

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES  
PATOGENICOS

JOÃO VITOR CARDOSO ULIANA

**Caracterização inicial dos genes *Hox* em um Diptera basal**

RIBEIRÃO PRETO  
2023

JOÃO VITOR CARDOSO ULIANA

**Caracterização inicial dos genes *Hox* em um Diptera basal**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto para obtenção  
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e  
Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Nadia Monesi

RIBEIRÃO PRETO  
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Uliana, João Vitor Cardoso

Caracterização inicial dos genes *Hox* em um Diptera basal

Ribeirão Preto, 2023

109 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Nadia Monesi

1 genes *Hox*. 2 *Pseudolykoriella hygida*. 3 Sciaridae. 4 desenvolvimento embrionário

Uliana, J. V. C. **Caracterização inicial dos genes *Hox* em um Diptera basal.** 2023.  
100 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,  
Universidade de São Paulo, 2023.

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca examinadora:**

**Prof.Dr.:** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Clarice e João Batista, minha irmã Juliana e a minha avó, Lourdes. Pessoas que me deram amor, carinho, educação e sempre me incentivaram a sonhar.

## **AGRADECIMENTOS**

- Aos meus pais João Batista e Clarice pelo carinho e apoio. Sem vocês, a conclusão desta etapa não seria possível;
- À minha irmã, Juliana, pelo companheirismo, conselhos e ajuda nessa jornada;
- Ao meu tio Josué por estar presente em toda minha etapa formativa, do ensino fundamental até a pós-graduação;
- À professora Dr<sup>a</sup>. Nadia Monesi por abrir as portas de seu laboratório, pela excelente orientação e companheirismo;
- Aos meus amigos Carolina Higa, Bruna Fray e Felipe Tavares, pela amizade e companheirismo durante essa jornada;
- Aos meus colegas de laboratório Vitor, Amanda e Guilherme, pelas conversas e companheirismo;
- Agradeço a professora Dra. Lúcia Helena Faccioli pela disponibilidade do microscópio de fluorescência;
- Agradeço à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos pela estrutura e ensino ofertado;
- Agradeço a todos os professores presentes nesta etapa formativa por compartilharem seus conhecimentos e experiências;
- Agradeço a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, ao Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas e ao Laboratório de Biologia e Genômica de Diptera, local no qual este trabalho foi desenvolvido e ao Laboratório Multiusuários de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos (LMSeq);
- Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica) pela bolsa de estudos de nível mestrado (processo 130268/2019-4), à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio ao Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro ao Laboratório no qual esta pesquisa foi desenvolvida.

## RESUMO

Uliana, J.V.C. **Caracterização inicial dos genes *Hox* em um Diptera basal**. 2023. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Os genes *Hox* codificam fatores de transcrição que são altamente conservados em metazoários e são identificados pela presença de um domínio ligante de DNA denominado homeodomínio. Neste trabalho, foi realizada a caracterização inicial dos genes *Hox* no modelo não convencional *Pseudolycomorpha hygida* e nos sciarídeos *Bradysia tilicola* e *Bradysia cellarum*, dípteros que pertencem à infraordem Bibionomorpha. Em insetos, os *Hox* especificam a identidade dos segmentos corporais e são expressos em colinearidade espacial. Os genes *Hox* foram inicialmente identificados e caracterizados no modelo *Drosophila melanogaster*. Neste organismo esses genes encontram-se organizados em dois complexos gênicos denominados complexo *Antennapedia*, que compreende os genes *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Hox3* (compreende *zen2*, *zen* e *bicoid*), *Deformed (dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)*, *fushi tarazu (ftz)* e *Antennapedia (Antp)* e complexo *Bithorax*, que compreende os genes *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abdA)* e *Abdominal-B (AbdB)*. Em *D. melanogaster*, o complexo *Hox* encontra-se localizado no cromossomo III e os dois complexos gênicos são separados por um segmento genômico de 9.7 Mb. Neste trabalho, os genes *Hox* de *Psl. hygida* foram anotados e os transcritos foram identificados. Modelos gênicos foram montados manualmente a partir de dados obtidos com o software EMBOSS e as estruturas gênicas foram propostas. Porções dos genes *lab*, *Ubx*, *abdA* e *AbdB* foram clonadas no vetor pGEM-T a partir do DNA genômico ou cDNA de embriões de *Psl. hygida*. Estes clones foram empregados como ponto de partida para síntese de sondas utilizadas em experimentos de hibridação *in situ* de RNA em embriões. Experimentos de imunolocalização de proteínas foram realizados com a finalidade de caracterizar o padrão de expressão de *Antp*, *Ubx/abdA* e *AbdB* utilizando anticorpos comerciais contra as respectivas proteínas de *D. melanogaster*. Nossos resultados mostram que o complexo *Hox* de *Psl. hygida* e *B. tilicola* estão localizados no cromossomo X. Em *Psl. hygida*, o tamanho dos genes *Hox* varia de 109342 pb (*Scr*) a 266346 bp (*pb*) e isoformas de mRNA foram encontradas para todos os genes anotados. A análise das sequências polipeptídicas deduzidas demonstrou a presença do homeodomínio em praticamente todas as

isoformas anotadas. Os experimentos de imunolocalização demonstraram que Ubx e AbdA são expressos em pelo menos 7 segmentos, 2 da região torácica (T2 e T3) e pelo menos 5 da região caudal, enquanto que a expressão da proteína Antp é detectada nos 3 segmentos torácicos (T1 a T3) e nos demais segmentos abdominais. Não foi possível detectar a expressão de AbdB com o anticorpo empregado, o que pode ser explicado pela baixa conservação desta proteína entre *Psil. hygida* e *D. melanogaster*. Diferentemente do que foi observado em outros Dípteros, nosso estudo sugere que em Sciarídeos o complexo *Hox* encontra-se localizado no cromossomo sexual (X). A organização dos genes *Hox* em *Psil. hygida* revelou que os genes *lab*, *pb* e *Dfd* sofreram uma translocação e uma inversão. Este rearranjo aparentemente não afetou o padrão de expressão dos genes *Hox* ao longo do eixo anteroposterior indicando conservação da colinearidade espacial na região investigada do *locus Hox* de *Psil. hygida*. Em conjunto, os dados obtidos são relevantes e consistem na primeira investigação acerca do complexo *Hox* em sciarídeos.

**Palavras-Chave:** genes *Hox*, *Pseudolycoriella hygida*, Sciaridae e desenvolvimento embrionário



## ABSTRACT

Uliana, J.V.C. **Initial characterization of *Hox* genes in a lower Diptera**. 2023. Dissertation (Master). Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

The *Hox* genes encode highly conserved metazoan transcription factors which are identified by the presence of a DNA-binding domain named the homeodomain. In this study, we present the initial characterization of the *Hox* genes in the unconventional model organism, *Pseudolycoriella hygida*, and also in the sciarids *Bradysia tilicola* and *Bradysia cellarum*, all dipterans that belong to the Biobionomorpha infraorder. In insects, the *Hox* genes specify the identity of body segments and are expressed according to spatial collinearity. The *Hox* genes were initially identified and characterized in the model organism *Drosophila melanogaster*. In this organism the *Hox* genes are organized into two gene complexes named the Antennapedia complex, which comprises *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Hox3* (comprises *zen2*, *zen* and *bicoid*), *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)*, *fushi tarazu (ftz)* and *Antennapedia (Antp)* and the Bithorax complex which comprises the *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abdA)* and *Abdominal-B (AbdB)* genes. In *D. melanogaster*, the *Hox* complex is located on chromosomes III and the two gene complexes are separated by a 9.7 Mb genomic segment. In this work, the *Psl. hygida* *Hox* genes were annotated and the transcripts identified. Gene models were manually assembled using the results obtained using the EMBOSS software and gene structures were proposed. Partial sequences of the *lab*, *Ubx*, *abdA* and *AbdB* genes were cloned into the pGEM-T vector using as a starting point genomic DNA or cDNA from *Psl. hygida* embryos. These clones were employed as templates for the synthesis of probes that were used *in situ* hybridization experiments. Protein immunolocalization experiments were performed in order to characterize the pattern of expression of Antp, Ubx/abdA and AbdB using commercial antibodies against *D. melanogaster* proteins. Our results reveal that the *Psl. hygida* and *B. tilicola* *Hox* complexes are located on the X chromosome. In *Psl. hygida*, the size of the *Hox* genes ranged from 109342 bp (*Scr*) to 266346 bp (*pb*) and isoforms were found for all annotated genes. The analysis of the deduced polypeptide sequences revealed the presence of the homeodomain in almost all annotated isoforms. The immunolocalization experiments showed that Ubx and AbdA are expressed in at least 7 segments, 2 in the thoracic region (T2 and T3) and at least 5 in the caudal region, while the expression of the Antp protein is detected in the 3 thoracic

segments (T1 to T3) and all abdominal segments. It was not possible to detect AbdB expression with the antibody that we used, which can be explained by the low conservation of this protein between *Psil. hygida* and *D. melanogaster*. Unlike what has been observed in other Diptera, our study suggests that in sciarids the *Hox* complex is located in the sexual chromosome (X). The organization of *Hox* genes in *Psil. hygida* indicates that the *lab*, *pb* and *Dfd* genes underwent a translocation and inversion. This rearrangement apparently did not impact on the pattern of expression of *Hox* genes along the anteroposterior axis, indicating that the spatial collinearity is conserved in the region investigated in the *Hox locus* of *Psil. hygida*. Taken together, the results of this work are relevant and constitute the first investigation carried out on the *Hox* complex in sciarids.

