. (1952) [Chromomere constancy and specific modifications of the chromosome structure in development and organ differentiation of *Chironomus tentans*]. Chromosoma. 1952;5(2):Unknown.

Beermann W, Bahr GF (1954) The submicroscopic structure of Balbiani-ring. Exp Cell Res. 1:195-201

Beermann W (1972) Chromomeres and genes. Results Probl Cell Differ. 4:1-33.

Beisel C, Paro R (2011) Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. Nat Rev Genet 12:123-135.

Berger CA. (1940) Sat-chromosomes. Science. 92:380-1

Breuer ME, Pavan C (1952) Gens na diferenciação. Ciênc e Cult 4:115

Breuer ME (1967) Cromossomos politênicos das glândulas salivares de *Rhynchosciara angela* (Diptera, Sciaridae). Rev Bras Biol 27:105-108

Carroll CW, Straight AF.(2006) Centromere formation: from epigenetics to self-assembly. Trends Cell Biol 16:70-78.

Díez JL, Martínez-Guitarte JL, Gorab E, Morcillo G (2009) Transcriptional activity at the telomeres of *Chironomus* (Diptera). Its possible role in the lengthening of the telomeres. Em: (Mancini L, ed.) Telomeres; Function, Shortening and Lengthening. Nova Publishers NY

Ebert A, Lein S, Schotta G, Reuter G (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. Chromosome Res 14: 377-392.

Eissenberg JC, Shilatifard A (2006) Leaving a mark: the many footprints of the elongating RNA polymerase II. Curr Opin Genet Dev 16: 184-190

Fernandes T, Madalena CRG, Gorab E (2012) Cloning and characterisation of a novel chromosome end repeat enriched with homopolymeric (dA)/(dT) DNA in *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). Chromosome Res 20: 435-445.

Filion GJ, van Bommel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, van Steensel B (2010) Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. Cell. 143(2):212-24.

Gamo S (2002) Studies on target genes of general anesthetics. Curr Drug Targets 3: 31-41

Gorab E, Botella LM, Quinn JP, Amabis JM, Díez JL. (1996) Ku-related antigens are associated with transcriptionally active loci in *Chironomus* polytene chromosomes. Chromosoma 105: 150-157

Gorab E (2003) Reverse transcriptase-related proteins in telomeres and in certain chromosomal loci of *Rhynchosciara* (Diptera: Sciaridae). Chromosoma 111: 445-454

Greciano PG, Ruiz MF, Kremer L, Goday C (2009) Two new chromodomain-containing proteins that associate with heterochromatin in *Sciara coprophila* chromosomes. *Chromosoma*. 118(3):361-76

Grimaldi D, Engel MS (2005) Evolution of the insects. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo

Heitz, E. (1928) Das Heterochromatin der Moose. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik*. 69: 762–818.

Heitz E, Bauer H (1933) Beweise für die Chromosomennatur der Kern-schleifen in den Knauelkernen von *Bibio hortulanus*. *Z Zellforsch Mikroskop Anat* 17: 67-82.

Honda BM, Candido PM, Dixon GH. (1975) Histone methylation. Its occurrence in different cell types and relation to histone H4 metabolism in developing trout testis. *J Biol Chem*. 250(22):8686-9.

Hoskins RA, Smith CD, Carlson JW, Carvalho AB, Halpern A, Kaminker JS, Kennedy C, Mungall CJ, Sullivan BA, Sutton GG, Yasuhara JC, Wakimoto BT, Myers EW, Celniker SE, Rubin GM, Karpen GH (2002) Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. *Genome Biol* 3: RESEARCH0085.

Hoskins RA, Carlson JW, Kennedy C, Acevedo D, Evans-Holm M, Frise E, Wan KH, Park S, Mendez-Lago M, Rossi F, Villasante A, Dimitri P, Karpen GH, Celniker SE (2007) Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science* 15:1625-1628.

Jantschitsch C, Trautinger F (2003). Heat shock and UV-B-induced DNA damage and mutagenesis in skin. *Photochem Photobiol Sci* 2: 899–903

Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.

Kaneko T, Kibayashi K. (2012) Mild hypothermia facilitates the expression of cold-inducible RNA-binding protein and heat shock protein 70.1 in mouse brain. *Brain Res*. 1466:128-36.

- Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Minoda A, Riddle NC, Ernst J, Sabo PJ, Larschan E, Gorchakov AA, Gu T, Linder-Basso D, Plachetka A, Shanower G, Tolstorukov MY, Luquette LJ, Xi R, Jung YL, Park RW, Bishop EP, Canfield TK, Sandstrom R, Thurman RE, MacAlpine DM, Stamatoyannopoulos JA, Kellis M, Elgin SC, Kuroda MI, Pirrotta V, Karpen GH, Park PJ. (2011) Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 471(7339):480-5.
- Keyl, H.-G., Pelling, C.: (1963) Differentielle DNS-Replikation in den Speicheldrüsen-Chromosomen von *Chironomus thummi*. *Chromosoma (Berl.)* 14, 347–359
- Koltzoff N. (1934) The structure of the chromosomes in the salivary glands of *Drosophila*. *Science*. 80:312-3.
- Kutsenko A, Svensson T, Nystedt B, Lundeberg J, Björk P, Sonnhhammer E, Giacomello S, Visa N, Wieslander L (2014) The *Chironomus tentans* genome sequence and the organization of the Balbiani ring genes. *BMC Genomics*. 2014 Sep 27;15(1):819
- Lezzi M, Meyer B, Mähr (1981) Heat shock phenomena in *Chironomus*. I. In vivo effects of heat, overheat on puffing and their reversal. *Chromosoma* 90: 198-203
- Lezzi M (1984) Heat shock phenomena in *Chironomus*. II. In vivo effects of heat, overheat and quenching on salivary chromosome puffing. *Chromosoma* 834: 327-329
- Lezzi M, Gatzka F, Meyer B (1984) Heat shock phenomena in *Chironomus*. III. Quantitative autoradiographic studies on ³H-uridine incorporation into Balbiani ring 2 and heat shock puff IV-5C. *Chromosoma* 90: 204-210
- Li Z, Wang Q, Wang ZP, Cui C (2010) [Effect of epidural block combined with general anesthesia on c-fos and HSP70 expression in the myocardium of spontaneous hypertensive rats]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 30(11):2492-4.
- Lima de Faria A, Jaworska H (1968) Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature* 217:138-142.
- Liu Y, Taverna SD, Muratore TL, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD. (2007) RNAi-dependent H3K27 methylation is required for heterochromatin formation and DNA elimination in *Tetrahymena*. *Genes Dev* 21: 1530-1545.

Madalena CRG, Gorab E (2005) A chromosome end satellite of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae) resembling nematoceran telomeric repeats. *Insect Mol Biol* 14: 255-262

Madalena CRG, Fernandes T, Villasante A, Gorab E (2010a) Curiously composite structures of a retrotransposon and a complex repeat associated with chromosome ends of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). *Chromosome Res* 18: 587-598

Madalena CRG, Amabis JM, Gorab E (2010b) Unusually short tandem repeats appear to reach chromosome ends of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). *Chromosoma* 119: 613-623

Madalena CR, Díez JL, Gorab E (2012) Chromatin structure of ribosomal RNA genes in dipterans and its relationship to the location of nucleolar organizers. *PLoS One* 7(8):e44006

Martin C, Zhang Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(11):838-49.

McClintock B (1938) The fusion of broken chromosomes ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. *Missouri Experiment Station Research Bulletin* 290: 1-48.

Mechelke F (1953) [Reversible structural modifications of the chromosomes in salivary glands of *Acricotopus lucidus*]. *Chromosoma.* 5(6-7):511-43.

Mok EH, Smith HS, DiBartolomeis SM, Kerrebrock AW, Rothschild LJ, Lange TS, Gerbi SA (2001) Maintenance of the DNA puff state is independent of active replication and transcription. *Chromosoma* 110: 186-196

Morcillo G, Díez JL, Botella LM (1994) Heat shock activation of telomeric sequences in different tissues of *Chironomus thummi*. *Exp Cell Res* 211: 163-167

Morimoto R, Tissieres A, Georgopoulos CP (1990). *Stress Proteins. Em: Biology and Medicine*, Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, eds. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory

Nightingale KP, O'Neill LP, Turner BM. (2006) Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* 16:125-136.

