JULYANE BATISTA CHAVES

CARACTERIZAÇÃO DOS CICLOS REPLICATIVOS NAS CÉLULAS FOLICULARES E NUTRIDORAS NO OVÁRIO DE RHYNCHOSCIARA AMERICANA E PERFIL DE EXPRESSÃO DE CICLINAS A E B

> SÃO PAULO 2017

JULYANE BATISTA CHAVES

CARACTERIZAÇÃO DOS CICLOS REPLICATIVOS NAS CÉLULAS FOLICULARES E NUTRIDORAS NO OVÁRIO DE *RHYNCHOSCIARA AMERICANA* E PERFIL DE EXPRESSÃO DE CICLINAS A E B

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO 2017

JULYANE BATISTA CHAVES

CARACTERIZAÇÃO DOS CICLOS REPLICATIVOS NAS CÉLULAS FOLICULARES E NUTRIDORAS NO OVÁRIO DE *RHYNCHOSCIARA AMERICANA* E PERFIL DE EXPRESSÃO DE CICLINAS A E B

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli

Versão Original

SÃO PAULO 2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Chaves, Julyane Batista Caracterização dos ciclos replicativos nas células foliculares e nutridoras no ovário de Rhynchosciara americana e perfil de expressão de ciclinas A e B / Julyane Batista Chaves; orientadora Gláucia Maria Machado Santelli. -- São Paulo, 2017. 84 p. Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Ciclinas. 2. Endoreplicação. 3. Célula nutridora. 4. Ovário. 5. Rhynchosciara americana. I. Machado Santelli, Gláucia Maria, orientador. II. Titulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Julyane Batista Chaves

Título da Dissertação:	Caracterização dos ciclos replicativos nas células foliculares e nutridoras no ovário de <i>Rhynchosciara americana</i> e perfil de expressão de ciclinas A e B

Orientador: Profa Dra Gláucia Maria Machado Santelli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a, considerou a candidata:

() Aprovada	() Reprovada
Examinador(a):	Assinatura Nome: Instituição:	:	
Examinador(a):	Assinatura Nome: Instituição:	:	
Examinador(a):	Assinatura Nome: Instituição:	:	
Presidente:	Assinatura Nome: Instituição	::	



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butarrá, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - 3CB III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 748/15 referente ao projeto intitulado: "*Caracterização dos ciclos reprodutivos nas células foliculares e nutridoras no ovário de Rhynchosciara americana e perfil de expressão de ciclinas A e B*" sob a responsabilidade de Julyane Batista Chaves, e orientação da Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli, foi analisado pela CEUA -COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 18 de junho de 2015.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M. A ZANOTTO Coordenador da CEPSH - ICB/USP

Dedico este trabalho para meus amados pais JURANDYR E CIRÇA Por tudo que viveram comigo e por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CHEFA - DRA GLÁUCIA MACHADO SANTELLI, pela orientação, por todos os ensinamentos e confiança; por me permitir iniciar e concluir este trabalho, minha eterna gratidão a quem tenho carinho e admiração.

À DRA PAULA REZENDE TEIXEIRA, pelo acompanhamento do trabalho e por ter sido a minha inesgotável fonte de ajuda, suas críticas e sugestões foram essenciais.

Aos amigos do LABORATÓRIO BIOCEM, pelos momentos de descontração e diminuição das angústias, pelos momentos compartilhados e nos esforços comuns a todos para a concretização dos nossos objetivos.

Em especial,

Ao JORGE HENRIQUE NEVES, serei eternamente grata pela sua gentileza e ajuda em um dos momentos mais difíceis.

Ao MARCELO MEDINA, por me ajudar a honrar o laboratório com belas imagens.

À BEATRIZ FUMELLI, pelo auxílio, por acompanhar com entusiasmo a minha teimosia em buscar mais resultados e por compreender a minha exigência; sua ajuda foi muito importante.

À LAÍS FUKASE, por toda ajuda e boas risadas.

Ao DR ADAM ARAI, obrigada pela sua amizade e pelos ouvidos sempre disponíveis; por dizer-me não somente o que gostaria de ouvir, mas principalmente o que preciso.

E a MARLENE, pela amizade, confidências e pelos momentos de descontração.

Agradeço à DRA DÉBORA REGINA MACHADO, por ter sido minha orientadora na graduação, por ter enxergado potencial em mim e por ter sido a minha maior incentivadora para ingressar no mestrado. Eu não teria iniciado esta jornada sem seu incentivo.

À GABRIELA LUSTOSA, pela amizade, ajuda e incentivo desde o princípio.

Ao meu pai JURANDYR, és o meu melhor exemplo, obrigada por ser uma força da natureza, capaz de remover montanhas e rios do meu caminho.

À minha mãe CIRÇA, deixou seus sonhos para que eu sonhasse, obrigada por me ensinar a perseguir meus sonhos e me ajudar a seguir o caminho para alcançá-los.

Ao meu irmão JUCA, pelo apoio em todos os momentos em que precisei e por tornar meus dias mais divertidos e felizes.

Ao MAIKO, por me contagiar com sua positividade, por acreditar mais em mim do que eu mesma e por ser a minha metade.

À minha cunhada PRISCILA SERAVALLI, pelo incentivo e encorajamento ao longo desta jornada, e por vibrar comigo a cada conquista.

À equipe da BIBLIOTECA DO ICB, em especial à TEREZA, por toda sua gentileza, por estar sempre disponível e por toda dedicação e perfeição no seu trabalho, garantindo a legalidade dos nossos trabalhos.

Enfim, à Deus, por sempre me amparar com suas mãos e me permitir viver mais esta jornada.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2015\03389-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo 310908\2013-2) pelo financiamento dos projetos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – BioCeM, e à fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio financeiro concedido em forma de bolsa para a realização deste mestrado.

A lei da mente é implacável. O que você pensa, você cria; O que você sente, você atrai; O que você acredita, torna-se realidade. **BUDA**

RESUMO

Chaves JB. Caracterização dos ciclos replicativos nas células foliculares e nutridoras no ovário de *Rhynchosciara americana* e perfil de expressão de ciclinas A e B. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O estudo do díptero Rhynchosciara americana forneceu informações importantes sobre a biologia cromossômica, por apresentar cromossomos politênicos e amplificação gênica em diferentes órgãos. Dentre os órgãos que apresentam especializações do ciclo celular, o ovário é um dos mais interessantes, possuindo características únicas, como o desenvolvimento sincrônico dos folículos ovarianos e o fato de apresentar uma única e gigante célula nutridora conectada ao ovócito através de um canal citoplasmático. Une em si: meiose no ovócito, célula nutridora com poliploidia seguido de politenia e células foliculares com mitose. Células poliplóides e politênicas possuem cópias extras de DNA genômico através de repetidos ciclos de fase S sem que ocorra a divisão celular, um processo denominado endoreplicação. Os ciclos celulares, são dirigidos pela oscilação da ativação de complexos ciclina/Cdk. Estudos mostraram que a ciclina A atua em células endoreplicativas em Drosophila e a ciclina B inibe ciclos endoreplicativos induzindo a divisão celular. Torna-se relevante investigar a associação dessas moléculas reguladoras do ciclo celular com os ciclos endoreplicativos que ocorrem na ovogênese de R. americana. Perfis de expressão das ciclinas A e B foram detectados nos ovários por RT-PCR ao longo do desenvolvimento. Ensaios de incorporação do nucleosídeo timidina mostraram elevada atividade proliferativa das células foliculares para formar o folículo e o fim da atividade endoreplicativa nas células nutridoras em pupas de 4 dias. Preparações de imunolocalização proteica em ovários na fase de pupa revelaram acúmulo de ciclina A no citoplasma das células nutridoras e dos ovócitos, e acúmulo de ciclina B no citoplasma e na vesícula germinal do ovócito, atuando nos mecanismos meióticos. O estudo de proteínas relacionadas ao ciclo celular nesse modelo é importante para um melhor entendimento dos ciclos celulares incomuns presentes em diferentes órgãos de insetos.

Palavras-chave: Ciclinas. Endoreplicação. Ovário. Célula nutridora. *Rhynchosciara americana*

ABSTRACT

Chaves JB. Characterization of replicative cycles in follicle and nurse cells in ovary of Rhynchosciara americana and expression profile of cyclins A and B. [Master thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Study of the diptera Rhynchosciara americana has provided important information about chromosome biology, for it displays polytene chromosomes and gene amplification in different organs. Among the organs that possess cell cycle specializations, the ovary is one of the most interesting ones, showing unique characteristics, such as the synchronous development of follicles and the presence of a single giant nurse cell connected to the oocyte through a cytoplasmic channel. This organ gathers: meiosis in the oocyte, nurse cell with polyploidy followed by polyteny, and follicle cells in mitosis. Polyploid and polytene cells have extra copies of genomic DNA obtained via sequential cycles of S phase not followed by cell division, a process called endoreplication. Cell cycles are driven by the oscilation in the activation of different cyclin/CDK complexes. Studies have shown that Cyclin A acts in endoreplicating cells in Drosophila and Cyclin B inhibits endoreplicative cycles, inducing cell division. Thus, it is relevant to investigate the association between these cell cycle-regulating proteins and the endoreplication cycles that occur during the oogenesis of *R. americana*. Expression profiles of cyclins A and B were evaluated in the ovary via RT-PCR throughout the development. Thymidine nucleoside incorporation assays showed high proliferative activity in follicle cells to build the follicle and the end of endoreplicative activity in nurse cells of 4-day-old pupae. Protein immunolocalization in ovary at the stage of pupa has shown accumulation of Cyclin A in the cytoplasm of nurse cells and oocytes, and accumulation of Cyclin B in the cytoplasm and germinal vesicle of the oocyte, acting on meiosis mechanisms. The study of proteins related to cell cycle in this model is important for a better understanding of uncommon cell cycle in different insect organ.

Keywords: Cyclins. Endoreplication. Ovary. Nurse cell. Rhynchosciara americana

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Dipteros como um modelo	15
1.2 Rhynchosciara americanaŕ	16
1.3 Ciclo de vida	16
1.4 Cromossomos politênicos e Glândula salivar	18
1.5 Ovário	23
1.6 Endoreplicação	25
1.7 Ciclinas	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Animais	34
3.2 Dissecação dos órgãos	34
3.3 Lâminas de cromossomos politênicos	35
3.4 Ensaio de replicação de DNA	35
3.5 Imunolocalização proteica	36
3.6 Reconstrução tridimensional	37
3.7 Extração de RNA total dos ovários	38
3.8 PCR convencional	39
3.9 Síntese de cDNA – reação de transcriptase reversa (RT)	40
3.10 Expressão gênica – reação de polimerase em cadeia em tempo real	40
3.11 Extração de DNA genômico dos ovários	41
3.12 Transformação por choque térmico e isolamento de colônia bacteriana	42
3.13 Extração de DNA plasmidial	43
3.14 Sequenciamento	44
3.15 Análise	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Morfologia geral do folículo	46
4.2 Atividade replicativa	50
4.3 Perfis de expressão gênica	55
4.4 Imunolocalização de ciclinas A e B	58

4.5 Reconstrução Tridimensional	64
4.6 Caracterização molecular das ciclinas	67
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIPTEROS COMO UM MODELO

Os insetos constituem um excelente material para o estudo da fisiologia e genética, por possuírem grande diversidade durante seu desenvolvimento (Zhimulev et al., 2004).

Uma grande variedade de órgãos e linhagens celulares de insetos têm sido importantes modelos de pesquisa, a maioria dos quais representa espécies da ordem Lepdoptera e Diptera. Os órgãos de insetos utilizados com sucesso em estudos científicos incluem: ovário, embrião, glândula salivar, corpo gorduroso, disco imaginal, sistema endócrino e nervoso, epitélio intestinal e cuticular, e neonato (Lynn, 2001).

Entre os insetos, os dípteros têm sido mais estudados e forneceram informações importantes sobre processos biológicos, como a organização nuclear, biologia cromossômica, amplificação gênica e transcrição de genes amplificados, determinação do sexo, imunidade a insetos, manutenção de telômeros, ovogênese e desenvolvimento embrionário, remodelação de tecidos, morte celular programada e identificação de fatores que são necessários para estabilizar e manter células-tronco (Morrison, Spradling 2008; Brandão et al., 2014; Simon et al., 2016).

Em particular, a espécie *Rhynchosciara americana* apresenta peculiaridades que lhes renderam notoriedade, como o fato de apresentarem em diferentes tecidos cromossomos politênicos maiores do que os encontrados em outros dípteros, ter sido o primeiro organismo em que foi evidenciado o fenômeno de amplificação gênica em determinados períodos do desenvolvimento dando origem aos pufes de DNA, apresentar uma associação mais evidente entre a biologia morfológica e molecular, e apresentar desenvolvimento sincronizado entre indivíduos irmãos (Breuer, Pavan, 1955; Guevara, Basile, 1973; Machado-Santelli, Basile, 1975).

1.2 RHYNCHOSCIARA AMERICANA

R. americana pertence à família *Sciaridae* e foi descrita pela primeira vez em 1821, por Christian Wiedemann (Wiedemann, 1821¹ apud Breuer, 1969). Em 1951, Nonato e Pavan descreveram a mesma espécie como *Rhynchosciara angelae* (Nonato, Pavan, 1951). Somente em 1969, a classificação do gênero *Rhynchosciara* foi revisada por Martha Breuer e mostrou sinonímia entre as espécies *R. americana* e *R. angelae*, prevalecendo então a nomenclatura mais antiga dada por Wiedemann (Breuer, 1969).