**Keywords:** *Hox* genes, *Pseudolykoriella hygida*, Sciaridae and embryonic development

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> O ciclo de vida de <i>Pseudolycoriella hygida</i> .....	19
<b>Figura 2:</b> Desenvolvimento embrionário de <i>Psl. hygida</i> analisado por microscopia de luz acoplada a DIC. ....	22
<b>Figura 3:</b> Desenvolvimento embrionário de <i>Psl. hygida</i> analisado por microscopia de fluorescência. ....	22
<b>Figura 4:</b> Resumo da metodologia de anotação dos genes <i>Hox</i> em <i>Psl. hygida</i> .....	32
<b>Figura 5:</b> Representação gráfica da estrutura do gene <i>labial</i> de <i>Psl. hygida</i> .....	51
<b>Figura 6:</b> Alinhamento das sequências polipeptídicas preditas dos genes homeóticos de <i>Psl. hygida</i> .....	53
<b>Figura 7:</b> Representação gráfica da estrutura do gene <i>proboscipedia</i> de <i>Psl. hygida</i> .....	54
<b>Figura 8:</b> Representação gráfica da estrutura do gene <i>Deformed</i> de <i>Psl. hygida</i> .....	55
<b>Figura 9:</b> Representação gráfica da estrutura do gene <i>Sex Combs Reduced</i> de <i>Psl. hygida</i> .....	55
<b>Figura 10:</b> Representação gráfica da estrutura do gene <i>Antennapedia</i> de <i>Psl. hygida</i> .....	56
<b>Figura 11:</b> Representação gráfica da estrutura do gene <i>Ultrabithorax</i> de <i>Psl. hygida</i> . ....	57
<b>Figura 12:</b> Representação gráfica da estrutura do gene <i>abdominal-A</i> de <i>Psl. hygida</i> .....	58
<b>Figura 13:</b> Representação gráfica da estrutura do gene <i>Abdominal-B</i> de <i>Psl. hygida</i> . ....	60
<b>Figura 14:</b> Organização do locus <i>Hox</i> em <i>Psl. hygida</i> , <i>B. tilicola</i> e <i>B. cellarum</i> .....	62
<b>Figura 15:</b> Representação das regiões amplificadas e clonadas no vetor pGEM-T dos genes <i>Hox</i> de <i>Psl. hygida</i> .....	65
<b>Figura 16:</b> Análise do padrão de restrição dos clones <i>Hox</i> obtidos a partir de DNA genômico.....	66
<b>Figura 17:</b> Clonagem parcial dos genes <i>Ubx</i> , <i>abdA</i> e <i>AbdB</i> a partir de cDNA de embriões de <i>Psl. hygida</i> .....	67
<b>Figura 18:</b> Resultado do sequenciamento do recombinante <i>Ubx.1</i> .....	69
<b>Figura 19:</b> Resultado do sequenciamento do recombinante <i>abdA.1</i> .....	70
<b>Figura 20:</b> Resultado do sequenciamento do recombinante <i>abdA.2</i> .....	71
<b>Figura 21:</b> Resultado do sequenciamento do recombinante <i>abdA.3</i> .....	72
<b>Figura 22:</b> Resultado do sequenciamento do recombinante <i>AbdB.2</i> .....	73
<b>Figura 23:</b> Padrão de expressão da proteína engrailed em embriões de <i>Psl. hygida</i> .....	75
<b>Figura 24:</b> Padrão de expressão da proteína Antennapedia em embriões de <i>Psl. hygida</i> .....	78
<b>Figura 25:</b> Padrão de expressão da proteína Ultrabithorax e abdominal-A em embriões de <i>Psl. hygida</i> . ....	79
<b>Figura 26:</b> Comparação entre o padrão de expressão de Antennapedia e Ultrabithorax-abdominal-A em embriões de <i>Psl. hygida</i> .....	80

<b>Figura 27:</b> Detecção de proteínas Hox em extratos de proteína total de embriões de <i>Pseudolykoriella hygida</i> .....	80
<b>Figura 28:</b> Experimento de imunolocalização de AbdB em embriões de <i>Pseudolykoriella hygida</i> e <i>Drosophila melanogaster</i> .....	81
<b>Figura 29:</b> Alinhamento entre AbdB de <i>Pseudolykoriella hygida</i> e o polipeptídeo imunogênico utilizado para obtenção do anticorpo anti-AbdB de <i>D. melanogaster</i> ...	81
<b>Figura 30:</b> Experimentos de hibridação <i>in situ</i> em embriões de <i>Pseudolykoriella hygida</i> e <i>Drosophila melanogaster</i> .....	83

## LISTA DE EQUAÇÕES E TABELAS

<b>Equação 1:</b> Cálculo do tempo de hidrólise das sondas senso e anti-senso sintetizadas .....	39
<b>Tabela 1:</b> Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR .....	34
<b>Tabela 2:</b> Modificações testadas no protocolo de hibridação <i>in situ</i> em <i>Pseudolykoriella hygida</i> .....	47
<b>Tabela 3:</b> Coordenada dos genes <i>Hox</i> no genoma de <i>Pseudolykoriella hygida</i> .....	50
<b>Tabela 4:</b> Resultado de BLASTp no banco nr do NCBI, utilizando como sequência de busca os polipeptídeos <i>Hox</i> de <i>PsI. hygida</i> .....	52
<b>Tabela 5:</b> Resumo dos dados da anotação dos genes <i>Hox</i> de <i>PsI. hygida</i> .....	61
<b>Tabela 6:</b> Coordenadas dos genes <i>Hox</i> em <i>Bradysia tilicola</i> .....	63
<b>Tabela 7:</b> Coordenadas aproximadas dos genes <i>Hox</i> <i>Bradysia cellarum</i> .....	64

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo I:</b> Descrição das sequências utilizadas na busca por ortólogos de Hox no transcriptoma de <i>Pseudolykoriella hygida</i> .....	104
<b>Anexo II:</b> Descrição das sequências utilizadas na busca por ortólogos de Hox no genoma de <i>Bradysia tilicola</i> .....	107
<b>Anexo III:</b> Principais reagentes e Kits empregados para as realizações dos experimentos descritos neste trabalho.....	108
<b>Anexo IV:</b> Representação gráfica de uma região do Cromossomo X de <i>Pseudolykoriella hygida</i> .....	109

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 A família Sciaridae	15
1.2 Sciarídeos como modelo de estudo no Brasil	16
1.3 O sciarídeo <i>Pseudolycoriella hygida</i> como modelo de estudo	18
1.4 O desenvolvimento embrionário de <i>Pseudolycoriella hygida</i>	20
1.5 A cascata de segmentação em insetos	23
1.6 Os genes Hox	24
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1. Cultura de <i>Pseudolycoriella hygida</i> e coleta de embriões	29
3.2. Cultivo de <i>D. melanogaster</i>	30
3.3. Anotação dos genes <i>Hox</i> em <i>Pseudolycoriella hygida</i>	30
3.4. Anotação do locus <i>Hox</i> de <i>Bradysia tilicola</i> e <i>Bradysia cellarum</i>	32
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	33
3.6. Extração de RNA total e síntese de cDNA	34
3.7. Eletroforese em gel de agarose	35
3.8. Purificação em gel de fragmentos de interesse	35
3.9. Quantificação em gel dos fragmentos purificados	35
3.10. Preparo de bactérias competentes pela metodologia de Inoue H. et al., 1990	35
3.11. Transformação de bactérias competentes, cepa <i>DH5<math>\alpha</math></i> , pela metodologia de Inoue H. et al., 1990	36
3.12. Mini-preparação de DNA plasmidial	37
3.13. Digestão do DNA com enzimas de restrição	37
3.14. Reações de Sequenciamento	37
3.15. Síntese das sondas <i>senso</i> e <i>anti-senso</i>	38
3.16. Preparo de extratos de proteínas de embriões de <i>Psl. hygida</i>	39
3.17. SDS-PAGE e <i>western blot</i>	40
3.18. Fixação e permeabilização de embriões de <i>Psl. hygida</i> (Uliana et al., 2018)	41
3.19. Condicionamento de fêmeas e coletas de embriões de <i>D. melanogaster</i> para experimentos de hibridização <i>in situ</i>	42
3.20. Protocolo de imunolocalização em embriões de <i>Pseudolycoriella hygida</i> e <i>Drosophila melanogaster</i>	44
3.21. Hibridação <i>in situ</i> em embriões de <i>Pseudolycoriella hygida</i> e <i>Drosophila melanogaster</i>	45
3.22 Documentação	48
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
4.1. Anotação e organização dos genes <i>Hox</i> em sciarídeos	50
4.1.1. Anotação dos genes <i>Hox</i> em <i>Pseudolycoriella hygida</i>	51

4.1.2 Organização dos genes <i>Hox</i> em <i>Ps. hygida</i> , <i>B. tilicola</i> e <i>B. cellarum</i> .....	62
4.2 Clonagem dos genes <i>Hox</i> de <i>Pseudolykoriella hygida</i> .....	64
4.3 Padrão de expressão dos genes <i>Hox</i> durante o desenvolvimento embrionário de <i>Pseudolykoriella hygida</i> .....	74
4.3.1 Padronização de experimentos de Imunolocalização de proteínas em <i>Ps. hygida</i> .....	74
4.3.2 Padrão de expressão de Antennapedia, Ultrabithorax/abdominal-A e Abdominal-B .....	76
4.3.3 Experimentos de hibridação <i>in situ</i> em embriões de <i>Pseudolykoriella hygida</i> .....	82
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>84</b>
5.1 ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>HOX</i> EM SCIARÍDEOS .....	84
5.2 OS GENES <i>Hox</i> DE <i>Pseudolykoriella hygida</i> .....	87
5.3 HIBRIDAÇÃO <i>in situ</i> EM EMBRIÕES DE <i>Ps. hygida</i> .....	88
5.4 PADRÃO DE EXPRESSAO DE Antp E Ubx/abdA.....	90
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>7 TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>94</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>104</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A família Sciaridae

Uma das ordens mais diversas da classe Insecta é a ordem Diptera, a qual compreende as moscas verdadeiras. Durante a evolução, os dípteros ocuparam praticamente todos os nichos terrestres, tornando-os um dos grupos de organismos mais bem sucedidos da Terra (KIRK-SPRINGGS, 2017). Esta ordem é diversa tanto no que se refere ao número de espécies, quanto à história evolutiva, diversidade de comportamentos, hábitos alimentares, impactos na espécie humana e adaptações morfológicas. Foram descritas aproximadamente 158.000 espécies de dípteros que se encontram distribuídas em mais de 180 famílias (WIEGMANN; RICHARDS, 2018).