Painter TS (1933). A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science*. 78:585-6

Pavan C, Breuer ME (1952) Polytene chromosomes in different tissues of *Rhynchosciara*. *J Heredity* 43:150-157.

Pelling C (1964) [Ribonucleic acid synthesis in giant chromosomes. Autoradiographic investigations on *Chironomus tentans*]. *Chromosoma*. 15:71-122.

Pimpinelli S, Bonnacorsi, Gatti M, Sandler L. (1986) The peculiar genetic organisation of *Drosophila* heterochromatin. *Trends Genet* 2: 17-20.

Plaut W (1963). On the replicative organization of DNA in the polytene chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol*. 7:632-5.

Poulson DF, Metz, CW (1938) Studies on the structure of nucleolus-forming regions and related structures in the giant salivary gland chromosomes of Diptera. *J. Morph.* 63, 363

Richter K, Haslbeck M, Buchner J (2010) The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol Cell* 40: 253-266

Riddle NC, Minoda A, Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Tolstorukov MY, Gorchakov AA, Jaffe JD, Kennedy C, Linder-Basso D, Peach SE, Shanower G, Zheng H, Kuroda MI, Pirrotta V, Park PJ, Elgin SC, Karpen GH. (2011) Plasticity in patterns of histone modifications and chromosomal proteins in *Drosophila* heterochromatin. *Genome Res*. 21(2):147-63

Ringrose L, Paro R (2004) Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet*. 38:413-43

Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by heat-shock and DNA in *Drosophila*. *Experientia* 1: 571-573

Rossato RM, Madalena CRG, Gorab E (2007) Unusually short tandem repeats in the chromosome end structure of *Rhynchosciara* (Diptera: Nematocera). *Genetica* 131: 109-116

Ruiz MF, Goday C, González P, Sánchez L (2003) Molecular analysis and developmental expression of the Sex-lethal gene of *Sciara ocellaris* (Diptera order, Nematocera suborder). *Gene Expr Patterns* 3: 341–346

Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell*. 25(1):15-30.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Sass H (1995) Transcription of heat shock gene loci versus non-heat shock loci in *Chironomus* polytene chromosomes: evidence for heat-induced formation of novel putative ribonucleoprotein particles (hnRNPs) in the major heat shock puffs. *Chromosoma* 103: 528-538

Serna E, Gorab E, Ruiz MF, Goday C, Eirin-Lopez JM, Sanchez L (2004) The gene Sex-lethal of the Sciaridae Family (Order Diptera, Suborder Nematocera) and its phylogeny in dipteran insects. *Genetics* 168: 907-921

Slizynski BM.(1950) *Chironomus* versus *Drosophila*. *J Genet*. 50(1):77-8.

Smith CD, Shy S, Mungall CJ, Karpen GH (2007) The release 5.1 annotation of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science* 316:1586-1591.

Stocker AJ, Gorab E, Amabis JM, Lara FJ (1993) A molecular cytogenetic comparison between *Rhynchosciara americana* and *Rhynchosciara hollaenderi* (Diptera: Sciaridae). *Genome*. 36(5):831-43

Stocker AJ, Madalena CRG, Gorab E (2006) The effects of temperature shock on transcription and replication in *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). *Genetica* 126: 277-290

Stollar BD (1970) Double helical polynucleotides: immunochemical recognition of conformations. *Science* 169: 609-611

Tanaka Y, Takase M, Gamo S (2007) Relationship between general anesthesia and memory in *Drosophila* involving the cAMP/PKA pathways and adhesion-related molecules. *Curr Med Chem*14: 1479-1488

Telenius H, Carter NB, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BAJ, Tunnacliff A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-725

Turner BM (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-291

Udelsman R, Blake MJ, Holbrook NJ. (1991) Molecular response to surgical stress: specific and simultaneous heat shock protein induction in the adrenal cortex, aorta, and vena cava. *Surgery*. 110(6):1125-31.

van Bemmelen JG, Filion GJ, Rosado A, Talhout W, de Haas M, van Welsem T, van Leeuwen F, van Steensel B (2013) A network model of the molecular organization of chromatin in *Drosophila*. *Mol Cell*. 49(4):759-71.