1.3 CICLO DE VIDA

R. americana apresenta um ciclo de vida em torno de 70 dias e seu desenvolvimento holometábolo é sincrônico entre os indivíduos irmãos, desde a postura dos ovos, passando pela metamorfose na fase de pupa até a emersão dos adultos (Figura 1). E em cada grupo, todos os indivíduos irmãos estão no mesmo estágio do desenvolvimento e são todos do mesmo sexo (Pavan, Da Cunha, 1969).

A fêmea copula somente uma vez e faz uma única ovoposição de centenas de ovos, que após cerca de treze dias eclodem larvas simultaneamente.

O desenvolvimento larval ocupa grande parte da vida do inseto, sendo dividido em quatro estágios, e dos quatro estágios do ciclo de vida larval, o quarto (último estágio) é o mais longo, sendo subdividido em seis períodos, de acordo com modificações fisiológicas e comportamentais da larva (Terra et al., 1973).

No primeiro período, as larvas são pequenas e apresentam uma coloração clara. No segundo período, as crescem e adquirem uma coloração vermelha, devido ao aparecimento da pigmentação da hemolinfa - nesses dois primeiros períodos as larvas rastejam e se alimentam ativamente. No terceiro período, as larvas são menos ativas, elas param de se alimentar e começam a secretar proteínas do casulo comunal, formando uma tênue rede delicada que progressivamente torna-se mais compacta que recobre todos os indivíduos (razão pela qual também chamamos esse período de início de rede). No quarto período, nota se modificação do casulo, que apresenta uma consistência mais firme, porém ainda maleável e as larvas estão quietas em posição curva - esse período é caracterizado pelo início da amplificação do pufe de DNA na região 2 do cromossomo B (pufe B2) da glândula salivar. Já no

¹ Wiedemann CRM. Diptera exótica, 1821.

quinto período, há a expansão máxima do pufe B e início da expansão do pufe de DNA na região 3 do cromossomo C (pufe C3) da glândula salivar. E no sexto período, há a expansão máxima do pufe C3, e as larvas estão individualizadas em celas na posição ereta no casulo comunal, que apresenta uma consistência rígida. Os períodos da construção do casulo comunal são bem definidos e também podem ser correlacionados com mudanças na morfologia das larvas (Pavan, Da Cunha, 1969; Terra et al., 1973).

No início da fase de pupa, os indivíduos permanecem imóveis no casulo e iniciam alterações morfológicas durante a metamorfose, tais como a histólise completa da glândula salivar e remodelação do corpo gorduroso através do processo de autofagia (Brandão et al., 2014). Após um período de 8 a 10 dias de metamorfose, as moscas emergem do casulo comunal sexualmente maduras, elas apresentam probóscide, um aparelho bucal sugador e se alimentam de soluções açucaradas. O seu tempo de vida dura em média, somente cinco dias.



Figura 1- Ciclo de vida da *R. americana*, da postura dos ovos até a fase de mosca. A fase larval é dividida em 4 estágios e o 4º estágio é subdividido em 6 períodos. No 1º e 2º período as larvas são errantes e se alimentam. O 3º período caracteriza-se pelo início de rede, quando se inicia a secreção do casulo. O 4º e 5º período são marcados pela presença dos pufes B2 e C3. E o 6º período as larvas estão individualizadas no casulo e tornam-se pupa. Em seguida, a pupa metamorfoseia em mosca adulta. Fonte: Neves, 2016.

1.4 CROMOSSOMOS POLITÊNICOS E GLÂNDULA SALIVAR

Os cromossomos politênicos foram descritos pela primeira vez por Balbiani em 1881 nas células de glândulas salivares de larvas de uma espécie de díptero, o *Chironomus plumosus,* como um cordão contínuo espiralado que preenchia o núcleo (Bauer, Beermann, 1952). Em 1993, grupos de pesquisadores, usando o método *"squashing*", evidenciaram sua estrutura multifilamentosa, o que originou a denominação de cromossomos politênicos (Zhimulev et al., 2004).

Estudos de dípteros tiveram importante contribuição no desenvolvimento da citogenética, depois da publicação de trabalhos descrevendo os cromossomos politênicos das glândulas salivares de larvas *de Bibio, Chironomus, Drosophila* e *Rhynchosciara*. Esses cromossomos eram pelo menos 100 vezes maiores do que os cromossomos metafásicos e tornaram-se um dos mais importantes modelos para a investigação genética (Stormo, Fox, 2017).

Cromossomos politênicos são cromossomos longos e largos, permanecendo intimamente pareados com seu homólogo, com pouca ou nenhuma separação visível entre as cromátides e apresentam um padrão intercalado de bandas e interbandas específico para cada cromossomo da espécie (Lefevre, 1971).

São formados por meio de um processo chamado endociclo e ocorrem em células que sofrem replicações sucessivas do genoma, alternando as fases G e S do ciclo celular e suprindo a divisão mitótica. As múltiplas cópias das cromátides permanecem unidas, formando assim os cromossomos politênicos, que se comportam como um só elemento (Calvi et al., 2013).

Em *R. americana* os cromossomos politênicos são encontrados em diferentes órgãos, como nas glândulas salivares, túbulos de Malpighi, intestino, vesícula seminal e ovários, e o padrão de bandeamento permanece igual em quase todos os tecidos permitindo estudos comparativos (Dreyfus et al., 1951; Pavan, Breuer, 1952; Guevara, Basile, 1973).

As glândulas salivares apresentam os cromossomos politênicos maiores, menos compactados e atingem o máximo tamanho durante o sexto período larval, permitindo uma análise mais aprofundada e por isso, foram mais amplamente estudados (Pavan, 1965). A dimensão dos cromossomos politênicos nesta espécie, proporciona condições extremamente favoráveis para uma análise morfológica e citológica de qualidade, o que levou a descobertas importantes sobre ativação de genes (Fiq, Pavan, 1957).

A glândula salivar de *R. americana* é um órgão de grandes proporções na larva, podendo atingir uma vez e meia o seu comprimento. Ela é ligada à parte inicial do tubo digestivo por ductos salivares e pode-se distinguir morfologicamente e citologicamente em três regiões: proximal ou S1, mediana ou S2 e a distal ou S3 (Figura 2), contendo respectivamente cerca de 50, 200 e 60 células (Dreyfus et al., 1951; Pavan, 1965). Essas regiões podem ser facilmente distintas uma das outras pela distribuição das células: em S1, as células são grandes e cuboides, e estão alinhadas paralelamente com um lúmen regular no centro da glândula; em S2 as células são menores e não estão alinhadas, e o lúmen é irregular; e S3 as células estão distribuídas alternadamente (Brandão et al., 2014).



Figura 2- Glândula salivar de *R. americana* corada com orceína acética. Notar as divisões da glândula em três secções, delimitadas pela organização das células. Fonte: Machado-Santelli, 2011.

Nessas células pode-se observar além da politenização dos cromossomos, o processo de amplificação gênica, em que algumas bandas cromossômicas específicas são excessivamente replicadas. O momento em que as larvas começam a secretar o casulo coincide com o último ciclo de replicação, que corresponde à fase de grande atividade gênica na glândula salivar como pode ser observado pelo

aumento de determinadas bandas, originando os pufes de DNA nos seus cromossomos. (Breuer, Pavan, 1955; Guevara, Basile, 1973).

Além dos pufes de RNA, ou de expressão, que ocorrem normalmente em cromossomos politênicos, observa-se em *R. americana* os chamados pufes de DNA, em que há síntese localizada de DNA e transcrição dessas regiões genômicas. E pela primeira vez evidenciou-se que o conteúdo genômico de uma célula poderia ser modificada naturalmente em determinados períodos do desenvolvimento dessa espécie (Breuer, Pavan, 1955; Pavan, 1965).

Essa síntese extra de DNA pode ser interpretada como uma adaptação para a produção de mais genes no local onde uma abundante síntese de RNA é requerida (Pavan, Da Cunha, 1969).

Durante o período de construção do casulo notam-se amplificação e expansão dos pufes de DNA descritos em *R. americana*, os pufes da região 2 do cromossomo B (B2), da região 3 do cromossomo C (C3) e da região 8 do cromossomo (C8) e relacionam-se esses pufes a genes codificantes de peptídeos estruturais secretados para a construção do casulo comunal, importante para uma metamorfose bem-sucedida (Winter et al., 1977; Penalva et al., 1997; Santelli et al., 2004). Ver figura 3 e 4.

Stocker e Pavan (1974), descreveram que o hormônio ecdisona é responsável por alterações nos padrões de amplificação dos pufes A ocorrência da amplificação gênica que formam os pufes de DNA, coincide com as mudanças morfológicas no casulo comunal, alterando-o de uma tênue rede delicada a uma estrutura rígida. Essas alterações são reguladas de acordo com concentrações do hormônio ecdisona, portanto, são regulados ao longo do desenvolvimento (Stocker et al., 1984).

É interessante notar que o desenvolvimento dessa espécie é acompanhado por características morfológicas e citológicas, e a glândula salivar é usada como parâmetro para a confirmação dos eventos, usando a progressão e regressão dos pufes de DNA B2 e C3 que ocorrem em momentos específicos do desenvolvimento larval, como marcadores desse desenvolvimento (Machado-Santelli, Basile, 1978).



Figura 3 – Os 4 cromossomos politênicos de *R. americana* (A, B, C e X), com as suas respectivas secções. A diferenciação entre os cromossomos é feita analisando o padrão de bandeamento, características das extremidades e padrão de abertura dos pufes. Fonte: Stocker et al., 1993.



Figura 4 – Fotomicrografia dos 4 cromossomos politênicos de *R. americana* (A, B, C e X) corados com orceína acética. Notar a presença dos pufes de DNA. No cromossomo B a presença do pufe B2 e no cromossomo C, o pufe C3. Fonte: Chaves, 2017.

1.5 OVÁRIOS

Durante o desenvolvimento ovariano de *R. americana*, células germinativas primordiais diferenciam-se em células-tronco germinativas e após algumas divisões mitóticas tornam-se células germinativas (Rezende-Teixeira et al., 2012).

O último ciclo mitótico de células germinativas ocorre no início da vida larval dando origem a duas células com destinos diferentes, que se mantém ligadas, mas se diferenciam: uma torna-se o ovócito I, que entra em meiose e permanece estacionado em prófase I, na subfase zigóteno, com quase nenhuma atividade transcricional; enquanto a outra irá se diferenciar em célula nutridora (Basile, 1979).

A célula nutridora sofre vários ciclos de poliploidização, em que há um aumento expressivo em seu volume, e após o termino deste processo seus cromossomos sofrem o processo de politenia, passando a ser politênicos a partir do estágio de pupa intermediaria (Figura 5). Durante este processo, o potencial transcricional da célula nutridora é aumentado e promove intensa síntese de ácidos nucleicos que contribuem para a homeostasia da célula (Casartelli, 1971; Basile, 1979).

Células foliculares primordiais inicialmente localizam-se na base de cada ovariolo, junto ao ovócito. Posteriormente, elas sofrem consecutivas mitoses e recobrem toda a superfície do conjunto "nutridora\ovócito", formando o folículo (Basile, 1969).

Como o ovócito está praticamente inativo transcricionalmente, por estar parado em meiose, a célula nutridora assume funções, como síntese do vitelo, enriquecendo o citoplasma do ovócito com seu RNA mensageiro (Basile, 1979).

Existe comunicação entre elas, interligando estas duas células, através de um canal citoplasmático – *ring canal* - devendo contribuir para a transferência de material, entre célula nutridora e ovócito (Machado-Santelli, Santelli, 2000).

O tamanho do ovário aumenta rapidamente no estágio intermediário de pupa até o fim da pupação, e depois do aparecimento de cromossomos politênicos na célula nutridora. Neste estágio, o tamanho da célula nutridora aumenta pouquíssimo; a partir de então, pode-se verificar muitos grânulos de vitelo no citoplasma do ovócito. O ovário de uma mosca adulta ocupa aproximadamente 80% do volume de seu abdômen (Basile, 1969).



Figura 5 - Esquema da relação do tamanho entre células nutridora (NC) e ovócito (Oo) durante o desenvolvimento ovariano de *R. americana*. Os tamanhos são dados em micrômetros e correspondem ao valor médio da medição de 10 células durante cada fase (1 a 5). Notar o intenso crescimento do folículo após a fase de pupa intermediária, em que há o início da politenia nas células nutridoras (NC). Fonte: Basile, 1979.

Dentre os tecidos que apresentam especializações de ciclo celular, o ovário é um dos mais interessantes, pois reúne em si diferentes cenários: meiose no ovócito, célula nutridora com poliploidia e politenia; e células foliculares com mitose. Deste modo, um mesmo tecido apresenta todas as condições de ciclo celular comuns entre os sciarídeos, tornando-o um valioso objeto de estudo.

1.6 ENDOREPLICAÇÃO

O aumento da quantidade de DNA é uma estratégia usada durante o desenvolvimento tanto em plantas como em animais e bactérias. É obtido através de uma variação do ciclo celular - processo denominado endoreplicação, que resulta em células com cópias extras de DNA por meio de repetidos ciclos replicativos, resultando em poliploidia, politenia ou amplificação (Fox, Duronio, 2013).