Estima-se que em cada 10 espécies encontradas no planeta Terra, uma pertença à ordem Diptera (WIEGMANN *et al.*, 2011). Desta ordem fazem parte a mosca doméstica (família Muscidae), as varejeiras (família Calliphoridae), os mosquitos ou pernalongos (família Culicidae), os borrachudos (família Simuliidae) e o organismo modelo *Drosophila melanogaster* (família Drosophilidae) (WIEGMANN *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012). Classicamente a ordem Diptera foi subdividida em Nematocera, ou dípteros basais e os dípteros superiores na sub-ordem Brachycera. A filogenia mais atual da ordem Diptera propõe a classificação dos dípteros basais em quatro infraordens Tipulomorpha, Culicomorpha, Psychodomorpha, Bibionomorpha e os dípteros derivados na subordem Brachycera, (WIEGMANN *et al.*, 2011; WIEGMANN; YATES, 2017).

Nosso laboratório utiliza como modelo de estudo o díptero *Pseudolykoriella hygida* (Sauaia e Alves, 1968) comb. nov., um membro da subfamília Sciaridae que pertence à infraordem Bibionomorpha. Os sciarídeos estão presentes em praticamente em todos habitats terrestres (MENZEL; SMITH, 2017). Estima-se que a família Sciaridae compreenda cerca de 20000 espécies das quais apenas cerca de 3000 foram descritas (VILKAMAA *et al.*, 2023). Na natureza, larvas de sciarídeos apresentam papel relevante e atuam como decompositores nas cadeias tróficas de solo (SEEBER *et al.*, 2004). Acerca do papel ecológico, estes organismos podem também atuar como polinizadores (KOSCHNITZKE, 2018) e merecem ser melhor investigados. No solo, larvas de diferentes espécies de sciarídeos utilizam diferentes fontes de alimento, que incluem desde matéria orgânica em decomposição até fungos e plantas vivas (SHIN *et al.*, 2013). Algumas espécies de sciarídeos constituem pragas

importantes de culturas de cogumelos comestíveis, viveiros de plantas e diferentes tipos de plantações (LEE *et al.*, 2010, SHIN *et al.*, 2013; ANDREADIS *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017; KATUMANYANE; MALAN, 2018; CHEN *et al.*, 2018; BABYTSKIY *et al.*, 2019). No Brasil, foi apontado que insetos adultos da subfamília Sciaridae podem atuar como disseminadores de microrganismos fitopatogênicos e que as larvas podem atacar o sistema radicular de plantas cultivadas em estufas (TAVARES *et al.*, 2012; RADIN *et al.*, 2009; BRAGA *et al.*, 2006). Tem-se observado grandes quantidades de adultos de sciarídeos em culturas de banana, café e cacau, próximos de locais onde há restos de plantas em decomposição e folhas secas acumuladas, porém, os danos a estes cultivos não foram investigados (MENZEL; SMITH, 2017). Estes organismos podem ser facilmente transportados de um local para o outro através da atividade humana, podendo se adaptar ao ambiente urbano ou rural, onde podem encontrar condições ótimas para o desenvolvimento e também constituírem pragas em monoculturas agrícolas, cultivos de cogumelos e viveiros (MENZEL; SMITH, 2017; BABYTSKIY *et al.*, 2019).

## **1.2 Sciarídeos como modelo de estudo no Brasil**

A maior parte dos estudos moleculares que utilizaram diferentes espécies de sciarídeos como modelo no nosso país voltou-se para o entendimento da biologia de pufes de DNA. Pufes de DNA são formados nos cromossomos politênicos das glândulas salivares no final do desenvolvimento larval e são observados ao microscópio como regiões de descompactação da cromatina. Os pufes de DNA foram inicialmente caracterizados, em nível citológico, em *Rhynchosciara americana* como regiões do genoma onde ocorre o acúmulo de cópias adicionais de DNA (BREUER; PAVAN, 1955) o que foi corroborado por uma série de estudos moleculares em diferentes espécies de sciarídeos, tanto no Brasil como no exterior (GERBI *et al.*, 1993; LARA, STOCKER; AMABIS, 1991; STOCKER *et al.*, 1996, MONESI *et al.*, 2009; SIMON *et al.*, 2016). Diferentemente de regiões formadoras de pufes de RNA, de ocorrência geral em dípteros e cuja formação é temporalmente associada à transcrição dos genes localizados nestes *loci*, a expansão e regressão dos pufes de DNA está associada à transcrição abundante de genes que são amplificados de modo regulado no desenvolvimento nestes *loci* (GERBI *et al.*, 1993; LARA *et al.*, 1991; STOCKER *et al.*; 1996, MONESI *et al.*, 2009; SIMON *et al.*, 2016). Estudos em



diferentes sciarídeos sugerem que a amplificação gênica constitui o mecanismo selecionado que permite em um curto intervalo de tempo a síntese abundante de proteínas utilizadas pela larva para a construção do pupário no qual ocorre a metamorfose (WINTER *et al.*, 1980; DE-ALMEIDA, 1997; FONTES *et al.*, 1999; ANDRIOLI; GORAB; AMABIS, 2008; MONESI *et al.*, 2004; WINTER *et al.*, 1977a; WINTER *et al.*, 1977b)

Além de terem contribuído para o entendimento da biologia dos pufes de DNA, estudos em sciarídeos também ampliaram o entendimento acerca de outros processos de ocorrência geral em dípteros que incluem *imprinting* e eliminação cromossômica e determinação sexual, organização de DNA ribossomal e expressão de genes ribossomais, organização de telômeros, organização cromossômica, caracterização de peptídeos antimicrobianos, morte celular programada, resistência a inseticidas, genômica comparada e secreção de enzimas capazes de degradar a parede celular de fungos e plantas (SIMON *et al.*, 2016; PRZEPIURA *et al.*, 2020; BADARACCO; GORAB, 2020; MIAO *et al.*, 2020, URBAN *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2022; TRINCA *et al.*, 2022; GERBI, 2022; TRINCA *et al.*, 2023).

Poucos estudos foram realizados para investigar a biologia do desenvolvimento embrionário de sciarídeos no Brasil. Nesse caso, destacam-se os trabalhos realizados em *Rhynchosciara americana* nos quais foram investigados o período em que ocorre o início da transcrição em embriões, o padrão de expressão de genes que atuam na determinação do eixo dorso-ventral, o desenvolvimento de primórdios de células germinativas, polaridade de segmentos e mais recentemente a organização e composição das junções celulares em embriões (VANARIO-ALONSO *et al.*, 1991; VANARIO-ALONSO *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2005; REZENDE-TEIXEIRA *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2021). Em *R. americana*, o desenvolvimento embrionário leva 12 dias e a descrição morfológica revelou que neste sciarídeo a extensão da banda germinativa ocorre concomitantemente com a segmentação (CARVALHO *et al.*, 1999). Outro conjunto de estudos realizados no Brasil investigou os processos envolvidos na eliminação de cromossomos durante o desenvolvimento embrionário de *Bradysia ocellaris* processo que também ocorre em *Bradysia tilicola*, LOEW, 1850 (= *Sciara coprophila* Lintner, 1895), sciarídeo no qual foi amplamente investigado e a descrição da cutícula que envolve o ovo de *Bradysia aprica* (MORI, 1979; MORI; PERONDINI, 1980; PERONDINI *et al.*, 1986; PERONDINI *et al.*, 1987; CARCUPINO;

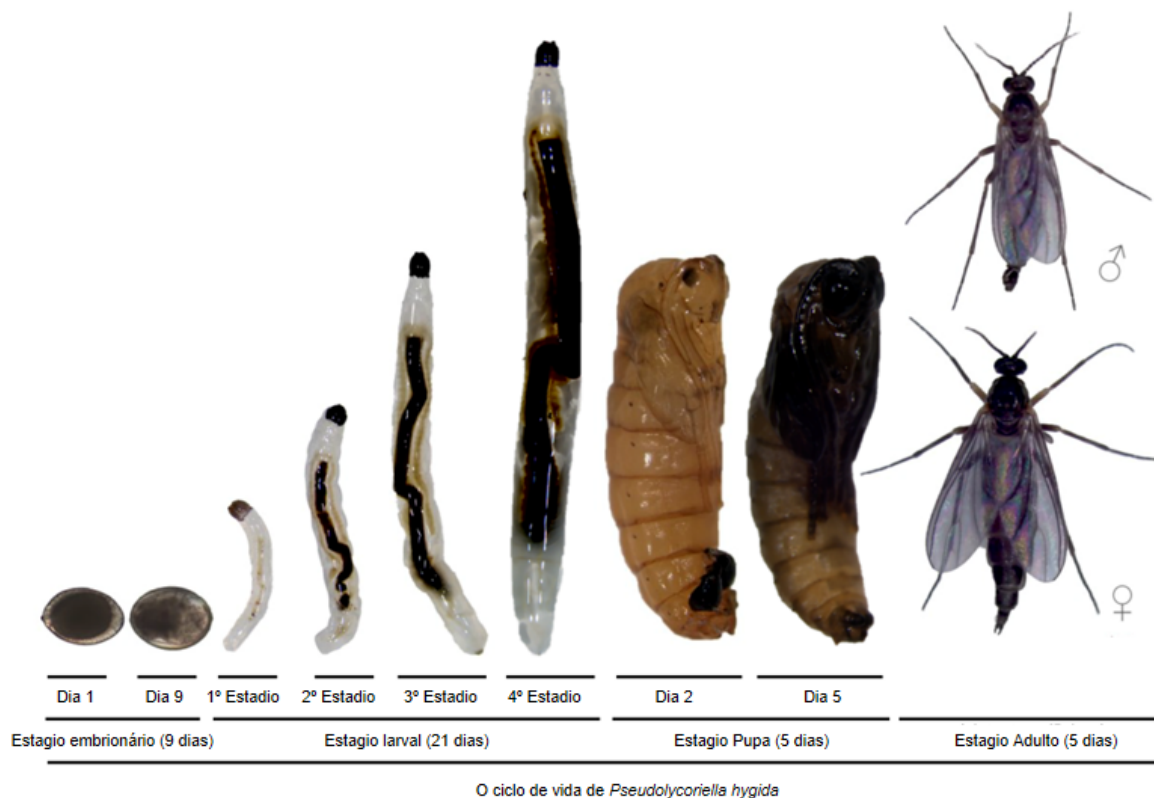
LUCCHI, 1994; GERBI *et al.*, 2022). Nesse contexto, a presente dissertação visa ampliar o conhecimento acerca do desenvolvimento embrionário de *Psil. hygida*, um organismo modelo mantido em cultura no laboratório há mais de cinco décadas e para os quais existem poucas informações acerca das etapas iniciais do desenvolvimento.

### 1.3 O sciarídeo *Pseudolykoriella hygida* como modelo de estudo

Nosso laboratório utiliza o sciarídeo *Pseudolykoriella hygida* como modelo de estudo. Este sciarídeo foi isolado no campus da USP de Ribeirão Preto em 1965 (SAUAIA; ALVES, 1968) e foi corretamente classificado como pertencente ao gênero *Bradysia* de acordo com as informações taxonômicas disponíveis na época. O gênero *Bradysia*, consiste em um dos grupos mais controversos morfologicamente (MOHRING *et al.*, 2019). Estudos moleculares e morfológicos recentes resultaram na reclassificação deste organismo como pertencente ao gênero *Pseudolykoriella*, passando a ser nomeada como *Pseudolykoriella hygida* (SAUAIA; ALVES, 1968) comb. nov., (TRINCA *et al.*, 2023). Dentre os diferentes sciarídeos estudados no Brasil, *Psil. hygida* é a única espécie mantida continuamente em cultivo em laboratório. O ciclo de vida de *Psil. hygida* é mostrado na figura 1. Ao todo, o ciclo de vida dura cerca de 41 dias, à 22 °C e compreende os estágios embrionário, larval, pupal e adulto. Nesta temperatura, o desenvolvimento embrionário dura 9 dias (ULIANA *et al.*, 2018). O desenvolvimento larval dura cerca de 22 dias e compreende quatro estádios larvais delimitados por três mudas (LAICINE *et al.*, 1984). Finalmente, o estágio pupal dura 5 dias e o estágio adulto 5 dias (LAICINE *et al.*, 1984; ULIANA *et al.*, 2018; TRINCA *et al.*, 2023).

Conforme explicado anteriormente, de modo semelhante ao que ocorreu nos outros grupos brasileiros que utilizaram sciarídeos como modelo, grande parte dos estudos em *Psil. hygida* foi dedicada ao estudo da biologia de pufes de DNA (MONESI *et al.*, 2009; SIMON *et al.*, 2016). Diferentemente de muitos dípteros que são utilizados como modelos de estudo não convencionais, *Psil. hygida* apresenta um mapa citológico dos cromossomos politênicos de glândulas salivares de larvas de quarto estágio de ótima qualidade (SAUAIA, 1971) e cariótipo determinado a partir da análise dos cromossomos de células mitóticas de gânglio nervoso (BORGES *et al.*, 2000; GASPAR *et al.*, 2002). Adicionalmente, a análise citológica do padrão temporal e tecidual de formação dos pufes de DNA e RNA de *Psil. hygida* durante o quarto estágio larval foi realizada de modo minucioso (RIZZO, 1980; LAICINE *et al.*, 1984; DE-

ALMEIDA *et al*, 2010). Infelizmente, grande parte dos dados citológicos a respeito de *Psil. hygida* não foram publicados e estão disponíveis apenas em teses.



**Figura 1: O ciclo de vida de *Pseudolycoiriella hygida*.** Figura adaptada de Trinca *et al.* 2023.

Mais recentemente, estudos genômicos em *Psil. hygida* têm revelado novos *insights* acerca da biologia e evolução de sciarídeos. A caracterização do genoma mitocondrial de *Psil. hygida* revelou que se trata de um genoma circular de cerca de 40 Kb, o que constitui o maior mitogenoma de insetos caracterizado até o momento (TRINCA *et al.*, 2022). A região codificadora compreende cerca de 16 Kb e foi inteiramente sequenciada, enquanto que a região controladora apresenta cerca de 21 Kb e é provavelmente composta por sequências repetitivas. Neste mesmo estudo, uma filogenia que empregou 29 sequências de genomas mitocondriais de dípteros da infraordem Bibionomorpha suportou a monofilia da subfamília Sciaridae e permitiu identificar rearranjos ocorridos nos genes mitocondriais específicos das subfamílias de sciarídeos que foram incluídas na análise. Ainda, nas filogenias montadas, *Psil. hygida* não agrupou com os sciarídeos do gênero *Bradysia* (TRINCA *et al.*, 2022) o

que levou posteriormente, em combinação com dados morfológicos, à reclassificação deste sciarídeo.

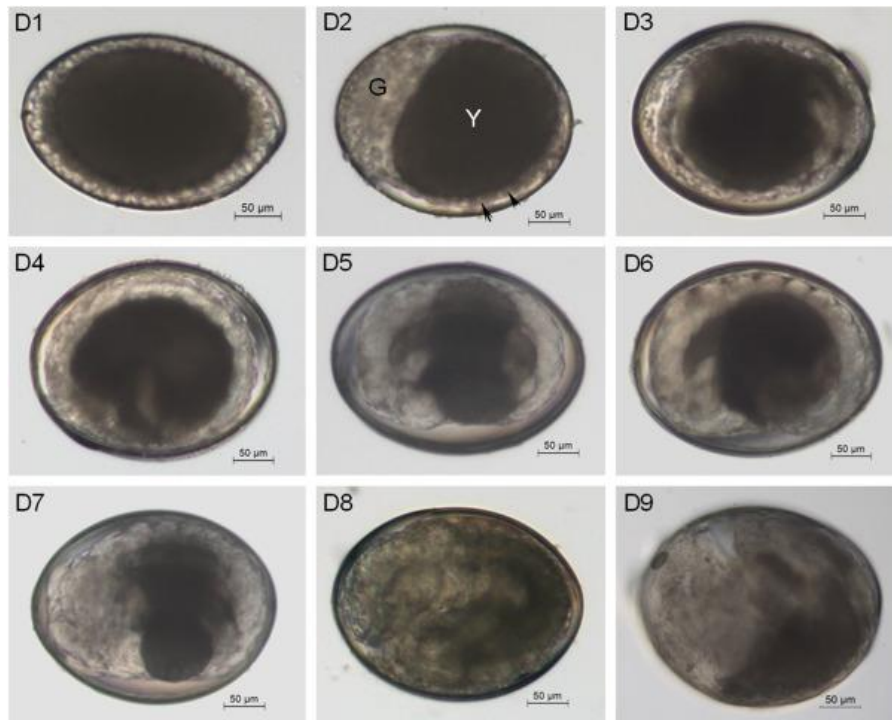
O genoma nuclear de *Psil. hygida* foi também sequenciado utilizando-se as técnicas de sequenciamento *Illumina*, *PacBio* e *Illumina-Hi-C* (TRINCA *et al.*, 2023). O genoma (609 Mb) foi montado em nível de cromossomos e apresenta alta qualidade (N50 = 2; L50 = 155.796.291 pb). Cerca de 62,66 % do genoma é composto por sequências repetitivas. As análises BUSCO revelaram que o genoma está pelo menos 94,6 % completo. Buscas realizadas nesta montagem utilizando genes previamente caracterizados possibilitaram a identificação dos *scaffolds* genômicos pertencentes aos cromossomos A, B e C, sendo que o cromossomo X foi inicialmente identificado por eliminação, o que foi confirmado comparando-se os dados genômicos com os dados disponíveis do cariótipo (BORGES *et al.*, 2000). A anotação do genoma utilizou dados de RNAseq de bibliotecas de diferentes estágios do desenvolvimento (embriões, larvas, pupas e adultos), vários tecidos larvais (glândulas salivares, gânglio nervoso, intestino e corpo gorduroso) e diferentes condições de cultivo (terra e areia) e resultou na anotação de 17881 genes preditos (TRINCA *et al.*, 2023).

No laboratório, as larvas de *Psil. hygida* migram em grupos e secretam saliva continuamente no meio de cultivo que é composto por folhas de *Ilex paraguariensis* parcialmente decompostas. Um estudo multi-ômico, associado a ensaios enzimáticos e análise de proteoma da saliva da larva, mostrou que a saliva das larvas de *Psil. hygida* é rica em CAZymes (*carbohydrate-active enzymes*), capazes de atuar na degradação da parede celular fúngica e vegetal. Os dados obtidos contribuem para a elucidação das bases bioquímicas da degradação de biomassa por sciarídeos e corroboram o papel de decompositor desempenhado por sciarídeos em cadeias tróficas de solo (TRINCA *et al.*, 2023).