Esse processo consiste em um desvio do ciclo celular canônico, com reinício da replicação do DNA mais de uma vez por ciclo celular. São períodos alternados de fase S (Síntese), durante a qual, a replicação do DNA acontece, e de fase G (*Gap*), quando as células estão metabolicamente ativas e se preparam para a próxima rodada de fase S, não completando ou até mesmo não iniciando a mitose, o que promove o acúmulo de DNA na célula (Edgar, Orr-Weaver, 2001).

As duas principais formas de endoreplicação foram descritas como Células endomitoses е endociclos. endomitoses em executam algumas características de mitoses, em que as células iniciam a mitose, promovendo a separação das cromátides-irmãs - gerando células poliplóides com alteração numérica cromossômica, em que o conteúdo genômico é múltiplo de N, mas as células não se dividem, seguido por subsequente reentrada na fase S. Células em endociclos não apresentam quaisquer características de mitose, mantendo as cromátides-irmãs firmemente pareadas - gerando células politênicas, em que o número de cópias do DNA aumenta sem aumentar o número de cromossomos propriamente (Calvi, 2013; Zielke et al., 2013). A figura 6 resume esses processos.



Figura 6- Ciclo celular e variações do ciclo celular. **(A)** O ciclo de divisão celular consiste em quatro fases distintas. O DNA é replicado durante a fase S e segregado para as células filhas durante a fase M. **(B)** A Endoreplicação pode ocorrer tanto por Endomitose, as células passam por G₁, S e G₂ com mitose parcial sem que ocorra citocinese, ou por Endociclo, em que ocorrem períodos alternados de fases G e S, sem que ocorra a divisão celular. Fonte: Adaptado de Fox, Duronio, 2013.

Além dos ciclos endoreplicativos, outra variante comum do ciclo celular ocorre em ciclos celulares embrionários, que são frequentemente muito rápidos e uma ou ambas as fases G podem ser ignoradas, ocorrendo períodos alternados de fase S e fase M (Edgar, Lehner, 1996).

Alguns tipos celulares de eucariotos promovem ciclos endoreplicativos em seu desenvolvimento normal, como por exemplo, nos mamíferos, os megacariócitos executam endomitoses, atingindo ploidia de até 128C, durante o processo de produção de plaquetas (Ravid et al., 2002). Os trofoblastos gigantes de mamíferos são encontrados na placenta, exploram seu tamanho para formar uma barreira entre os tecidos materno e embrionário, tornam-se altamente poliploides atingindo 512C e até 1000C *in vivo* (Barlow, Sherman, 1974; Lee et al., 2009). Em insetos, membros da ordem diptera, como a *Drosophila* e a *Rhynchosciara*, apresentam politenia na maioria dos tecidos, e poliploidia em alguns (Machado-Santelli, Santelli, 2000; Nordman e Orr-Weaver, 2012). E os níveis de ploidia de células diferenciadas de *Drosophila* variam de 16C para 1024C (Rodman, 1967). Graus variados de endociclos e endomitoses podem ocorrer no mesmo tecido, como por exemplo, é visto no ovário de *Rhynchosciara* (Basile, 1979).

Esses processos são frequentemente encontrados em células que são constitutivamente grandes ou altamente ativas metabolicamente, e proporcionam um suporte a funções celulares específicas, como uma maior eficiência na atividade dos genes (Edgar e Orr-Weaver, 2001; Fox, Duronio, 2013).

Entretanto, devido ao rígido controle de replicação e divisão celular, o processo de endoreplicação costuma estar relacionado a condições anormais de proliferação celular, contribuindo para instabilidade genômica, estresse oxidativo, contextos patológicos, abortos e oncogênese (Davoli, De Lange, 2011).

Com relação da regulação da endoreplicação, uma das características mais interessantes, é que as mesmas proteínas reguladoras que conduzem um típico ciclo de divisão celular, são usadas para gerar a progressão e manutenção dos ciclos endoreplicativos. Deste modo, ao menos dois eventos importantes devem ocorrer para converter um ciclo mitótico em um ciclo endoreplicativo: (1) a divisão celular deve ser suprimida; e (2) a atividade dos complexos ciclina/Cdk devem continuar a oscilar entre níveis baixos e altos, para o material genético ser reduplicado na ausência de divisão celular (Fox, Duronio, 2013).

1.7 CICLINAS

A progressão do ciclo celular pelas fases G₁, S, G₂ e M está sob controle de um complexo ciclina/Cdk, que apresenta uma associação e ativação específica para cada fase do ciclo.

As Cdks ou ciclina-dependente quinase são heterodímeros de uma família de proteínas serina/treonina quinases, que consistem de uma subunidade catalítica desse complexo. Essas quinases dependem da associação da subunidade reguladora, as ciclinas, necessária para sua atividade, como efetuar a fosforilação de diversos fatores que vão ativar mecanismos envolvidos com a progressão e manutenção do ciclo celular (Murray, 2004).

A expressão de Cdks é constante, porém, a concentração de suas ciclinas regulatórias correspondentes oscilam durante o ciclo celular. O controle da entrada em diferentes fases do ciclo é determinado pelo acúmulo de complexos ciclina/Cdk respeitando a finalização das fases anteriores (Schafer, 1998).

No ciclo celular canônico, a sinalização em G_0 para início de G_1 está associada com a expressão das ciclinas D complexada com Cdk4 e a Cdk6. A entrada na fase S é determinada por ciclinaE/Cdk2, e progride sob o controle de complexos ciclina A/Cdk2, e a mitose é conduzida por Cdk1 e ciclinas mitóticas A e B (Murray, 2004).

A ativação dos complexos ciclinaD/Cdk4 e 6, promovem a transição de G₀, e as células iniciam a fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb) promovendo o avanço do ciclo celular. Em G1 tardio ocorre a ativação da Cdk2 pela ligação da ciclinas do tipo E. A ativação das Cdks de G1 inativa as proteínas Rb através da fosforilação, que por sua vez libera os fatores de transcrição E2F. Este promove a transcrição de genes que codificam proteínas que irão atuar na fase S, incluindo as ciclinas E e A. Posteriormente, a Cdk2 controla a entrada e progressão da fase S, em complexos com ciclina E e ciclina A, completando a fosforilação das proteínas Rb, e levando aumentos transcricionais de E2F. O desencadeamento e progressão da mitose depende das ciclinas A e B que ativam a Cdk1. O término da mitose requer a degradação das ciclinas mitóticas APC/C por (Anaphase promoting complex/cyclosome) via ubiquitinização e a ativação de proteínas Rb por fosfatases (Zielke et al., 2008; Song, Rape, 2011; Henley e Dick, 2012; Harashima et al., 2013).

As Cdks estão sujeitas a um controle negativo por proteínas inibidoras (CKI, *cyclin-dependent kinase inhibitors*), que se ligam nos complexos ciclina/Cdk e bloqueiam a atividade catalítica. São divididas em duas classes principais: INK4 (*inhibitor of kinase 4*) e a CIP/KIP (*Cdk interacting protein/kinase inhibitory protein*). Os membros da família CIP/KIP não são seletivos e podem bloquear qualquer Cdk. Enquanto os membros do INK4 ligam-se apenas em Cdk4 e Cdk6 associadas com ciclinas do tipo D (Henley, Dick, 2012).

A progressão do ciclo celular é também controlada por *checkpoints* ou pontos de checagem distintos, com a função de impedir a progressão do ciclo celular sem que as etapas anteriores sejam concluídas adequadamente. Os principais *checkpoints* estão na entrada da fase S (G1-S), na entrada da mitose (G2-M), e o *checkpoint* mitótico que controla a progressão da anáfase (Tyson, 1999).

Os checkpoints são fundamentais para a manutenção da integridade das células, em particular do seu genoma, assegurando que o material genético tenha sido duplicado de maneira correta e não contenha erros. São constituídos por sensores moleculares que efetuam a ativação de moléculas, geralmente proteínas quinases ou fatores de transcrição que determinam o bloqueio da progressão do ciclo celular pelo desencadeamento de sinais inibidores à progressão do ciclo celular, até que estes estejam reparados.

O primeiro *checkpoint* G₁/S verifica condições favoráveis para a divisão, como o tamanho da célula, nutrientes suficientes, sinais moleculares positivos, como fatores de crescimento e a integridade do DNA, podendo entrar em um estado quiescente (G₀) até obter sinais positivos para iniciar o ciclo celular. Em G₂/M, é conferido o término do processo de replicação e a integridade do conteúdo de DNA, podendo inibir a entrada em mitose e promover um retorno à fase S para restauração do DNA. Se o dano for irreparável, a célula pode sofrer apoptose ou morte celular programada, assegurando que o DNA danificado não seja repassado para as células filhas. O *checkpoint* mitótico detecta se houve ligação correta do fuso mitótico aos cinetócoros dos cromossomos e alinhamento cromossômico na placa metafásica, podendo bloquear a mitose na transição entre metáfase e anáfase (Elledge, 1996).

Células com com dano no DNA ou replicação incompleta são impedidas de iniciar a mitose, através da inativação da Cdk1 até o reparo ou o término da replicação. Caso os erros encontrados nos *checkpoint*s sejam irreparáveis, as células não

progridem no ciclo, sendo destinadas para apoptose, evitando assim a propagação de lesões ou ainda de DNA incompletamente replicado às células filhas (Murray, 2004).

Entretanto em ciclos endoreplicativos, as células parecem resistir alguns desses mecanismos de controle do ciclo celular sem serem direcionadas para a apoptose. Existem mecanismos responsáveis para garantir que o genoma seja replicado uma vez por ciclo celular (Elledge, 1996). Porém, de algum modo pouco esclarecido, as células endoreplicativas simplificaram a maquinaria de regulação do ciclo celular, sugerindo que o *checkpoint* que regula o número de cópias apropriado na célula, esteja inativo em células endoreplicativas (Lilly, Spradling, 1996).

Além disso, células endoreplicativas, são incapazes de induzir a apoptose, devido a incapacidade de expressar genes apoptóticos, que normalmente seriam expressos em células mitóticas após um efeito genotóxico sobre o material genético, sugerindo que promotores de genes apoptóticos estariam silenciados nessas células (Mehrotra et al., 2008).

Os ciclos endoreplicativos também estão sob controle de complexos ciclinas/Cdks. Em *Drosophila*, ciclina E/Cdk2 é o principal complexo necessário para entrada na fase S e progressão dos ciclos endoreplicativos. Foi mostrado que a oscilação da atividade de ciclina E/Cdk2 gera ciclos replicativos sucessivos, e que em mutantes sem ciclina E a síntese de DNA é bloqueada e não há ciclos endoreplicativos (Knoblich et al., 1994; Follette et al, 1998; Sallé et al., 2012). Similarmente, a remoção específica de Cdk2, bloqueia os endociclos em glândulas salivares e ovários (Zielke et al., 2013).

Em células endoreplicativas de *Drosophila*, foi constatada a participação de ciclina E/Cdk2 na amplificação dos genes coriônicos (Lilly, Spradling, 1996). A superexpressão da ciclina E induziu a replicação do DNA em células endoreplicativas e aumentou a ploidia dos megacariócitos de camundongos (Britton, Edgar, 1998; Eliades et al., 2010). Esses dados mostram que ciclina E\Cdk2 é essencial em moscas e mamíferos para a execução das fases S em ciclos endoreplicativos.

Embora por muito tempo tenha sido dado um grande enfoque à participação da ciclina E, até sido considerada a ciclina mais relevante para a progressão da endoreplicação, pois os ciclos endoreplicativos são regulados primariamente por uma oscilação do complexo ciclina E\Cdk2, necessária para um correto licenciamento das origens de replicação (Lilly, Duronio, 2005), estudos mostram que a ciclina E não é a única ciclina atuando em células endoreplicativas. Em *Drosophila,* a ciclina A forma complexo exclusivamente com Cdk1 e acreditava-se que esse complexo atuava exclusivamente na mitose (Knoblich et al., 1994). Entretanto, a expressão ectópica de ciclina A induz a transição G1/S em vários tipos de células (Sprenger et al., 1997), e sua superexpressão em discos imaginais de olhos induz fase S em fotorreceptores em diferenciação (Dong et al., 1997).

Sallé et al. (2012) demonstraram que embora a ciclina A não promova ciclos endoreplicativos, ela participa do controle da dinâmica da endoreplicação em células de linhagem de órgãos sensoriais e glândula salivar de *Drosophila*. Foi mostrado que a ciclina A é extremamente expressa e que seus níveis oscilam durante os ciclos endoreplicativos. Mais precisamente, a ciclina A acumula principalmente no citoplasma durante a fase S e está envolvida no controle do tempo da fase S, atuando na transição entre as fases S precoce e tardia, uma vez que a duração das fases S precoce e tardia é alterada quando há perda ou ganho de função de ciclina A, levando a uma redução na ploidia da célula, indicando que a ciclina A é necessária durante os ciclos replicativos para que as células atinjam ploidia final adequada. Por fim, foi demonstrado que a ciclina A pode regular o direcionamento da proteína ORC2, membro do complexo pré-RC, e assim modular a replicação da heterocromatina.

A progressão de ciclos endoreplicativos requer uma expressão dos principais reguladores do ciclo celular, como a ciclina E e ciclina A. Contudo a superexpressão da ciclina A pode desencadear a fase S, mesmo em um mutante sem ciclina E (Sprenger et al., 1997; Weiss et al., 1998).