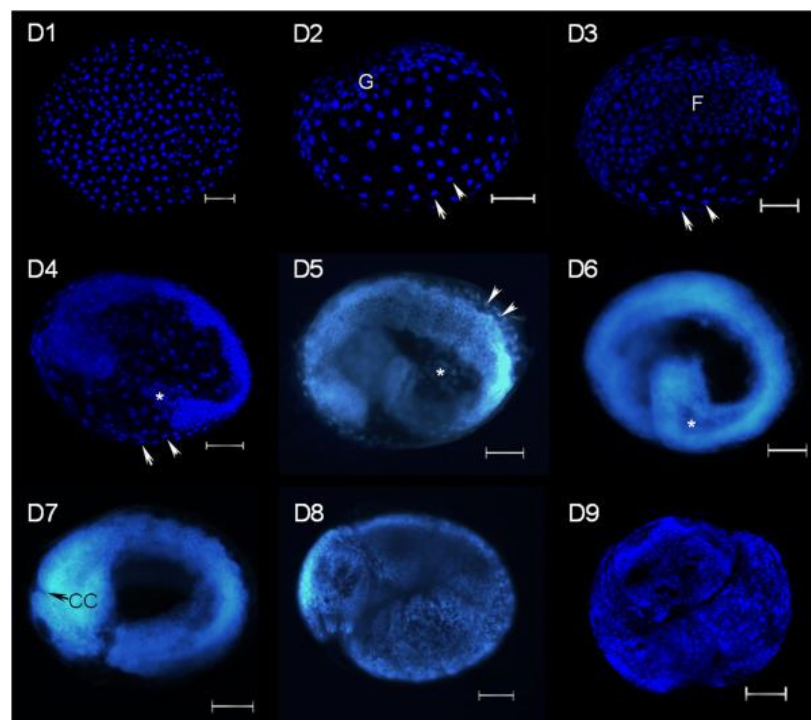
#### **1.4 O desenvolvimento embrionário de *Pseudolycoriella hygida***

Estudos iniciais acerca do desenvolvimento embrionário de *Psil. hygida* sugeriram que o estágio embrionário apresentava uma duração de 8 a 10 dias e propuseram a classificação dos embriões em três fases (préblastula, blástula e celular) (da CONCEIÇÃO SILVA; FERNANDEZ, 2000). Há alguns anos, nosso laboratório ampliou a caracterização do desenvolvimento embrionário utilizando microscopia DIC e microscopia de fluorescência (figuras 2 e 3). O desenvolvimento

embrionário de *Pseudolycorella hygida* dura cerca de 9 dias a 22 °C. No período de 0 a 24 horas, os embriões encontram-se em blástula. Em embriões com 24 – 48 horas duas populações de células são observadas, as células da serosa e as células da banda germinativa, que originarão o embrião propriamente dito. A gastrulação ocorre entre 48 e 72 horas. O início da segmentação dos embriões ocorre entre 72 – 96 horas, podendo-se nessa idade, observar com clareza a porção anterior e posterior da futura larva. Nessa idade também é possível observar um grupo de células na porção posterior que aumenta de tamanho e ingressa na porção caudal do embrião, que possivelmente corresponde às células germinativas. Em embriões com 168 – 192 horas é possível observar uma fenda na região cefálica da larva, que pode ser utilizada como um marcador desta idade. Após 192 horas de desenvolvimento, a região cefálica da larva se apresenta totalmente desenvolvida e após 216 horas a larva eclode (ULIANA *et al.*, 2018). O embrião de *Ps. hygida* é revestido por células da serosa que secretam uma cutícula serosal que protege o embrião contra dessecação. Marcações realizadas com Calcofluor White (marcador de quitina) revelaram a presença de quitina na cutícula serosal dos embriões de *Ps. hygida* e dados de transcriptoma indicaram que transcritos de enzimas da via de síntese de quitina são expressos durante o desenvolvimento embrionário de *Ps. hygida* (ULIANA *et al.* 2018).



**Figura 2: Desenvolvimento embrionário de *Psil. hygida* analisado por microscopia de luz acoplada a DIC.** D1 a D9 refere-se ao dia do desenvolvimento embrionário. Em D2, G destaca a banda germinativa e Y o vitelo (reproduzido de ULIANA *et al.*, 2018).



**Figura 3: Desenvolvimento embrionário de *Psil. hygida* analisado por microscopia de fluorescência.** D1 a D9 refere-se ao dia do desenvolvimento embrionário. Em D2, G destaca a banda germinativa. Em D3, F destaca o local por onde as células ingressam para o interior do embrião durante a gastrulação. Em D4 as setas apontam para os núcleos das células da serosa e o \* destaca as células germinativas na porção final caudal. Em D5 as setas apontam para os segmentos dos embriões e o \* destaca as células germinativas na porção final da cauda. Em D7 a seta aponta para a fenda cefálica (ULIANA *et al.*, 2018).

## 1.5 A cascata de segmentação em insetos

A biologia evolutiva e do desenvolvimento (evo-devo) é o campo da biologia que aborda os processos que promovem o desenvolvimento do organismo, os mecanismos moleculares envolvidos e as mudanças morfológicas que ocorreram durante a evolução (HEFFER; PICK, 2013).

A embriogênese é um processo complexo no qual uma única célula fertilizada passa por divisões celulares e diferenciação para se tornar um embrião maduro (CRIDGE *et al.*, 2019). O desenvolvimento embrionário tridimensional de um organismo nos eixos ântero-posterior, dorso-ventral e direita-esquerda requer a atuação de um grande número de moléculas como fatores de transcrição, reguladores epigenéticos, receptores celulares e moléculas de sinalização e adesão (HAJIRNIS; MISHRA, 2021). Já em 1952, foi discutido por Alan Turing, utilizando modelos matemáticos, que um zigoto esférico definiria sua morfologia através da atuação de moléculas chamadas de morfógenos. Estes morfógenos atuariam como substâncias presentes nas células do embrião que durante a morfogênese reagem quimicamente umas com as outras ou se difundem de uma região com maior concentração do morfógeno para uma região com menor concentração (TURING, 1952).

No desenvolvimento embrionário, o estabelecimento do plano corporal é coordenado por um complexo conjunto de interações reguladas de genes. Essas interações produzem uma cascata de ativação que incluem desde os genes maternos até genes os genes zigóticos, os quais são os responsáveis pela determinação dos eixos básicos do embrião (CRIDGE *et al.*, 2019). Neste contexto, conjuntos de interações gênicas estabelecem uma rede hierárquica no desenvolvimento que coordenam o desenvolvimento de estruturas e regiões específicas do organismo (CRIDGE *et al.*, 2019). A organização em segmentos corporais ao longo do eixo anteroposterior está presente nos três maiores filos animais, Anelídea, Artropoda e Vertebrata (DAMEN, 2007). Todos os organismos possuem um conjunto ferramentas genéticas básicas (em inglês, “genetic toolkit”) que são genes fundamentais para o desenvolvimento embrionário os quais são notavelmente conservados no reino animal e servem como importantes ferramentas para estudos no campo da biologia evolutiva (HEFFER; PICK, 2013).

Em *D. melanogaster*, os conjuntos de genes fundamentais que atuam durante o desenvolvimento embrionário foram extensamente caracterizados. Parte destes

genes constituem fatores de transcrição que atuam em redes reguladoras de expressão gênica e promovem a segmentação do embrião de *D. melanogaster* (TAUTZ; SOMMER, 1995; PEEL, 2004; LIU; KAUFMAN, 2005; DAMEN, 2007; ANDRIOLI, 2012; KAUR *et al.*, 2022). Neste organismo, a polaridade do embrião é determinada durante a ovogênese, quando ocorre a deposição assimétrica de RNAs e proteínas maternas no ovócito (RIVERA-POMAR; JACKLE, 1996; ATALLAH; LOTT, 2018). Após a fertilização, os RNAs maternos são traduzidos no citoplasma do embrião, o que origina gradientes proteicos que regulam a cascata de segmentação que compreende três níveis hierárquicos: os genes *gap*, *pair-rule* e *segment-polarity*. Os produtos dos RNAs maternos ativam a expressão dos genes *gap*, que são expressos em faixas ao longo do eixo ântero-posterior. As proteínas *gap*, juntamente com os fatores maternos, regulam a expressão dos genes *pair-rule*, cuja expressão ocorre em sete faixas longitudinais que correspondem aos futuros segmentos ímpares ou pares do corpo da larva e adulto. A expressão dos genes *pair-rule* ocorre quando o embrião é sincicial. No estágio seguinte ocorre a celularização do embrião e os genes *segment-polarity*, que são expressos em 14 faixas, marcam os limites dos para-segmentos. No final da cascata de segmentação, a identidade de cada para-segmento é especificada pela atividade dos genes *Hox* (RIVERA-POMAR; JACKLE, 1996, ANDRIOLI 2012; KAUR *et al.*, 2022), cujos padrões de expressão são mantidos pelas proteínas das famílias Polycomb e Trithorax (INGHAM; WHITTLE, 1980; MCKEON; BROCK, 1991; KAUR *et al.*, 2022).

## 1.6 Os genes Hox

Os genes *Hox*, codificam fatores de transcrição altamente conservados em metazoários e pertencem a uma família de genes chamada Homeobox, os quais apresentam um homeodomínio (domínio ligante de DNA). Em animais, os genes Homeobox são classificados em 16 grupos, e os genes *Hox* pertencem à classe ANTP (BÜRGLIN; AFFOLTER, 2016; HUBERT; WELLIK, 2023). Para todos os genes *Hox*, o homeodomínio é um domínio globular que apresenta cerca 60 aminoácidos, codificado por 180 nucleotídeos e é composto por três alfa-hélices que reconhecem um motivo TAAT no DNA. A exceção é o gene *AbdB* cujo homeodomínio apresenta afinidade de ligação por TTAT ou TTAG. Embora o homeodomínio seja uma característica importante para a interação da proteína Hox com o DNA e a posterior



regulação da transcrição, ela por si só não é específica. Proteínas Hox apresentam um motivo YPWM e uma região N-terminal que exerce um papel fundamental na interação com TALE (*three aminoacid loop extension*) o que aumenta a especificidade da ligação das proteínas Hox com a sequência DNA alvo. Existem 2 classes de proteínas TALE, PBC (Exd – Extradenticle em *D. melanogaster*) e MEIS (Hth – Homothorax em *D. melanogaster*) e a formação do complexo Hox-Exd ou Hox-Hth estende o sítio de reconhecimento para 12 bases no DNA, aumentando a especificidade da interação da proteína Hox com a sequência de DNA alvo (GEHRING, 1992; BÜRGLIN; AFFOLTER, 2016; SÁNCHEZ-HIGUERAS *et al.*, 2019; HUBERT; WELLIK, 2023).