Células podem inibir a mitose e desencadear a endoreplicação a partir de uma *downregulation* de ciclinas mitóticas, através da ativação do complexo APC/C, e da indução de inibidores de Cdks (CKIs) ao longo do ciclo (Lilly, Spradling, 1996; Zielke et al., 2008). A ciclina B inibe ciclos endoreplicativos promovendo a divisão celular. A eliminação do gene de ciclina B, é suficiente para que as células de leveduras sejam submetidas a sucessivas rodadas de replicação do DNA (Fisher, Nurse, 1995).

Estes dados, dentre outros, levantam o questionamento sobre a participação das ciclinas em certos tipos de células que executam normalmente variações no programa de replicação de DNA. Portanto, um foco importante surge em abordar a presença dos diferentes tipos de ciclinas, nos ciclos endoreplicativos que ocorrem durante o desenvolvimento ovariano, os quais geram poliploidia e politenia nas células nutridoras do ovário de *R. americana*.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo caracterizar os ciclos replicativos das células foliculares e nutridoras no ovário de *Rhynchosciara americana*, e correlacioná-los com a expressão das ciclinas A e B ao longo do seu desenvolvimento.

2.2 Objetivos específicos

- 1. Caracterizar os diferentes tipos celulares no ovário quanto a replicação de DNA.
- 2. Realizar a caracterização molecular da ciclina A e ciclina B.
- 3. Avaliar a expressão e localização proteica das ciclinas A e B no ovário.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

As larvas de *R. americana* foram coletadas na região de Ubatuba, estado de São Paulo, Brasil. Na natureza, as larvas são encontradas em locais úmidos e protegidos da luz, como na maioria das vezes, embaixo de folhas e inflorescência de bananeiras caídas, as quais fornecem o material necessário para sua alimentação e promovem umidade.

No laboratório, as larvas foram mantidas protegidas da luz e sob condições de umidade e temperatura controladas (22 °C), com algumas modificações nas condições estabelecidas por Lara et al. (1965).

As larvas alimentam-se de fungos, portanto, como fonte de nutrição utilizou-se erva-mate (*llex paraguariensis*) fermentada e inflorescências de bananeiras, que durante o apodrecimento, torna-se substrato para fungos dos quais as larvas se alimentam (Sauaia et al., 1971).

3.2 DISSECAÇÃO DOS ÓRGÃOS

Para a realização dos experimentos foram utilizados glândulas salivares e ovários.

No laboratório, os insetos foram recolhidos individualmente e dissecados em abundante PBSA (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 6,5 mM Na₂HPO₄) utilizando pinças sob estereomicroscópio. As glândulas salivares foram transferidas para um tubo estéril com solução de etanol:ácido acético (3:1 v\v), e os ovários foram fixados de acordo com o protocolo de cada experimento.
3.3 LÂMINAS DE CROMOSSOMOS POLITÊNICOS

A confirmação dos períodos do desenvolvimento larval de *R. americana* foi realizada de acordo com análise de diferenças morfológicas e citológicas.

Foram feitas preparações citológicas da glândula salivar, usando a morfologia dos pufes de DNA (B2 e C3) nos cromossomos politênicos, como indicadores dos estádios do desenvolvimento larval.

Após a dissecação em PBSA, as regiões S1 e S2 do par de glândula salivar foram transferidas para um tubo estéril com solução de etanol:ácido acético (3:1 v\v) por no mínimo 15 minutos. As glândulas foram transferidas para uma lamínula e coradas com orceína acética (2% de orceína em 45% de ácido acético) por 30 minutos. A solução corante foi retirada com um papel absorvente e foi adicionada uma solução de ácido acético 60% por 15 minutos.

As glândulas posicionadas nas lamínulas foram cobertas com uma lâmina e foram feitas pressões pontuais sobre a lamínula para liberar os cromossomos politênicos de dentro das células, processo denominado *"squashing"* ou esmagamento. O excesso de ácido acético foi retirado com um papel absorvente através de uma pressão sobre a lamínula e então, lâmina e lamínula foram seladas com esmalte e a análise foi feita sob microscópio de luz.

3.4 ENSAIO DE REPLICAÇÃO DE DNA

Para identificação de células na fase S, realizou-se a marcação com EdU (5ethynyl-2´-deoxyuridine) um análogo do nucleosídio timidina, incorporado no DNA durante sua síntese, fornecido comercialmente no produto Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit (Invitrogen – Life Technologies Corporation, California, USA).

Os insetos foram dissecados em PBSA e os ovários extraídos foram tratados da seguinte forma: incubados com 20 µM de Click-iT® EdU em meio de cultura Schneider com penicilina e estreptomicina (Vitrocell – Campinas, SP), suplementado com 10% de SFB durante 1 hora em temperatura ambiente. Após incubação, os ovários foram lavados em PBSA, fixados em solução de formaldeído 3,7% por 30 minutos, lavados novamente com PBSA e estocados em PBSA a 2 - 8 °C. Posteriormente, para detecção do EdU incorporado nas células, os ovários foram permeabilizados com 1% Triton X-100 em PBSA por 30 minutos, lavados em PBSA e incubados com Click-iT reaction Alexa Fluor® azide 488 por 30 minutos e protegidos da luz, de acordo com as informações do fabricante.

Para coloração do núcleo, os ovários foram lavados em PBSA e tratados com RNAse 10 mg/mL por 30 minutos a temperatura ambiente e depois foi adicionado 3 µL de iodeto de propídeo por 20 minutos, e os ovários foram lavados com PBSA.

As lâminas foram montadas com 10 µL Vecta Shield (Vector Laboratories -Burlingame, CA, EUA).

O material foi observado no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (ZEISS - LSM510, Oberköchen, Alemanha) e para análise das imagens foi utilizado o programa LSM Image Browser (ZEISS).

3.5 IMUNOLOCALIZAÇÃO PROTEICA

Para identificar a localização das proteínas ciclina A, ciclina B e α e β -tubulina, após a dissecação, os ovários foram fixados em solução de formaldeído 3,7% por 20 minutos. Em seguida, foram lavados com PBSA, permeabilizados com 1% Triton X-100 em PBSA por 1 hora e lavados em PBSA. Foram incubados com solução de bloqueio 1% de Albumina sérica bovina (BSA) em PBSA por 1 hora e lavados com PBSA.

Foram tratados com RNAse 10 mg/mL por 30 minutos a temperatura ambiente, em um volume suficiente para cobrir todo o material. E então, para corar a actina foi adicionado 20 µL de faloidina (Alexa Fluor 633 – Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) por 2 horas a temperatura ambiente e protegido da luz. Os ovários foram lavados em PBSA e incubados com anticorpo primário produzidos em *mouse* (ver tabela 1), *overnight* a temperatura ambiente e protegido da luz.

Após esse período, os ovários foram lavados com PBSA, incubados novamente com solução de bloqueio 1% BSA por 1 hora e lavados com PBSA. Foi retirado o PBSA e foi adicionado o anticorpo secundário *anti-mouse* Alexa 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA), incubado por 2 horas a temperatura ambiente e protegido da luz. Depois foi adicionado 3 µL de iodeto de propídeo por 20 minutos. Os ovários foram

lavados com PBSA e as lâminas foram montadas com Vecta Shield. O material foi visualizado ao Microscópio Confocal de Varredura a Laser.

Os anticorpos monoclonais anti-ciclina A e B foram obtidos a partir do *Developmental Studies Hybridoma Bank*, e o anti- α e β -tubulina foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis Missouri, EUA). Na tabela 1 encontra-se os anticorpos utilizados e suas concentrações finais.

Tabela 1 – Anticorpos e concentrações utilizados para Imunofluorescência.

ANTICORPOS 1 ^a	Concentração		
anti-CycA (A12)	5 µg/mL		
anti-CycB (F2F4)	5 μg/mL		
anti-α e β-tubulina	3 µg/mL		

3.6 RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL

As imagens obtidas através das preparações citológicas de imunolocalização proteica descritas na seção 3.5, foram utilizadas para reconstrução tridimensional (3D) no software Imaris 7.1 (Bitplane AG), segundo metodologia estabelecida pelo próprio software.

3.7 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DOS OVÁRIOS

Foram dissecados 12 ovários de cada período do desenvolvimento analisado. Após a dissecação em PBSA, os ovários foram transferidos para um tubo estéril com uma solução de etanol 70% por 20 minutos e estocados em uma solução de etanol:glicerol (1:1 v/v) a -20 °C até o momento da extração.

Foi retirada a solução de etanol:glicerol e os ovários foram lavados em PBSA. Em seguida foi adicionado 300 μ L do tampão de digestão TMD (25 mM Tris- HCl pH 7,5; 20 mM EDTA pH 8; e 20 mM NaCl), com adição de 30 μ L de Sulfato de Sódio Dodecila (SDS 10%) e 5 μ L da enzima proteinaseK 10 mg/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). A solução foi misturada por inversão e incubada a 65 °C, a 900 rpm por 1 hora.

Após digestão completa do tecido, foi adicionado 300 μ L de fenol:clorofórmio (1:1 v/v – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas por 5 minutos a 14000 rpm. Em seguida, para a separação da fase orgânica e inorgânica, 300 μ L do sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo estéril, no qual, foi acrescentado 600 μ L de etanol 100%, homogeneizado por inversão e estocado *overnight* a -20 °C.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 4 °C e 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram desprezados por inversão do tubo e o pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado. Novamente as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4 °C e 14.000 rpm e o sobrenadante desprezado. O RNA foi seco a temperatura ambiente por 1 hora.

O pellet foi ressuspendido com 30 µL de H₂0 RNAse *free* (tratada com 0,1% DEPC – Dietilpirocarbonato – sob agitação por 24 horas e autoclavada). E a quantificação do RNA total foi realizada com 2 µL de cada amostra através do espectrofotômetro EON (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). As leituras de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm e o resultado apresentado em ng\µL. A relação A260/A280 deve apresentar valores entre 1,8 e 2.2 que representa bom grau de pureza.

Para obtenção de RNA puro, o RNA extraído foi tratado com 1 μ L de DNAse para 1 μ g de RNA extraído (Kit: DNAse 1, Amplification Grade – Sigma, Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), foi adicionado 2 μ L de *Reaction Buffer 10x* completado com H₂O RNAse *free* para um volume final de 20 μ L. Incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Para inativação da enzima, foi adicionado 1 µL de *Buffer Stop Solution,* incubado por 10 minutos a 70°C. O RNA foi quantificado por espectrofotometria EON. O restante do RNA extraído foi armazenado a -20° C com 0,1 v/v de acetato de sódio 3 M e 2,5 o volume de etanol absoluto.

3.8 PCR CONVENCIONAL

Para checar se houve amplificação de DNA nas amostras de RNA, foi feita uma reação de PCR com 1 μ L de cada amostra tratada com DNAse (ver seção 3.8). As reações foram realizadas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). Para cada amostra foi adicionado, 5 μ L de *buffer* (5x Go Taq Flexi – Promega), 2 μ L Mg+2 (MgCl2, 25mM), 1 μ L dNTP mix (20mM), 1 μ L *primer* ciclina B_*left*, 1 μ L *primer* ciclina B_*right*, 1 μ L templete (RNA tratado com DNAse), 0,5 μ L da enzima (Go Taq polimerase – Promega) e 11,5 μ L de RNAse H₂0 *free* para um volume final de 25 μ L.

As amostras foram levadas ao termociclador utilizando a programação: 94 °C por 10 minutos, 94 °C por 30 segundos, TM 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, 72 °C por 7 minutos resfriado a 4 °C. As amostras foram verificadas em gel de agarose 0,8% e brometo.

As sequências e Tm dos primers usados estão representadas na tabela 1.

PRIMER		Sequências	Тм
aRaCiclB	Left:	5' GAC AGC ACC GTC AGT CAT TC 3'	55.9 °C
qitabibib	RIGHT:	5' TCG CTG TCA GAC GGA GAT TT 3'	56.1 °C

3.9 SÍNTESE DE CDNA - REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT)

A síntese de DNA complementar (cDNA), foi realizada através da reação de transcriptase reversa utilizando o *kit* IMPROM-II Reverse Transcriptase System (Promega Corporation, Madison, USA) no termociclador Veriti Thermal Cycler.

O protocolo para a síntese de cDNA foi dividido em três etapas; a primeira etapa consiste na desnaturação, onde 1 μ g de RNA total foi colocado em tubo estéril e adicionado 1 μ L de oligo deoxirribonucleotídeo T (dT). Em seguida, foi completado com água RNAse *free* para o volume final de 11,6 μ L, logo após, os tubos foram colocados em termociclador incubados a 70 °C por 5 minutos e rapidamente resfriados a 4 °C.

Para a segunda etapa, chamada de anelamento, foi preparada uma solução *mix* com: 4 µL de tampão de reação Improm *buffer* 5X, 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL dNTP *mix* (10mM), e 1 µL da enzima Improm RT. Em seguida, foram adicionados 8,4 µL da solução *mix* em cada reação a primeira fase, completando um volume final de 20 µL por reação. As amostras foram levadas ao termiciclador utilizando uma programação de 25 °C por 5 minutos e depois 42 °C por 1 hora.

Na última fase ocorreu a inativação da enzima transcriptase reversa por aquecimento a 72 °C por 15 minutos e resfriado a 4 °C no termociclador. E as amostras foram armazenadas a -20 °C.

3.10 EXPRESSÃO GÊNICA – REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL (QPCR)

Para análise do perfil de expressão, os níveis de transcrição de ciclina A e ciclina B foram determinados por experimentos de PCR quantitativo (*Real Time*qPCR) utilizando o cDNA preparado como descrito anteriormente (ver seção 3.10). As reações foram realizadas em triplicatas de cada amostra que correspondia a um período do desenvolvimento. E a normalização foi efetuada por massa de RNA total.

As sequências e Tm dos primers usados estão representadas na tabela 3.

Para cada reação foi adicionado 2,5 μ L de *buffer* 10 X PCR, 2 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de dNTP, 1 μ L de SYBR *Green*, 1 μ L dos *primer_left*, 1 μ L dos *primer_right*

1 μL de cDNA, 0,5 μL de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e foi completado com H₂O RNase *free* para 25 μL.

As reações foram efetuadas no aparelho termociclador Corbett Research -Rotor Gene 6000 real-time cycler (QIAGEN, Hilden, Alemanha) com marcador SYBR *Green*, nas seguintes condições: 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos e 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 53 °C por 20 segundos e 72 °C por 30 segundos. Como calibrador, foi utilizado o período mais jovem entre as amostras e as análises das reações foram efetuadas pelo programa REST 2008.

Tabela 3 - Sequência e T	m dos	primers utilizados	para c	PCR
--------------------------	-------	--------------------	--------	-----

Primers		Тм	
αRaCicl∆	LEFT:	5' TGC CGT CCA AAT ATC AGC TG 3'	55.3 °C
qitaoloiA	RIGHT:	5' TCT ACC GAT GCC ATG TGT GT 3'	56.3 °C
aRaCiclB	LEFT:	5' GAC AGC ACC GTC AGT CAT TC 3'	55.9 °C
4	RIGHT:	5' TCG CTG TCA GAC GGA GAT TT 3'	56.1 °C

3.11 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DOS OVÁRIOS

Os ovários foram dissecados em PBSA, transferidos para um tubo estéril com uma solução de etanol 70% por 10 minutos e estocados em uma solução de etanol:glicerol (1:1 v/v) a -20 °C até o momento da extração.

Foi retirada a solução de etanol:glicerol e os ovários foram lavados em PBSA. Em seguida foi adicionado 300 μL do tampão de digestão TMD, com adição de 30 μL de SDS 10% e 5 μL de proteinase K 10 mg/mL. A solução foi misturada por inversão e incubada a 65 °C, a 900 rpm por 1 hora.

Após digestão completa do tecido, foi adicionado 300 μ L de fenol:clorofórmio (1:1 v/v), as amostras foram misturadas por inversão (sem *vortex*) e centrifugadas por 5 minutos a 14000 rpm. Em seguida, para a separação da fase orgânica e inorgânica, 300 μ L do sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo estéril, no qual, foi acrescentado 600 μ L de etanol 100%, homogeneizado por inversão e estocado *overnight* a -20 °C.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C e 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram desprezados por inversão do tubo e o pellet foi lavado com 500 μ L de etanol 70% gelado. Novamente as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C e 14.000 rpm e o sobrenadante desprezado. O DNA foi seco a temperatura ambiente por 1 hora.

O pellet foi ressuspendido com 30 μ L de H₂0 RNAse *free*. E a quantificação do DNA foi realizada com 2 μ L de cada amostra através do espectrofotômetro EON. Para obtenção de DNA genômico puro, as amostras foram tratadas com RNAse 10 mg/mL por 1 hora a temperatura ambiente e depois foram estocadas a 2 - 8 °C.

3.12 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO E ISOLAMENTO DE COLÔNIA BACTERIANA

Os clones NOR65_F05 (ciclina A) e OR6_E01 (ciclina B) foram transformados por choque térmico. Foi utilizado bactérias competentes da espécie *Escherichia coli* linhagem *DH5α*.

Foi transferido 50 µL de bactérias competentes e 1 µL do clone para um tubo estéril, incubado por 5 minutos no gelo. A seguir, foram incubados a 42 °C por 2 minutos e transferência imediata para o gelo por 2 minutos. Para a recuperação das bactérias, foi acrescentado 200 µL de meio de cultura LB líquido (10 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura e 10 g/L triptona) e incubado a 37 °C por 30 minutos.

Após esse período as bactérias foram plaqueadas em meio de cultura LBA sólido (2,5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L triptona, 5 g/L NaCl e 7,5 g/L ágar), contendo 100 mg/L de ampicilina. Foi transferido 40 µL de bactérias em cada placa de meio LBA sólido.

Para seleção de recombinantes (que continham os insertos) foi adicionado 4 μ L de IPTG 1M e 40 μ L de X-gal 20 mg/ml; a placa foi incubada *overnight* a 37 °C.

Após esse período, foram escolhidas colônias isoladas e as bactérias contendo o inserto foram crescidas *overnight* em tubo estéril contendo 5 mL de meio LB líquido e 5 µL de ampicilina (proporção de 1:1000) a 37 °C e sob agitação de 137 rpm.

3.13 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Após o crescimento, a extração do DNA plasmidial foi realizada de acordo com o protocolo de *Fast MiniPrep*. A suspensão de bactérias foi transferida para um tubo estéril e centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm. Formou-se um pellet de bactérias e o meio foi desprezado por inversão.

Foi adicionado ao tubo contendo as bactérias, 100 μ L da solução de ressuspensão, chamada de solução I (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 e 10 mM EDTA) e 1 μ L de RNase 10 mg/mL. Em seguida, foi homogeneizado no agitador *vortex* até dissolver o pellet.

Em seguida, foi adicionado 200 µL da solução de lise, ou solução II (1% SDS e 0,2 M NaOH). Foi homogeneizado por inversão e, após 5 minutos foi adicionado 200 µL da solução de neutralização ou chamada solução III (3 M acetato de potássio e 11,5% de ácido acético). Foi então, homogeneizado por inversão e incubado no gelo por 15 minutos.

Após esse período, foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. Foi retirado 400 μL do sobrenadante e transferido para um tubo estéril, foi adicionado 300 μL de isopropanol e homogeneizado por inversão.

A seguir, foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e foi adicionado 500 µL de etanol 70% gelado, homogeneizado por inversão, centrifugado novamente por 5 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado.

O DNA plasmidial extraído foi secado a vácuo por 10 minutos a 65°C no Concentrador 5301 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e ressuspendido em 30 µL de H₂O Milli-Q sob agitação vigorosa no *vortex.* Por fim, foi estocado a -20 °C.

O DNA plasmidial obtido foi quantificado no espectrofotômetro EON e depois foi realizado uma digestão dupla com as enzimas de restrição EcoR I e Hind III e *buffer* E (Promega Corporation, Madison, USA).

Para a reação de digestão foi adicionado em um tubo estéril: $3 \mu L$ do DNA plasmidial, $2 \mu L$ do *buffer* E, 0,5 μL EcoR I, 0,5 μL Hind III e 14 μL H₂O Milli-Q, para um volume final de 20 μL Foi incubado por 1 hora e 30 minutos a 37 °C e depois 65 °C por 15 minutos. Em seguida foi checado em gel de agarose 0,8% para verificar o tamanho do inserto.

3.14 SEQUENCIAMENTO

Para o sequenciamento dos clones, foi utilizado o *kit* de sequenciamento *Big Dye Terminator* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e para cada reação de PCR de sequenciamento foi adicionado: 1 µL *BigDye*, 3 µL Tampão SM, 3,5 µL H₂O RNase *free*, 1,5 µL DNA, 1 µL primer e depois transferido para o termociclador, nas seguintes condições: 1 ciclo de 96 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 1 minuto, 60 °C por 4 minutos. Após o fim da reação de amplificação o material foi mantido a 4°C.

O produto de PCR foi precipitado adicionando a cada amostra 25 µL de solução gelada de precipitação contendo 23 µL de etanol 100%, 1 µL de acetato de sódio 3 M pH 5.0 e 1 µL de glicogênio (1 g/L). Em seguida, foi realizado breve agitação no *vortex* e as amostras permaneceram no gelo por 40 minutos. Foram centrifugadas por 40 minutos a 4.000 rpm e refrigeradas a 4 °C.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado, foi adicionado 50 µL de etanol 70% gelado e centrifugado nas mesmas condições. Depois o sobrenadante foi descartado e seco por 1 hora a temperatura ambiente e protegido da luz. Finalmente, foi adicionado 10 µL de tampão de corrida (formamida 10%). O aparelho utilizado foi um sequenciador de 16 capilares modelo ABI-3130 (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, EUA).

3.15 ANÁLISE

As sequências foram analisadas pelo banco de dados BlastX – Basic Local Alignment Search Tool, uma ferramenta de biologia molecular de *software* oferecido pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os alinhamentos dos nucleotídeos foram realizados no programa ClustalX – Multiple Alignment of Nucleic Acid and Protein Sequences, separando as sequências que se sobrepõem em *cotings* e as sequências isoladas em *singlets.* Para edição, foi utilizado o programa BioEdit – Sequence Alignment Editor.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 MORFOLOGIA GERAL DO FOLÍCULO

Os ovários de *R. americana* sofrem modificações morfológicas significativas no decorrer do seu desenvolvimento. Durante a fase larval, o par de ovário é pequeno em relação ao tamanho da larva, atingindo grandes proporções durante a fase de pupa e mosca.

Para uma melhor compreensão da organização dos três tipos de células que compõe um folículo ovariano e devido as modificações que ocorrem nos ovários durante o desenvolvimento, foram selecionadas três idades representativas: uma para a fase larval (4º período), uma para a fase de pupa jovem (3º dia de pupa) e outra para a fase de pupa intermediária (5º dia de pupa). Essas idades apresentam diferenças morfológicas mais relevantes. Foram feitas imagens com preparações de imunofluorescência, em que as estruturas relevantes como microfilamentos, microtúbulos e DNA estão evidenciados (Figuras 7-9).

Na fase larval, as células nutridoras e os ovócitos são pequenos e estão localizados na porção mais externa do ovário. As células foliculares primordiais estão localizadas na base de cada ovaríolo, na porção mais interna do órgão (Figura 7).

Ao longo do desenvolvimento, as células foliculares se dividem e recobrem a superfície do ovócito e de sua respectiva célula nutridora, formando o folículo. Durante a fase de pupa jovem, as células nutridoras aumentam de tamanho e o ovócito ainda permanece pequeno (Figura 8).

O ovário continua crescendo, e na fase de pupa intermediária, o folículo aumenta significativamente em volume, devido ao aumento do ovócito, pois seu citoplasma é enriquecido com vitelo (Figura 9).

Na figura 9, observa-se com mais detalhe a localização dos três tipos de células situadas no folículo. A célula nutridora está sempre associada ao ovócito ao longo do desenvolvimento. Células foliculares achatadas envolvem cada conjunto de célula nutridora\ovócito. Nota-se no ovócito a região da vesícula germinal com cromossomos meióticos e matriz nuclear e citoplasma com vitelo.



Figura 7- Imagem de imunofluorescência dos ovariolos de *R. americana* no **4º período da fase larval**. Tubulina evidenciada com anticorpos anti- α e anti- β - tubulina (anticorpo secundário *mouse*-Alexa 488 – verde), DNA nuclear corado com iodeto de propídeo em vermelho e actina marcada com faloidina Alexa 633 – azul. F: núcleo das células foliculares ; N: núcleo da célula nutridora; Seta branca: ovócito. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Quadro inferior direito exibe os três canais juntos.



Figura 8- Imagem de imunofluorescência dos folículos no ovário de *R. americana* no **3º dia de pupa**. Tubulina evidenciada com anticorpos anti- α e anti- β - tubulina (anticorpo secundário *mouse*-Alexa 488 – verde), DNA nuclear corado com iodeto de propídeo em vermelho e actina marcada com faloidina Alexa 633 – azul. F: núcleo das células foliculares; N: núcleo da célula nutridora; Ov: ovócito. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Quadro inferior direito exibe os três canais juntos.



Figura 9- Imagem de fluorescência. Detalhe de um folículo no ovário de *R. americana* no **5º dia de pupa**. Actina marcada com faloidina Alexa 633 - azul, fotomicrografia de fase, DNA nuclear corado com iodeto de propídeo em vermelho. F: núcleo das células foliculares ; N: núcleo da célula nutridora; Cn: citoplasma da célula nutridora; Seta branca longa: cromossomos poliploides\politênicos da célula nutridora; Ov: ovócito; Seta preta: vesícula germinal do ovócito; Seta branca: cromossomos meióticos do ovócito; Notar a presença de vitelo (*****) no citoplasma do ovócito. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Quadro inferior direito exibe os três canais juntos.

4.2 ATIVIDADE REPLICATIVA DE DNA

Um dos objetivos desse trabalho foi detectar atividade replicativa do DNA nas células foliculares e nutridoras do ovário de *R. americana* ao longo do seu desenvolvimento, através de ensaios de incorporação de EdU (5 - etinil - 2' desoxiuridina), um análogo do nucleosídeo de timidina incorporado no DNA durante a síntese, evidenciando as células que passaram pela fase S.

Os ensaios foram feitos em duas fases do desenvolvimento:

- 1. Fase larval: 3º, 4º, 5º e 6º períodos do quarto estágio larval.
- 2. Fase de pupa: 1° ao 8° dia de pupa.

Observou-se uma intensa incorporação de EdU nas células foliculares durante a fase larval (4º ao 6º período), mostrado na figura 10; durante a fase de pupa jovem (1º dia ao 3º dia de pupa), figura 11; e durante a fase de pupa intermediária (4º ao 6º dia de pupa), figura 12; identificando uma intensa atividade proliferativa nessas células.