Os genes *Hox* são genes homeóticos. O termo homeose foi proposto para descrever a transformação de uma estrutura do corpo em outra estrutura homóloga de outro segmento do corpo. Um exemplo clássico de transformação homeótica é a mutação do gene *Antp*, a qual pode originar vários fenótipos sendo o mais conhecido a transformação do par antenas em um par de patas (GEHRING; HIROMI, 1986; PEARSON *et al.*, 2005; HEFFER; PICK, 2013). Os genes *Hox* são responsáveis por definir a identidade dos segmentos em metazoários (AKAM *et al.*, 1994; PEARSON *et al.*, 2005; HUBERT; WELLIK, 2023). Estes genes podem ser encontrados em diferentes posições e números no genoma, podem estar dispersos como em polvos ou agrupados como em vertebrados. De modo geral, os genes *Hox* são encontrados agrupados no genoma e apresentam a mesma direção de transcrição, com os domínios de expressão e função anteroposteriores refletindo a organização no genoma, o que é denominado colinearidade espacial (LEWIS, 1978; LEWIS 1985; CARROL *et al.*, 1998; HUBERT; WELLIK, 2023). Em vertebrados, o desenvolvimento anteroposterior ocorre em progressão temporal e a posição que um dado gene *Hox* ocupa ao longo do cromossomo corresponde temporalmente com o momento do início da expressão. Esse fenômeno é denominado colinearidade temporal (GAUNT, 2018). Alterações na regulação dos genes *Hox* levam a variações nos domínios de expressão destes genes e durante a evolução resultaram em diversificação morfológica. Por exemplo, acerca a diversidade das patas de insetos, há grupos em que os 3 pares de patas apresentam o mesmo tamanho, porém, em ninfas de gafanhotos a tíbia e o fêmur das patas do terceiro segmento torácico são maiores e representam uma adaptação da espécie. Em grilos, além da tíbia e fêmur serem maiores, o tarso

também é maior na pata do terceiro segmento torácico e a expressão de *Ubx* no tarso de grilos é detectada enquanto que nas ninfas de gafanhotos não (HUGHES; KAUFMAN, 2002; HEFFER; PICK, 2013).

Em *D. melanogaster* os genes *Hox* especificam as estruturas características de cada segmento e estão agrupados em duas regiões no cromossomo III, separadas por cerca de 9,7 Mb (LEWIS, 1978; GEHRING; HIROMI, 1986; KAUFMAN et al., 1990; PACE et al., 2016). O primeiro conjunto de genes, denominado Complexo Antennapedia é composto pelos genes *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Hox3* (compreende *zen2*, *zen* e *bicoid*), *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)*, *fushi tarazu (ftz)* e *Antennapedia (Antp)* (KAUFMAN et al., 1990). O segundo conjunto de genes, denominado Complexo bithorax, compreende os genes *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abdA)* e *Abdominal-B (AbdB)* (LEWIS, 1978). Os genes do Complexo Antennapedia participam na especificação dos segmentos da cabeça e do tórax anterior enquanto que os genes do Complexo Bithorax especificam do terceiro segmento torácico até o sétimo segmento abdominal de *D. melanogaster*. Mais especificamente, os genes *lab*, *pb* e *Dfd*, especificam segmentos da cabeça, os genes *Scr*, *Antp* e *Ubx* especificam a identidade dos segmentos torácicos e os genes *abdA* e *AbdB* especificam a identidade dos segmentos abdominais. Em insetos, o gene *Hox3* não atua na especificação dos segmentos (PANFILIO et al., 2008). No caso de *D. melanogaster*, o homólogo de *Hox3*, o gene *zen*, atua na determinação dos tecidos extraembrionários. Ao longo da evolução este gene foi duplicado duas vezes, o que originou o gene *zen2*, que exerce as mesmas funções que *zen* e o gene *bicoid*, que codifica um dos determinantes maternos depositado na extremidade anterior do embrião (ANDRIOLI, 2012; MUHAIR E HOLLAND, 2023). O *ftz* constitui o segundo gene homeótico do complexo Antennapedia que perdeu a função homeótica. Durante o desenvolvimento embrionário de *D. melanogaster* este gene atua como um gene *pair-rule* (ANDRIOLI, 2012).

Uma das questões amplamente investigadas no âmbito da biologia do desenvolvimento e evolução é como as mudanças morfológicas ocorreram durante a evolução e quais mudanças morfológicas acompanham as alterações genéticas. A maior parte dos insetos apresenta um único complexo *Hox* o qual é similar em composição ao complexo *Hox* ancestral urbilatério, enquanto que em vertebrados, duplicações, perda ou ganho de parálogos ocorreram (GAUNT, 2018). Neste sentido,

como insetos apresentam um único complexo *Hox*, eles constituem um sistema ótimo para investigar a função gênica uma vez que não sofrem com interferências de genes *Hox* parálogos ou redundância funcional (HEFFER; PICK, 2013; MULHAIR; HOLLAND, 2023). Um dos aspectos bastante investigado em insetos é a organização genômica dos gene *Hox* (PACE *et al.*, 2016; MATTHEWS *et al.*, 2018; MULHAIR; HOLLAND, 2023). Entretanto, quando as informações acerca da anotação, organização e padrão de expressão dos genes *Hox* nas diferentes ordens e famílias de insetos são analisadas, nota-se a existência de poucas informações acerca dos genes *Hox* de organismos da ordem Diptera, infraordem Bibionomorpha (PACE *et al.*, 2016; MULHAIR; HOLLAND, 2023).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Ampliar a caracterização do desenvolvimento embrionário de *Pseudolycorella hygida*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- a) Anotar os genes *Hox* de *Pseudolycorella hygida*;
- b) Caracterizar os genes *Hox* de sciarídeos quanto à organização no genoma;
- c) Caracterizar o padrão de expressão de *Antennapedia*, *Ultrabithorax*, *abdominal-A* e *abdominal-B* durante o desenvolvimento embrionário de *Pseudolycorella hygida* através de experimentos de hibridação *in situ* e imunolocalização de proteínas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cultura de *Pseudolycoriella hygida* e coleta de embriões

O ciclo de vida de *Ps. hygida* dura cerca de 41 dias a 22 °C. O estágio embrionário leva 9 dias, a larva eclode e durante os 22 dias do estágio larval, as larvas passam por quatro mudas. A primeira muda ocorre no quarto dia do estágio larval e pode-se observar que as larvas de segundo estágio tendem a ficar próximas da terra que forra a caixa de cultura. A segunda muda ocorre no oitavo dia do desenvolvimento larval e a terceira muda ocorre no décimo segundo dia e caracteriza a entrada do quarto estágio larval. Ao final do estágio larval, as larvas migram para terra e pupam, o estágio de pupa dura 5 dias e os adultos vivem entre 4 e 5 dias.

No início de cada ciclo, os embriões eram transferidos para caixas de plástico revestidas com uma camada de terra úmida, nas quais eram depositados sobre uma mistura de erva-mate e feno triturados e decompostos. Após a eclosão, as larvas de *Ps. hygida* alimentam-se da mistura de folhas em decomposição e durante o desenvolvimento larval migram e secretam uma rede proteica sobre o alimento que pode ser facilmente observada sob estereomicroscópio. Do início do quarto estágio larval até a formação dos pupários era fornecida também uma dieta sólida de composição definida e rica em nutrientes [lêvedo de cerveja 1%; ágar 1,2%; aveia 0,85%; amido de milho 1,4 %, (modificada a partir de Francisco and Zucoloto 1985)]. O estágio de pupa dura cinco dias e a postura dos ovos inicia-se dois dias após a emergência dos adultos. Os adultos vivem de 4 a 5 dias e realizam a postura na própria caixa de cultivo, da qual eram coletados ovos para iniciar uma nova cultura.

Para o estagiamento dos embriões, as caixas de cultura eram observadas diariamente após os adultos emergirem para determinar o dia de início da postura. Uma vez observados embriões na caixa de cultura, os adultos eram mantidos por mais 24 horas e depois eram removidos. Assim, as coleções de embriões iniciais continham embriões de 0 a 24 horas e caso fosse necessário uso de embriões mais velhos, as caixas contendo os ovos estagiados com idade entre 0-24 horas eram incubadas a 25 °C por tempos determinados até que os embriões atingissem a idade almejada. Uma vez concluído o estagiamento, os embriões eram coletados, fixados e permeabilizados.

### 3.2. Cultivo de *D. melanogaster*

Linhagens de *D. melanogaster* transgênicas da série *B0494 25-1 III C* (Neves, 2009) que expressam o *RNAm-lacZ* em células da epiderme de embriões foram cultivadas. A cultura de *D. melanogaster* era mantida a 25 °C. Nesta temperatura, o ciclo de vida de *D. melanogaster* dura cerca de 12 dias. As linhagens eram cultivadas em frascos de 500 mL ou de 50 mL contendo cerca de 50 mL ou 10 mL, respectivamente, de meio padrão (fubá 8,5%; levedura de cerveja 1,55%; ágar 0,47%; sacarose 2,55%; dextrose 5,15%; ácido propiônico 0,51%, ácido fosfórico 0,02% e nipagin 0,6 %).