Na fase de pupa tardia (7º ao 8º dia de pupa), não foi observado incorporação de EdU no núcleo das células foliculares, sugerindo o encerramento da síntese de DNA e atividade proliferativa dessas células nos dias finais da fase de pupa (Figura 13).

Do mesmo modo, foram observadas células nutridoras positivas para incorporação de EdU, principalmente no 6º período larval (Figura 10: D1-D3), período que precede a fase de pupa e nos dias iniciais da fase de pupa (1º ao 3º dia) mostrado na figura 11.

Durante a fase de pupa intermediária (Figura 12) e fase de pupa tardia (Figura 13), não foram observados núcleos marcados, de forma que se sugere o encerramento da síntese de DNA nessas células no 4º dia de pupa (Figura 12: H1-H3).



Figura 10 – Atividade replicativa das células foliculares e nutridoras do ovário de *R. americana* durante a **fase larval** (3° ao 6° período larval). **(A1-A3)** Ovário no 3° período larval (3P); **(B1-B3)** Ovário no 4° período larval (4P); **(C1-C2)** Ovário no 5° período larval (5P); e **(D1-D2)** Ovário no 6° período larval (6P). A detecção da síntese de DNA nas células foliculares (F) e nutridoras (N) é mostrada em verde (EdU) e o núcleo em vermelho é marcado com iodeto de propídeo. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Terceiro quadro exibe os dois canais juntos.



Figura 11 – Atividade replicativa das células foliculares e nutridoras do ovário de *R. americana* durante a fase de **pupa jovem** (1° ao 3° dia de pupa). **(E1-E3)** Ovário de pupa 1° dia (p1); **(F1-F3)** Ovário de pupa 2° dia (p2); e **(G1-G2)** Ovário de pupa 3° dia (p3); A detecção da síntese de DNA nas células foliculares (F) e nutridoras (N) é mostrada em verde (EdU) e o núcleo em vermelho é marcado com iodeto de propídeo. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Terceiro quadro exibe os dois canais juntos.



Figura 12 – Atividade replicativa das células foliculares e nutridoras do ovário de *R. americana* durante a fase de **pupa intermediária** (4º ao 6º dia de pupa). **(H1-H3)** Ovário de pupa 4º dia (p4); **(I1-I3)** Ovário de pupa 5º dia (p5); e **(J1-J2)** Ovário de pupa 6º dia (p6); A detecção da síntese de DNA nas células foliculares (F) e nutridoras (N) é mostrada em verde (EdU) e o núcleo em vermelho é marcado com iodeto de propídeo. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Terceiro quadro exibe os dois canais juntos.



Figura 13 – Atividade replicativa das células foliculares e nutridoras do ovário de *R. americana* durante a fase de **pupa tardia** (7º ao 8º dia de pupa). **(K1-K3)** Ovário de pupa 7º dia (p7); e **(L1-L3)** Ovário de pupa 8º dia (p8). A detecção da síntese de DNA nas células foliculares (F) e nutridoras (N) é mostrada em verde (EdU) e o núcleo em vermelho é marcado com iodeto de propídeo. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Terceiro quadro exibe os dois canais juntos.

4.3 PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Experimentos de RT-PCR quantitativo (*Real Time*-PCR) foram realizados com a finalidade de analisar quantitativamente os níveis de expressão das ciclinas A e B identificadas em *R. americana*, e comparar com o perfil da atividade replicativa das células foliculares e nutridoras identificadas durante a ovogênese, através da incorporação de EdU.

A normalização dos Ct's foi efetuada por massa de RNA total já que a expressão de alguns genes de referência (GAPDH, actina e tubulina) presentes na biblioteca de cDNA de *R. americana* apresentaram grande variação durante o desenvolvimento, fato também descrito por Rezende-Teixeira et al. (2008).

Para os experimentos, foram utilizados ovários de indivíduos-irmãos do mesmo grupo. E os níveis de expressão relativa foram determinados em duas fases do desenvolvimento:

- 1. Fase larval: 3º, 4º, 5º e 6º períodos do quarto estágio larval.
- 2. Fase de pupa: 1º ao 5º dia de pupa.

Durante a fase larval, os níveis de expressão de ciclina A tiveram um aumento ao longo do desenvolvimento ovariano, atingindo um pico da expressão do transcrito no 6º período, com aumento de 2,5 vezes em relação ao 6º período larval usado como calibrador (Figura 14A). Os níveis de expressão de ciclina B também tiveram um aumento, porém atingiram um pico no 4º período, com redução da quantidade de mensageiros nos períodos seguintes, 5º e 6º período (Figura 14B).

Durante a fase de pupa, observou-se aumentos gradativos da quantidade de mensagens de ambas ciclinas nos ovários, atingindo uma diferença significativa entre o 1º dia de pupa, usado como calibrador e o 5º dia de pupa (Figuras 15A e 15B).

Interessante destacar, que os níveis do mensageiro de ciclina A nos ovários aumentaram aproximadamente 10 vezes, enquanto os níveis do mensageiro de ciclina B, aumentaram aproximadamente 30 vezes. Claramente, as duas ciclinas foram coexpressadas, porém o perfil de expressão do RNA mensageiro de ciclina B, foi mais expresso ao longo do desenvolvimento ovariano.

Não foram observadas diferenças nas curvas de melting obtidas nos experimentos, fato que indica que os transcritos estariam de fato sendo amplificados nos experimentos de RT-PCR.



Figura 14A – Gráfico da expressão relativa da Ciclina A por RT-PCR quantitativo no ovário de *R. americana* durante a fase larval.



Figura 14B – Gráfico da expressão relativa da Ciclina B por RT-PCR quantitativo no ovário de *R. americana* durante a fase larval.



Figura 15A – Gráfico da expressão relativa da Ciclina A por RT-PCR quantitativo no ovário de *R. americana* durante a fase de pupa.



Figura 15B – Gráfico da expressão relativa da Ciclina B por RT-PCR quantitativo no ovário de *R. americana* durante a fase de pupa.

4.4 IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS CICLINAS A E B

Para identificar a localização celular das proteínas ciclina A e B nos ovários de *R. americana,* foram feitos ensaios de imunolocalização em ovários obtidos na fase de pupa (5º dia de pupa). Nessa fase, os ovários apresentam um tamanho consideravelmente maior do que em fases mais jovens do desenvolvimento, fato que facilita a observação da marcação e análise dos experimentos.

Utilizando o anticorpo dirigido contra a ciclina A, foi possível observar a presença de uma marcação difusa e homogênea no citoplasma da célula nutridora e no citoplasma do ovócito, presente em todos os folículos ovarianos (Figura 16 e 17).

Inesperadamente, observou-se que não houve marcação para ciclina A na região da vesícula germinal do ovócito. Na figura 17, é possível observar com mais detalhe ausência proteica de ciclina A apenas nessa região de todo o folículo.

Surpreendentemente, utilizando o anticorpo dirigido contra a ciclina B, constatou-se uma marcação forte e consistente situada na região da vesícula germinal do ovócito e também uma marcação difusa no citoplasma das células nutridoras em todos os folículos do ovário (Figura 18).

Na figura 19, observa-se com mais detalhe um aglomerado proteico de ciclina B, juntamente com os cromossomos meióticos corados em vermelho, na região da vesícula germinal do ovócito, a qual não apresentou ciclina A.

No citoplasma do ovócito, a marcação para ciclina B foi fraca, de forma que para confirmar a localização das ciclinas nas diferentes células do ovário, foram feitas recontruções tridimensionais, mostrada na seção seguinte.



Figura 16- Imagem de imunofluorescência no ovário de *R. americana* no 5º dia de pupa. **Ciclina A** evidenciada com anti-CycA (anticorpo secundário Alexa 488 – verde), DNA nuclear corado com iodeto de propídeo em vermelho, actina marcada com faloidina Alexa 633 – azul. F: núcleo das células foliculares ; N: núcleo da célula nutridora; Ov: ovócito; Seta branca: indica a ausência de marcação para ciclina A na região da vesícula germinal do ovócito. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Quadro inferior direito exibe os três canais juntos.



Figura 17- Imagem de imunofluorescência. Detalhe dos folículos no ovário de *R. americana* no 5º dia de pupa. **Ciclina A** evidenciada com anti-CycA (anticorpo secundário Alexa 488 – verde), DNA nuclear corado com iodeto de propídeo em vermelho, actina marcada com faloidina Alexa 633 - azul. F: núcleo das células foliculares ; N: núcleo da célula nutridora; Ov: ovócito; Seta branca: indica a ausência de marcação para ciclina A na região da vesícula germinal do ovócito. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Quadro inferior direito exibe os três canais juntos.



Figura 18- Imagem de imunofluorescência no ovário de *R. americana* no 5º dia de pupa. **Ciclina B** evidenciada com anti-CycB (anticorpo secundário Alexa 488 – verde), DNA nuclear corado com iodeto de propídeo em vermelho, actina marcada com faloidina Alexa 633 - azul. F: núcleo das células foliculares; N: núcleo da célula nutridora; Ov: ovócito. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*.



Figura 19- Imagem de imunofluorescência no ovário de *R. americana.* Detalhe de um folículo no 5º dia de pupa. **Ciclina B** evidenciada com anti-CycB (anticorpo secundário Alexa 488 – verde), DNA nuclear corado com iodeto de propídeo em vermelho, actina marcada com faloidina Alexa 633 - azul. F: núcleo das células foliculares; N: núcleo da célula nutridora; Ov: ovócito. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser.* Quadro inferior direito exibe os três canais juntos.

Em confirmação dos resultados, os experimentos de controle negativo realizados sem a incubação dos anticorpos primários não apresentaram marcação, mostrando apenas precipitados residuais, de modo que não foi observada marcação inespecífica entre o anticorpo secundário, confirmando sua especificidade (Figura 20).



Figura 20- Controle negativo. Imagem de imunofluorescência no ovário de pupa de 5 dias de *R. americana*. Anticorpo secundário anti-*mouse* Alexa 488 em verde, DNA nuclear corado com iodeto de propídeo em vermelho, actina marcada com faloidina Alexa 633 - azul. F: núcleo das células foliculares; N: núcleo da célula nutridora; Ov: ovócito. As imagens correspondem uma projeção de várias fatias do eixo Z organizadas em um único plano, obtidas em microscópio confocal de varredura *a laser*. Quadro inferior direito exibe os três canais juntos.

4.5 RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL

A série de imagens fluorescentes obtidas em secções ópticas consecutivas através do microscópio confocal de varredura a *laser*, foram agrupadas em uma imagem em três dimensões.

Nas imagens fluorescentes originais, a proteína ciclina A estava presente como forma difusa no citoplasma das células nutridoras e no citoplasma dos ovócitos, porém ausente na vesícula germinal do ovócito (ver figura 17 da seção 4.4). Contrariamente, a proteína ciclina B estava excessivamente presente na vesícula germinal do ovócito, e de forma escassa e difusa no citoplasma das células nutridoras (ver figura 19 da seção 4.4).

Após a aplicação da reconstrução tridimensional à essas imagens através do *software* Imaris 7.1, a organização e a localização das ciclinas e das estruturas celulares se tornaram prontamente mais visíveis e puderam ser identificadas com maior precisão.

Nas reconstruções, a ciclina A foi positiva no citoplasma das células nutridoras e dos ovócitos e negativa para a região da vesícula germinal do ovócito (Figura 21), confirmando o que foi visto anteriormente nos ensaios de imunofluorescência. A ciclina B foi positiva no citoplasma das células nutridoras, de forma predominante na vesícula germinal do ovócito e de forma escassa no citoplasma do ovócito (Figura 22).



Figura 21- Reconstrução tridimensional dos folículos do ovário de pupa de 5 dias de *R. americana*. Evidenciando a rede de microfilamentos de actina em azul, o DNA nuclear em vermelho e a ciclina A em verde. Imagem obtida através do *software* Imaris 7.1.



Figura 22- Reconstrução tridimensional dos folículos do ovário de pupa de 5 dias de *R. americana*. Evidenciando a rede de microfilamentos de actina em azul, o DNA nuclear em vermelho e a ciclina B em verde. Imagem obtida através do *software* Imaris 7.1.

4.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CICLINAS A E B

Sequências com homologia a ciclinas foram identificadas a partir de sequências identificadas em uma biblioteca de cDNA construída com RNA poliA + de ovário de *Rhynchosciara americana* em diferentes fases do desenvolvimento larval e na fase de pupa jovem. Foram encontradas mensagens para 4 ciclinas: A, B, G e H.

Para o presente estudo, foram selecionadas duas ciclinas, a ciclina A e a ciclina B, para realizar o isolamento, sequenciamento e análise da unidade transcricional dos genes.

A análise da sequência nucleotídica do clone da ciclina A identificou um fragmento de RNA mensageiro de 784 pb, e da ciclina B foi identificado com 552 pb. Ressaltando que as duas ciclinas apresentaram o domínio conservado da Superfamília das Ciclinas e se alinha na região amino terminal (N-terminal) da cadeia polipeptídica.

Análises feitas das sequências, mostraram que as ciclinas identificadas apresentam o domínio conservado da superfamília das ciclinas. Este domínio completo tem um tamanho de 88 aminoácidos (Figura 23 e 24).

1	125	250	375	500	625	750 784
RF +1	binding site 2 🔥 🔥					
Specific hits	CYCLIN					
Superfamilies	CYCLIN superfamily					

Figura 23- Esquema representando o domínio conservado da ciclina A.

1	75	150	225	300	375	450	525 552
			Cyclin_	С			
			CYCLIN super	family			

Figura 24- Esquema representando o domínio conservado da ciclina B.

Para um estudo mais detalhado, foi feito alinhamento da sequência de aminoácidos das ciclinas A e B identificadas em *R. americana*, com as sequências de outras espécies (Figura 25, 26 e 27).



Figura 25- Imagem do alinhamento da sequência consenso da proteína ciclina A as ciclinas de outras espécies.



Figura 26- Imagem do alinhamento da sequência consenso da proteína ciclina A as ciclinas de outras espécies.

Para obtenção dos valores de identidade e similaridade entre as sequências de ciclina A de *R. americana* com a sequência da ciclina A de outros organismos disponíveis no banco de dados internacional NCBI. Da mesma forma, foi feita com a ciclina B. O termo identidade refere-se ao número de aminoácidos idênticos e o termo de similaridade refere-se ao número de aminoácidos com propriedades químicas semelhantes. A tabela 4 exibe os valores obtidos de cada organismo referente a ciclina A.

Os valores obtidos foram pouco variáveis comparando diferentes organismos, mantendo uma média de aproximadamente 64,5% de identidade e 78,7% de similaridade. Foi constatado entre os organismos comparados, que a espécie *Anopheles gambiae* possui a sequência mais semelhante de ciclina A com a de *R. americana.*

NOME DAS ESPÉCIES	IDENTIDADE	Similaridade
Aedes aegypti	68%	79%
Culex quinquefasciatus	65%	75%
Anopheles gambiae	71%	80%
Drosophila virilis	60%	79%
Drosophila grimshawi	59%	77%
Drosophila willistoni	63%	81%
Musca domestica	66%	80%

Tabela 4- Valores em (%) de identidade e similaridade de ciclina A de R. americana versus outros organismos. Os valores de identidade e similaridade foram obtidos do GenBank no site NCBI.


5 DISCUSSÃO

As características biológicas do díptero *Rhynchosciara americana* tem contribuído amplamente para o estudo da biologia do desenvolvimento, por apresentar características únicas, como o desenvolvimento sincrônico entre os indivíduos irmãos, de modo que todos se encontram no mesmo estágio de desenvolvimento e por todos serem do mesmo sexo (Pavan, Da Cunha, 1969).

O desenvolvimento sincrônico permite a obtenção de grande quantidade de material com fidelidade temporal em relação aos eventos moleculares que cercam as alterações que ocorrem durante o desenvolvimento, permitindo avaliações mais confiáveis e precisas das alterações, ou seja, para análises citogenéticas e moleculares, um único indivíduo é representativo de todo o grupo.

Da mesma forma, o desenvolvimento dos folículos ovarianos de *R. americana* também é sincrônico e apresenta uma interessante particularidade, como o fato de apresentar uma única e gigante célula nutridora conectada ao ovócito I envolvidos por células somáticas denominadas foliculares (Basile, 1979). Contrariamente, no ovário de *Drosophila*, os folículos ovarianos amadurecem sequencialmente a partir do germário, ovos imaturos estão localizados na região proximal do abdômen e ovos maduros na região mais distal, e cada folículo ovariano é constituído por quinze células nutridoras e um ovócito (Lynch, Roth, 2011).

De acordo com os ensaios de incorporação de EdU, as células foliculares, localizadas inicialmente na porção mais interna do ovário durante o desenvolvimento larval, apresentaram elevada atividade proliferativa quando se multiplicaram até popular toda a periferia das células nutridoras e ovócito, visto que essa atividade replicativa se encerrou apenas na fase de pupa tardia, quando o folículo está completamente formado.

Conforme descrito por Basile (1969), as células somáticas foliculares sofrem consecutivas mitoses para recobrir o conjunto de célula nutridora e ovócito e formar o folículo, e também para acompanhar o crescimento do folículo em volume ao longo do desenvolvimento. Além dessas funções, no ovário de *Drosophila*, as células foliculares produzem e secretam proteínas para construção da casa do ovo (Wu et al., 2008).

A célula nutridora não se divide e a passagem pela fase S constatada nessas células durante a fase larval e durante a fase de pupa jovem, está correlacionada com os seus cromossomos, que são funcionalmente ativos e sofrem processos endoreplicativos distintos ao longo do desenvolvimento (Basile, et al., 1975).

Nesses cromossomos ocorrem o processo de poliploidia, seguido de politenia, o que determina um tipo de amplificação gênica total dessa célula, o que faz a mesma transcrever intensamente e enviar RNA para o ovócito, causando crescimento do folículo a partir da fase de pupa (Casartelli, 1971; Basile, et al., 1979).

A atividade endoreplicativa nas células nutridoras se encerrou durante a fase de pupa intermediária, especificamente no 4º dia da fase de pupa. Curiosamente, o fim desse processo ocorreu no mesmo dia da fase de pupa em que ocorre o último pico do hormônio ecdisona (20-hidroxi ecdisona) durante o desenvolvimento de *R. americana*, e após esse último pico, há um declínio subsequente da concentração do ecdisona na hemolinfa, para se tornar uma mosca (Brandão et al., 2014).

O hormônio 20-hidroxi ecdisona é um ecdisteróide fundamental na biologia dos insetos, regulando a ecdise (muda) nesses organismos. Participa de eventos importantes durante a metamorfose, como a remodelação de tecidos, através da morte celular programada, incluindo a histólise da glândula salivar e do corpo gorduroso (Brandão et al., 2014; Nicolson et al., 2015).

Essa correlação temporal pode indicar que os ecditeróides também desempenham um papel importante no processo de sincronização dos eventos da ovogênese em *R. americana*.

Obviamente, no ovócito não houve incorporação de EdU. Como descrito por Basile et al. (1975) os cromossomos do ovócito permanecem inativos transcricionalmente, estacionado na subfase zigóteno da meiose, enquanto a célula anexa nutridora se encarrega de realizar as tarefas nutricionais, como a produção de vitelo, contendo RNA mensageiro e proteínas importantes para o futuro desenvolvimento embrionário.

De fato, foi possível observar o citoplasma do ovócito enriquecido com grânulos de vitelo durante a fase de pupa. Foi descrito a presença de um canal citoplasmático interligando estas duas células, devendo contribuir para a transferência de material da célula nutridora para o ovócito (Machado-Santelli, Santelli, 2000).

Esta característica do ovário, de conter ovócitos funcionalmente inativos e células nutridoras e células foliculares funcionalmente ativas, não é uma característica

própria do gênero Rhynchosciara, vista também em outros dípteros, como em *Drosophila* (He et al., 2011), e *Calliphora* (Anan'ina et al., 2014).

Em *Drosophila*, as ciclinas A e ciclina B foram identificadas sendo diferentes, porém altamente homólogas e ensaios de hibridização *in situ* indicaram diferenças na expressão dos dois tipos de ciclina específicas, entre estágio de desenvolvimento e entre órgãos (Whitfield et al., 1990).

O perfil de expressão do RNA mensageiro de ciclina A e ciclina B em *R. americana* foi determinado por meio de experimentos de RT-PCR quantitativo, com a finalidade de comparar com o perfil da atividade replicativa das células foliculares e nutridoras. Nossos resultados mostraram que as ciclinas foram co-expressas, aumentando gradualmente a expressão ao longo do desenvolvimento ovariano e a ciclina B foi mais expressa em relação a expressão da ciclina A, com um aumento de 30 vezes.

Era esperado observar um perfil variável da quantificação das ciclinas, como é observado durante o ciclo celular canônico. Para a correta progressão do ciclo celular, faz-se necessário que existam momentos de alta atividade e momentos de inibição das atividades das ciclinas (Harashima et al., 2013). Como não foram observadas oscilações das ciclinas A e B, não foi possível correlacionar uma provável atuação dessas ciclinas com a atividade replicativa de DNA das células foliculares e nutridoras do ovário. Esses resultados são sugestivos de que as duas ciclinas estivessem sendo acumuladas ao longo do desenvolvimento.

Sabendo que os experimentos de RT-PCR foram realizados com RNA extraído dos ovários em sua totalidade, não foi possível determinar qual evento do desenvolvimento do ovário ou quais células estariam atreladas ao aumento progressivo observado nos níveis relativos de mensageiros de ciclina A e de ciclina B.

Na tentativa de esclarecer melhor as células responsáveis pela expressão gênica progressiva de ambas ciclinas nos ovários, optamos por realizar ensaios de imunolocalização proteica. Os resultados mostraram presença da proteína ciclina A por todo o citoplasma das células nutridoras e do ovócito. Um achado que mereça destaque, foi a constatação proteica da ciclina B presente no citoplasma das células nutridoras e excessivamente acumulada na região da vesícula germinal do ovócito, e ausência total da ciclina A nessa região.

Além dos ensaios de imunolocalização, foram usadas ferramentas de reconstrução tridimensional que permitiram uma melhor identificação da localização

proteica das ciclinas nas diferentes células que compõem o ovário, constatando também presença de ciclina B intranuclear na célula nutridora.

Conjuntamente, os resultados do presente estudo indicam acúmulo das duas ciclinas durante a ovogênese de *R. americana*.

Lehner e O'Farrell (1990), demonstraram que as ciclinas A e B são coexpressadas em células com atividade replicativas durante o desenvolvimento de *Drosophila.* E os níveis de RNA mensageiro da ciclina B refletem diretamente nos níveis de acumulação de ciclina B.

Dalby e Glover (1992), através de hibridização *in situ* em ovários inteiros de *Drosophila*, descreveram a distribuição dos transcritos de ciclina A e B durante os 14 estágios designados à ovogênese. Ambas ciclinas são transcritas no germário e em comparação com os níveis de transcritos da ciclina A, os níveis de transcritos da ciclina B são mais elevados. Nos estágios 9 e 10, os transcritos de ciclina A e ciclina B são sintetizados pelas células nutridoras e vão se acumulando. Posteriormente, esses transcritos são distribuídos uniformemente por todo o citoplasma do ovócito durante os estágios 11 e 12. E somente os transcritos de ciclina B são concentrados no pólo posterior do ovócito nos estágios 13 e 14. O pólo posterior é uma região especializada, que contém um citoplasma rico em RNAs mensageiros maternos, e após a fecundação, essa região desencadeia o desenvolvimento inicial de embriões de insetos (Kobayashi et al., 1996).

Nossos resultados, mostram-se coerentes sobre o acúmulo de ciclinas, visto que durante o desenvolvimento do folículo ovariano, a célula nutridora aumenta o seu potencial transcricional promovendo uma grande síntese de RNA mensageiro, os quais são direcionados para o ovócito que está transcricionalmente inativo, fazendo com o que seu citoplasma esteja rico em RNA. Desta forma, observarmos o aumento gradual da expressão do RNA mensageiro de ciclina A e B no ovário de *R. americana*, dado que reflete a alta atividade transcricional gerada pela célula nutridora durante o desenvolvimento.

Em ovos não fertilizados de *Drosophila*, foram detectados abundante suprimento materno de ambas ciclinas A e B, com níveis mais elevados de ciclina B em relação aos níveis de ciclina A (Whitfield et al., 1990).

Utilizando anticorpos dirigidos, devido alta abundância de RNA mensageiro maternal da ciclina B, um sinal imunofluorescente intenso foi detectado em embriões precoces de *Drosophila* (Lehner, O'Farrel, 1990). E revelou que a ciclina A maternal

se acumula no citoplasma interfásico de embriões, se desloca para o núcleo durante a prófase e é completamente degradada durante a metáfase (Lehner, O'Farrell, 1989).

Westendorf et al. (1989) descreveu que as ciclinas A e B atuam de forma independente e que a ciclina B materna é a única ciclina necessária para a conclusão da primeira divisão meiótica. Em vertebrados, ciclina B é essencial para maturação meiótica (Gui, Homer 2013). E a ciclina A desempenha um papel relativamente menor (Touati et al., 2012).

Embora elas pareçam funcionar independentemente, ciclina A e ciclina B são juntamente necessárias para obter uma metáfase adequada. Bourouh et al. (2016), mostraram que ovócitos de *Drosophila* com *knockdown* da ciclina A, apresentaram uma falha na orientação do cromossomo X, não devidamente orientado para lados opostos. E *knockdown* da ciclina B, pareciam ter sido submetidos a uma anáfase precoce, mostrando uma cromatina dividida em duas massas e morfologia dos fusos anormais. Os resultados desse estudo indicam que a ciclina A é necessária para a orientação dos cromossomos homólogos e a ciclina B seria necessária para estabelecer e manter a meiose em ovócitos maduros, mantendo a organização dos fusos fusos estacionados em metáfase I e a progressão através da segunda divisão meiótica.

Poucos estudos se concentram nos diferentes papéis das ciclinas durante a ovogênese. E muito ainda há a ser entendido sobre o controle dos ciclos celulares diferenciados que ocorrem em um mesmo órgão, como o ovário, que reúne em si células foliculares com ciclo celular mitótico, células nutridoras com endomitoses, seguido de endociclos e ovócito estacionado em meiose; bem como a atuação das proteínas reguladoras do ciclo celular, as ciclinas, através de abordagens funcionais, como silenciamento por RNA de interferência. Os resultados deste estudo representam o princípio para o entendimento da presença de ciclinas A e B em *R. americana*, e sua participação na regulação de processos relacionados à ovogênese. Esses dados completam e acrescentam informações à escassa literatura a respeito do estudo nos estágios mais tardios do desenvolvimento em dípteros.



6 CONCLUSÃO

A caracterização dos diferentes tipos celulares no ovário quanto a replicação de DNA, evidenciaram uma intensa atividade proliferativa das células foliculares para envolver cada ovócito com sua respectiva célula nutridora e formar o folículo, acompanhando seu crescimento durante o desenvolvimento, até a fase de pupa tardia. A atividade endoreplicativa nas células nutridoras, evidencia síntese de DNA associada a politenização cromossômica que ocorre como um processo grandemente sincrônico com início na fase de pupa intermediária e término na fase de pupa tardia.

Análises dos perfis de expressão dos RNAs mensageiros das ciclinas A e B não mostraram oscilações dos níveis dos transcritos, mas sim um aumento progresso a partir do 4º período larval até o 5º dia de pupa. Portanto, não foi possível correlacionar a expressão das duas ciclinas com os ciclos replicativos das células foliculares e com os ciclos endoreplicativos das células nutridoras.

Dados de imunolocalização das ciclinas mostraram um perfil de localização proteica de ciclina A citoplasmática, sem evidência nuclear, enquanto a ciclina B é localizada preferencialmente em uma região denominada de vesícula germinal do ovócito, associada aos cromossomos meióticos.

As reconstruções tridimensionais foram relevantes para uma identificação com maior precisão das estruturas celulares e da localização proteica das ciclinas no ovário, compensando a complexidade de estudar o desenvolvimento desse órgão que possui três diferentes tipos celulares indissociáveis.

Conjuntamente, as metodologias aplicadas no presente estudo permitem afirmar que as ciclinas são sintetizadas e acumuladas progressivamente durante a ovogênese em *R. americana* e sugerem que as funções das ciclinas A e B estariam relacionadas a transcrição e controle do ciclo celular logo após a fecundação e durante a embriogênese.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Anan'ina TV, Kokhanenko AA, Stegniv VN. Cyst geometry in the egg chambers of *Calliphora erythocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) ovaries. Protoplasma. 2014;251:913-9.

Barlow PW, Sherman MI. Cytological studies on the organization of DNA in giant trophoblast nuclei of the mouse and the rat. Chromosoma.1974; 47:119–31.

Basile R. Nucleic acid synthesis in nurse cells of *Rhynchosciara angelae* Nonato and Pavan, 1951. Genetics. 1969;61:261-273.

Basile R. Aspects of ovary development in *Rhynchosciara*. Revista Brasileira de Genetica II. 1979; 2: 145-160.

Basile R, Casartelli C, Benozzati ML. Desenvolvimento dos Testículos e Ovários de "Rhynchosciara*. Ciência e Cultura. 1975;27:151-158.

Bauer H, Beermann W. Polytenia of giant chromosomes. 1952;4: 830-48.

Bourouh M, Dhaliwal R, Rana K, Sinha S, Guo Z, Swan A. Distinct and overlapping requirements for cyclins A, B, and B3 in *Drosophila* female meiosis. G3 Genes Genomes Genetics. 2016;6:3711-24.

Brandão AS, De Amaral JB, Rezende-Teixeira P, Hartfelder K, Sivieiro F, Machado-Santelli G. Cell death and tissue reorganization in *Rhynchosciara americana* (Sciaridae: Diptera) metamorfosis and their relation to molting hormone titers. Arthropod Structure & Development. 2014;43:511-22.

Breuer ME. Revision of the *Rhynchosciara Rubsaamen* (Diptera, Sciaridae) in the Neotropical Region. Arq Zool. 1969;17:167-98.

Breuer ME, Pavan C. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Chromossoma. 1955;7:371-86.

Britton JS, Edgar BA. Environmental control of the cell cycle in Drosophila: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. Development. 1998;125:2149–158.

Calvi BR. Making big cells: one size does not fit all. Proceeding of National Academy of Sciences of the USA 2013;110: 9621–2.

Casartelli C. Alguns aspectos de diferenciação entre linhagem somática e germinativa determinados por mudanças no número e forma dos cromossomos. Ciência e Cultura. 1971;23:213-19.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm Dalby B, Glover M. 3'non-translated sequences in Drosophila cyclin B transcripts direct posterior pole accumulation late in oogenesis and peri-nuclear association in syncytial embryos. Development. 1992;115:989-97

Davioli T, De Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and câncer. Annual Review Cell and Developmental Biology. 2011;27: 585-610.

Dong X, Zavitz KH, Thomas BJ, Lin M, Campbell S, Zipursky SL. Control of G1 in the developing Drosophila eye: rca1 regulates Cyclin A. Genes Development. 1997; 11:94-105.

Dreyfus A, Nonato E, Breuer ME, Pavan C. Cromosomas politênicos em vários órgãos de *Rhynchosciara angelae* (*Dipterae*). Revista Brasileira de Biologia. 1951;11:439-50.

Edgar BA, Lehner CF. Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. Science. 1996;274:1646-52.

Edgar BA, Orr-Weaver TL. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell.* 2001;105: 297–306.

Elledge SJ, Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science. 1996; 274: 1664-72.

Eliades A, Papadantonakis N, Ravid K. New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization. Jornal Biological Chemistry. 2010;285:18909-17.

Ficq A, Pavan C. Autoradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Nature. 1957;180:983-84.

Fisher DL, Nurse P. A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G₁ cyclins. The EMBO Journal. 1996;15:850-60.

Follette, P.J. et al. (1998) Fluctuations in cyclin E levels are required for multiple rounds of endocycle S phase in Drosophila. Current Biology. 1998;8:235–238.

Fox DT, Duronio R J. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. Development. 2013;140: 3-12.

Guevara M, Basile R. DNA and RNA puffs in Rhynchosciara. Caryologia. 1973; 26:275–95.

Gui L, Homer H. Hec1-dependent cyclin B2 stabilization regulates the G2-M transition and early prometaphase in mouse oocytes. Dev. Cell. 2013;25:43–54.

Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. Trends in Cell Biology. 2013; 7: 345-56.

He L, Wang X, Montell DJ. Shining light on *Drosophila* oogenesis: live imaging of egg development. Current Opinion in Genetics Development. 2011;21:612-19.

Henley SA, Dick FA. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. Cell Division. 2012;7:10-24.

Knoblich JA, Sauer K, Jones L, Richardson H, Saint R, Lehner CF. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during Drosophila embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. Cell.1994;77:107-120.

Kobayashi S, Yamada M, Asaoka M, Kitamura T. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline developmentin Drosophila. Nature. 1996;380:708-11.

Lara FJS, Tamaki H, Pavan C. Laboratory culture of *Rhynchosciara angelae*. Am Nature. 1965; 99:189-91.

Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication: polyploidy with purpose. Genes Development. 2009;23:2461-2477.

Lefevre G Jr. Salivary chromosome bands and the frequency of crossing over in Drosophila melanogaster. Genetics. 1971;67:497–513.

Lehner CF, ÓFarrell PH. Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. Cell. 1989;56:957-68.

Lehner CF, ÓFarrell PH. The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. Cell . 1990;61: 535-47.

Lilly MA, Duronio RJ. New insights into cell cycle control from the Drosophila endocycle. Oncogene. 2005;24:2765-75.

Lilly MA, Spradling AC. The *Drosophila* endocycle is controlled by cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. Genes Development. 1996;10:2514-26.

Lynch JA, Roth S. The evolution of dorsal-ventral patterning mechanisms in insects. Genes Development. 2011;25:107-18.

Lynn DE. Novel techniques to establish new insect cell lines. In Vitro Cell Development Biology Animal. 2001; 37:319-21.

Machado-Santelli GM, Basile R. Action of hydroxyurea on chromosome physiology in *Rhynchosciara angelae.* Genetica. 1978; 48: 131-135.

Machado-Santelli GM, Basile R. DNA replication and DNA puffs in salivary chromosomes of Rhynchosciara. Ciência e Cultura. 1975;27:167–74.

Machado-Santelli GM, Santelli RV. Oocyte Differentiation in *Rhynchosciara americana*. Cellular and Molecular Biology. 2000;46:145-50.

Mehrotra S, Maqbool SB, Kolpakas A, Murnen K, Calvi BR. Endocycling cells do not apoptose in response to DNA rereplication genotoxic stress. Genes Development. 2008;22:3158-71.

Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell. 2008;132:598–611.

Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell. 2004;116:221-34.

Nicolson S, Donna D, Kumar S. Ecdysone-mediated programmed cell death in *Drosophila*. The international journal of developmental biology. 2015;59:23-32.

Nonato E, Pavan C. A new species of *Rhynchosciara Rubsaamen*, 1894 (Diptera, Mycetophilidae). Revista Brasileira de Biologia. 1951;11:435-37.

Nordman J, Orr-Weaver TL, Regulation of DNA replication during development. Development. 2012;139:455-64.

Pavan C. Nucleic acid metabolism in polytene chromosome and problem of differentiation. Brookhaven Symposia in Biology. 1965;18:222-41.

Pavan C, Breuer ME. Polytene chromosomes in different tissues of *Rhynchosciara*. Journal of Heredity. 1952;63:151-7.

Pavan C, Da Cunha AB. Chromosomal activities in *Rhynchosciara* and other *Sciridae*. Annual Review of Genetics. 1969; 3:425-49.

Penalva LO, Yokosawa J, Stocker AJ, Soares MA, Graessmann M, Orlando TC, Winter CE, Botella LM, Graessmann A, Lara FJ. Molecular characterization of the C-3 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*. Gene. 1997;193:163–72.

Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: The megakaryocyte example. Journal of Cellular Physiology. 2002;190: 7–20.

Rezende-Teixeira P, Palomino NB, Machado-Santelli GM. Rananos expression pattern during oogenesis and early embryonic development in *Rhynchosciara americana*. Development Genes Evolution. 2012; 222:153-64.

Rodman TC. DNA replication in salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster* at successive larval and prepupal stages. Genetics. 1967;55:375–86.

Santelli RV, Siviero F, Machado-Santelli GM, Lara FJS, Stocker AJ. Molecular characterization of the B2 DNA puff gene of *Rhynchosciara americana*. Chromosoma. 2004;113:167-76.

Sallé J, Campbell SD, Gho M, Audibert A. Cyc A is involved in the control of endoreplication dynamics in the *Drosophila* bristle lineage. Development. 2012; 139:547-57.

Sauaia AM, Laicine EM, Alves MA, Hydroxiurea-induced inhibition of DNA puff development in the salivary gland chromosomes of *Bradysia hygida*. Chromosoma. 1971; 34:129-51.

Schafer KA. The cell cycle: a review. Vet Pathol.1998;35:461-78.

Simon CR, Siviero F, Monesi N. Beyond DNA puffs: what can we learn from studying sciarids?. Genesis. 2016;54:361-78.

Song L, Rape M. Substrate-specific regulation of ubiquitination by the anaphasepromoting complex. Cell Cycle. 2011;10:52-6.

Sprenger F, Yakubovich N, O'Farrel, PH. S-phase function of *Drosophila* cyclin A and its downregulation in G1 phase. Current Biology. 1997;7:488-99.

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

Stocker AJ, Pavan C. The influence of ecdysone on gene amplification, DNA synthesis, and formation in the salivary gland chromosomes of hynchosciara hollanderi. Chromosoma.1974;45:295-319.

Stocker AJ, Pueyo MT, Pereira SD, Lara FJS. Ecdysteroid titers and changes in chromosomal activity in the salivary glands of *Rhynchosciara americana*. Chromosoma. 1984; 90: 26-38.

Stormo BM, Fox DT. Polyteny: still a giant player in chromosome research. Chromosome Research. 2017;25:201-14.

Terra WR, De Bianch AG, Gambarini AG, Lara FJS. Haemolimph amino acids and related compounds during cocoon production by the larvae of fly *Rhynchosciara americana*. J. Insect Physiology. 1973;19:2097-106.

Touati SA, Cladiere D, Lister LM, Leontiou I, Chambon JP et al. Cyclin A2 is required for sister chromatid segregation, but not separase control, in mouse oocyte meiosis. Cell Reports 2012;2:1077–87.

Tyson JJ. Models of cell cycle control in eucaryotes. Journal Biotechnology. 1999; 71:239-44.

Weiss A. et al. Continuous Cyclin E expression inhibits progression through endoreduplication cycles in Drosophila. Current Biology. 1998;8:239–42.

Westendorf JM, Swenson KI, Ruderman JV. The role of cyclin B in meiosis I. J Cell Biol. 1989;108:1431-44.

Whitfield WGF, Cayetano G, Maldonado-Codina G, Glover DM. The A- and B-type cyclins of Drosophila are accumulated and destroyed in temporally distinct events that define separable phases of the G2-M transition. The EMBO Journal. 1990; 9:2563-72.

Winter CE, De Bianchi AG, Terra WR, Lara FJS. Relationships between newly synthesized proteins and puff patterns in salivar glands of *Rhynchosciara americana*. Chromosoma; 1977;61:193-206.

Wu X, Tanwar OS, Raftery LA. *Drosophila* follicle cells: morphogenesis in an eggshell. Seminars in Cell and Developmental Biology. 2008;19:271-82.

Zielke N, Edgar BA, De Pamphilis ML. Endoreplication.Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2013;5:129-48.

Zielke N, Querings S, Rottig C, Lehner C, Sprenger F. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. Genes Development. 2008; 22:1690-703.

Zhimulev IF, Belyaeva ES, Semeshin VF, Koryakov DE, Demakov SA, Demakova OV, Pokholkova GV, Andreyeva EN. Polytene Chromosomes: 70 years of genetic research. International Review of Cytology. 2004;241:203-75.