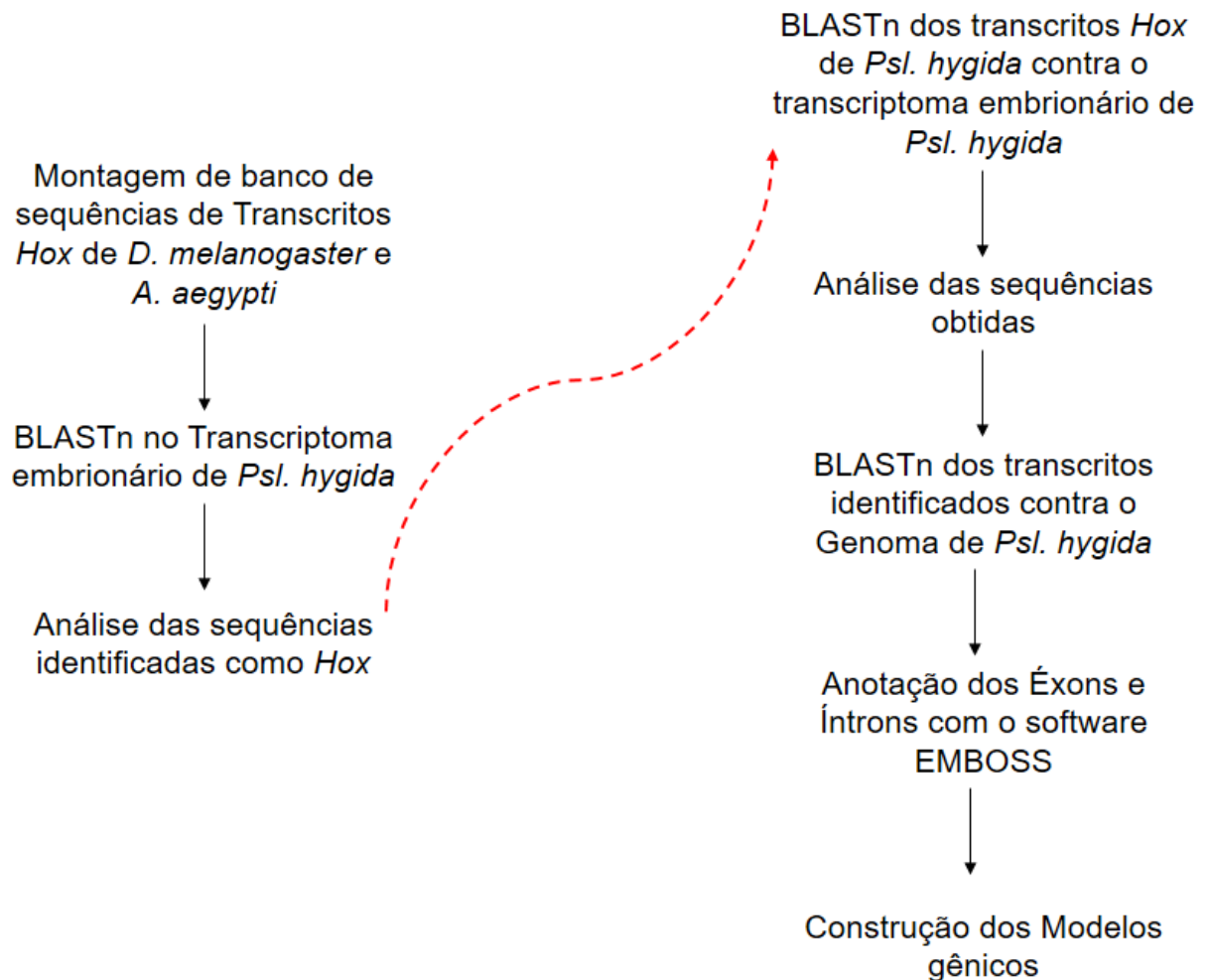
O ciclo de vida de *D. melanogaster*, a 25 °C compreende a fase embrionária (24 h), três estádios larvais (4 dias) e os estágios de pré-pupa (12h), pupa (que dura em torno de 4,5 – 5 dias) e adultos que vivem até 30 dias (Ashburner, 1989). Em culturas mantidas a 25 °C, 24 h após a oviposição ocorre a eclosão das larvas de primeiro estágio larval (L1) as quais se alimentam na superfície do meio. Após 24 horas ocorre a primeira muda larval e as larvas de segundo estágio (L2) migram para o interior do meio. Após 24 horas as larvas passam pela segunda muda larval. O terceiro estágio larval (L3) dura cerca de 48 horas. No final do terceiro estágio larval as larvas param de se alimentar, saem do meio e se movimentam pela parede do frasco de cultivo onde pupam. Ao final da metamorfose, os adultos emergem. A postura é iniciada cerca de dois dias após a emergência.

### 3.3. Anotação dos genes *Hox* em *Pseudolycoriella hygida*

Para a anotação inicial dos genes de interesse, utilizamos como ponto de partida uma montagem preliminar do transcriptoma de embriões de *Ps. hygida* (número de acesso no GenBank SAMN13223348). As buscas no transcriptoma de embriões foram realizadas utilizando-se a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Sequências dos genes homeóticos dos dípteros *D. melanogaster* e *Aedes aegypti*, cujos genomas já haviam sido sequenciados e anotados (anexo I) foram utilizadas para busca por sequências de transcritos de *Hox* em *Ps. hygida*. Dentre as sequências encontradas no transcriptoma, selecionamos as sequências mais longas e com menor e-value (menor que  $10^{-75}$ ). As sequências selecionadas foram utilizadas como ponto de partida para a predição das respectivas sequências polipeptídicas utilizando a ferramenta *Translate*, no *Expasy* (<https://web.expasy.org/translate/>). A identidade das proteínas

preditas de *Psl. hygida* foi confirmada através de BLASTp no banco de dados do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Com este procedimento, foi possível identificar transcritos de todos os genes *Hox* de *Psl. hygida*. Posteriormente, nosso grupo de pesquisa sequenciou um transcriptoma embrionário adicional, estabeleceu um *pipeline* para montagem de transcriptomas e uma nova versão consolidada de excelente qualidade do transcriptoma embrionário de *Psl. hygida* foi obtida. Assim, os transcritos dos genes *Hox* foram novamente anotados nesse novo transcriptoma.

Proseguimos com uma nova busca por transcritos *Hox* no transcriptoma embrionário de *Psl. hygida* com a finalidade de buscar um maior número de transcritos. As sequências encontradas na busca anterior foram utilizadas como ponto de partida para uma nova busca na versão consolidada do transcriptoma embrionário de *Psl. hygida*. Optou-se por utilizar os transcritos de genes *Hox* de *Psl. hygida* identificados na busca preliminar pela proximidade genética. Os transcritos identificados como *Hox* foram analisados e pelo menos um transcrito para cada isoforma proteica encontrada foi identificado. Foram selecionados os transcritos mais longos, que apresentavam menor e-value, maior identidade com o transcrito do gene alvo, que codificassem isoformas proteicas distintas e que exibissem o melhor alinhamento com o genoma de *Psl. hygida*. Em seguida, BLASTn entre os transcritos *Hox* identificados e o genoma de *B. hgyda* foram realizados. Os *scaffolds* que apresentavam os menores e-value eram selecionados e as junções éxon-íntron eram preditas utilizando o software EMBOSS (MOTT, 1997). Os dados derivados das buscas no transcriptoma e no genoma foram utilizados como ponto de partida para a montagem dos modelos gênicos. Foram realizados alinhamentos das sequências polipeptídicas a partir dos transcritos identificados utilizando o Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e o alinhamento múltiplo de todos os polipeptídeos dos genes *Hox* de *Psl. hygida* era realizado utilizando o Clustal Ômega (MADEIRA *et al.*, 2019). Um resumo da metodologia de anotação dos genes *Hox* em *Psl. hygida* pode ser visualizado na figura 4.



**Figura 4: Resumo da metodologia de anotação dos genes *Hox* em *Psl. hygida*.** BLASTn dos transcritos de *D. melanogaster* e *A. aegypti* foram realizados contra o transcriptoma embrionário preliminar de *Psl. hygida* (número de acesso no GenBank SAMN13223348). As sequências de *Psl. hygida* obtidas foram analisadas conforme descrito no texto. Um novo BLASTn dos transcritos *Hox* de *Psl. hygida* identificados na busca preliminar foi realizado contra o transcriptoma embrionário consolidado de *Psl. hygida*. Os transcritos identificados foram analisados e utilizados como sequências de busca no genoma de *Psl. hygida*. As junções éxon- íntron foram anotadas e os dados obtidos foram utilizados para a construção dos modelos gênicos.

### 3.4. Anotação do locus *Hox* de *Bradysia tilicola* e *Bradysia cellarum*

Para a identificação dos genes *Hox* no genoma de *Bradysia tilicola*, eram realizados BLASTp contra o genoma de *Bradysia tilicola* do NCBI utilizando as sequência polipeptídicas dos genes *Hox* de *D. melanogaster* (anexo II) como sequências de busca. Após a identificação das sequências com menor e-value, BLASTp dos polipeptídeos identificados eram realizados com a finalidade de confirmar a identidade das sequências. Para anotar a posição relativa que cada gene *Hox* investigado ocupava no genoma de *B. tilicola*, recuperava-se a sequência do transcrito associado a cada polipeptídeo identificado. A seguir, um BLASTn do transcrito *Hox* de *B. tilicola* contra o genoma de *B. tilicola* era realizado (número de acesso do genoma



de *B. tilicola* no GenBank: PRJNA672144) e as coordenadas pertencentes a cada gene eram anotadas.

Para anotar os genes *Hox* de *Bradysia cellarum* (Frey, 1948) (= *Bradysia odoriphaga* YANG; ZHANG, 1985), uma estratégia distinta foi empregada. Embora o genoma sequenciado e montado esteja disponível para este organismo, o transcriptoma montado não está. Desta forma, não foi possível identificar os transcritos dos genes *Hox* de *B. cellarum*. As sequências dos transcritos dos genes *Hox* são altamente conservadas entre *Psl. hygida* e *B. tilicola* (tabela 4). Assim, para determinar o ordenamento dos genes *Hox* no genoma de *B. cellarum*, eram realizado BLASTn entre os transcritos *Hox* de *Psl. hygida* e o genoma de *B. cellarum* (número de acesso do genoma de *B. cellarum* no GenBank PRJNA612767).

### 3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

De rotina a mistura de reação continha 100 ng de DNA molde ou de cDNA de embriões com idade entre 4-6 dias de *Psl. hygida*, Tampão goTaq® G2 Hot Start Polymerase 1X (Promega)<sup>1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleotídeo *forward* 1 pmol, oligonucleotídeo *reverse* 1 pmol, 0,62 unidades da enzima Go Taq® G2 Hot Start polimerase (Promega) e água para volume final de 25 µl. As reações eram montadas em gelo e levadas ao termociclador. O ciclo utilizado era composto de três etapas; primeira etapa; 95 °C por 2 minutos; segunda etapa 95 °C por 45 segundos, 43,1 °C ou 45,4 °C ou 48 °C ou 50,7 °C ou 53,5 °C ou 56 °C ou 59,8 °C, por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, esta segunda etapa era repetida 35 vezes; terceira etapa 72 °C por 5 minutos. A sequência dos oligonucleotídeos utilizados é mostrada na tabela 1.

---

<sup>1</sup> No anexo III estão descritos os principais reagentes e Kits utilizados neste trabalho e os respectivos fabricantes.

**Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR**

Gene	Nome	Oligonucleotídeo	Sequência	nt	Molde
<i>lab</i>	Bh_lab_F	Foward	5'GACACATTTTGTTCCTTTTTTCG3'	22	DNA
<i>lab</i>	Bh_lab_R	Reverse	5'TTAACCTTGCATCCATTTGTACG3'	22	DNA
<i>Ubx</i>	Bh_Ubx_F	Foward	5'GTAAATTGATAAGTGTCGC3'	20	DNA
<i>Ubx</i>	Bh_Ubx_R	Reverse	5'TAAAACGTATGATTACTCGC3'	20	DNA
<i>Ubx</i>	Bh_Ubx_F_v2021	Foward	5'GGGCATCCACATCAAGCATC3'	20	cDNA
<i>Ubx</i>	Bh_Ubx_R_v2021	Reverse	5'TGGGCTTGGGCTTGTTC3'	20	cDNA
<i>abdA</i>	AbdA_F	Foward	5'TTGACCCCCTTATTGGCTGC3'	22	DNA
<i>abdA</i>	AbdA_R	Reverse	5'CCAGTCCAGAAAATCCAGGC3'	20	DNA
<i>abdA</i>	AbdA_F_v2021	Foward	5'ACAACATCAACATCGGAAGG3'	20	cDNA
<i>abdA</i>	AbdA_R_v2021	Reverse	5'CAGCTAGACCCATTTGAGG3'	20	cDNA
<i>Abd-B</i>	Bh_AbdB_F	Foward	5'AAGGGAAAAAAACTGTGC3'	20	DNA
<i>Abd-B</i>	Bh_AbdB_R	Reverse	5'TACTTTGCTGCTGTTGTTGC3'	20	DNA
<i>Abd-B</i>	AbdB_F_v2021	Foward	5'CCCACCCAGCATTGAGCATC3'	20	cDNA
<i>Abd-B</i>	AbdB-R-v2021	Reverse	5'AGTTCAAAGCCCTAGCCAGC3'	20	cDNA

A coluna “**gene**” descreve o gene para qual o oligonucleotídeo foi desenhado, a coluna “**nome**” descreve o nome do oligonucleotídeo, coluna “oligonucleotídeo” descreve a orientação do oligonucleotídeo (*foward* ou *reverse*), a coluna “**sequência**” apresenta as sequências dos oligonucleotídeos utilizados, a coluna “**nt**” mostra o tamanho de cada oligonucleotídeo em nucleotídeos e a coluna “**molde**” apresenta o molde utilizado para amplificação do gene alvo (DNA genômico ou cDNA embrionário).

### 3.6. Extração de RNA total e síntese de cDNA

Embriões com idade entre 3 e 5 dias eram lavados com água MilliQ estéril e em seguida eram secados em papel filtro. Em seguida, cerca de 32 mg de embriões eram transferidos para um microtubo e então prosseguia-se com a extração de RNA total utilizando o RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN), segundo as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA era quantificado em espectrofotômetro. Cerca de 1 µg do RNA extraído era utilizado como ponto de partida para a síntese de cDNA. Inicialmente realizava-se o tratamento com DNase. De rotina, 1 µg de RNA eram incubados com Tampão de DNase (concentração final 1X, Promega) e 1 unidade de DNase (Promega) em um volume final de 10 µL por 30 minutos à 37 °C. A reação era interrompida pela adição de 1 µL de tampão DNase *stop solution* (Promega).

Para a reação de transcrição reversa, a 1 µg de RNA previamente tratado com DNase eram adicionados 0,5 µL de Randon primers Promega (0,25 µg) e 0,5 µL de oligo dT Promega (0,25 µg), seguido de incubação a 70 °C, por 5 minutos. A seguir a mistura de RNA era mantida em gelo e em seguida adicionavam-se tampão de transcriptase reversa ImProm-II (Promega) (concentração final 1X), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), dNTP (0,5 mM cada nucleotídeo), RNAsin (Promega) (20 unidades) e 1 µl de

transcriptase reversa ImProm-II™ (Promega). A síntese do cDNA era realizada incubando-se a mistura de reação a 25 °C, 5 minutos, seguida de incubação a 42 °C, 60 minutos e 70 °C, 15 minutos, para inativação da enzima. O cDNA recém sintetizado era armazenado a -80 °C até o uso.

### **3.7. Eletroforese em gel de agarose**

A eletroforese era rotineiramente realizada em gel de agarose 0,8%, ou 1,5 %, em tampão Tris-acetato-EDTA (EDTA 1 mM, Tris-acetato 40 mM, pH 8,0) (TAE 1X). Para realizar a corrida eletroforética era utilizado um sistema horizontal FisherBioTech FB-SB-710. As amostras continham quantidades distintas de DNA, 2 µL de tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,042 %, glicerol 5 %) e TE (Tris 0,01 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) para um volume final de 10 µL. Após a eletroforese, o gel era corado em TAE 1X contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 30 minutos. O gel era documentado em fotodocumentador BIO RAD modelo Universal Hood II e a imagem processada pelo software Quantity one versão 4.6.8.

### **3.8. Purificação em gel de fragmentos de interesse**

Após a realização de eletroforese preparativa em gel de agarose, os fragmentos de interesse eram recortados e transferidos para tubos previamente pesados. A massa da banda era determinada e o gel era purificado segundo as instruções do fabricante do Kit MinElute® Gel Extraction (QIAGEN).

### **3.9. Quantificação em gel dos fragmentos purificados**

Os insertos amplificados e purificados eram quantificados em eletroforese de gel de agarose 1,5 % neutro. Para tanto, a intensidade dos fragmentos purificados eram comparadas com a intensidade dos fragmentos de DNA do padrão *Low DNA mass ladder* (Invitrogen), cujas massas são conhecidas.

### **3.10. Preparo de bactérias competentes pela metodologia de Inoue H. *et al.*, 1990**

Primeiramente, bactérias *E. coli* cepa *DH5α* eram inoculadas por esgotamento em placas contendo meio LB sólido (triptona 1%, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 1 % e Agar 1,5 %) e incubadas durante a noite à 37 °C. No dia seguinte, 6 colônias isoladas

eram inoculadas em 100 mL de meio SOB (Tryptona 2%, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM). As bactérias eram incubadas sob agitação, a 18 °C, pelo período necessário até atingir DO=0.6 (em nossas condições de cultivo eram necessárias cerca de 44 horas).

A cultura era incubada em gelo por 10 minutos. A seguir, as bactérias eram coletadas por centrifugação a 2000 *g*, à 4 °C, 10 minutos, em tubos cônicos de propileno de 50 mL. Após a centrifugação, o precipitado era ressuspensionado em 32 mL de TB gelado (PIPES 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 55 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM e KCl 250 mM, pH6.7). Em seguida, a suspensão de bactérias era incubada em gelo por 10 minutos e após esse período, era novamente centrifugada a 2000 *g*, a 4°C, 10 minutos. O sobrenadante era descartado e as bactérias eram ressuspensionadas em volume final de 8 mL de TB gelado. Em seguida, eram adicionados 560 µL de DMSO (concentração final 7%). As bactérias eram então incubadas, novamente, em banho de gelo por 10 minutos e em seguida alíquotas de 500 µL de bactérias competentes eram transferidas para microtubos de 1,5 mL, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até o uso.

### **3.11. Transformação de bactérias competentes, cepa *DH5α*, pela metodologia de Inoue H. *et al.*, 1990**

Primeiramente 200 µL de bactérias competentes eram transferidos para um tubo de propileno de fundo redondo e estéril (Corning ref.352059), previamente resfriado em banho de gelo. Em seguida os produtos das reações de ligação eram misturados às alíquotas de bactérias competentes. A mistura era mantida em banho de gelo por 30 minutos. A seguir, as bactérias eram submetidas a choque térmico, que era realizado mantendo-se as bactérias em banho seco, a 42 °C, 30 segundos. Em seguida, 800 µL de meio SOC (Tryptona 2%, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM e Glicose 20 mM) eram adicionados e as bactérias eram incubadas por 1 hora, à 37 °C, sob agitação. Terminado esse período de incubação, as bactérias eram então semeadas em placas de meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL), seguido de incubação a 37 °C, por no mínimo 16 horas.

### 3.12. Mini-preparação de DNA plasmidial

Colônias isoladas eram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido (triptona 1%, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,17 M) contendo ampicilina (100 µg/mL) seguido de agitação, a 37 °C, durante a noite. No dia seguinte, 1 mL da cultura era transferido para um eppendorf de 1,5 mL e centrifugado à 12000 g, 3 minutos. A seguir, o sobrenadante era descartado, mais 1 mL do meio era adicionado e uma nova centrifugação com os mesmos parâmetros realizada. A partir deste ponto, procedia-se à extração do DNA plasmidial utilizando-se o QIAprep®Spin Miniprep Kit (QIAGEN), segundo as instruções do fabricante. Ao final o DNA plasmidial era eluído com 30 µL de TE. A concentração de DNA na solução era determinada por espectrometria assumindo-se que 1 OD equivalia a 50 µg/mL.

### 3.13. Digestão do DNA com enzimas de restrição

De rotina as digestões com enzimas de restrição eram realizadas segundo as recomendações do fabricante (*New England BioLabs*- NEB) e continham o DNA de interesse, o tampão recomendado (concentração final 1 x), a enzima de escolha e água para um volume final de 20 µL.

### 3.14. Reações de Sequenciamento

As reações de sequenciamento eram realizadas utilizando-se o *kit BigDye Terminator Cycle Sequencing*, versão 3.1 (Applied Biosystems). De rotina, nas reações eram utilizados 400 ng do DNA de interesse, tampão de sequenciamento (concentração final 2,5 X), 0,32 µmols do oligonucleotídeo de sequenciamento, 1 µL do reagente *Big dye terminator* 3.1 e água miliQ livre de nucleases para volume final de 10 µL.

De costume, a reação era montada em gelo e em seguida, era colocada no termociclador. O programa utilizado para as reações de sequenciamento compreendia as seguintes etapas: a primeira etapa, 96 °C por 1 minuto, a segunda etapa, 96 °C por 1 minuto; 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos, esta segunda etapa era repetida 35 vezes, e ao final as amostras eram mantidas a 22 °C. A temperatura de anelamento foi ajustada de forma que ela diminuísse 1 °C por segundo entre as temperaturas de 96 °C e 50 °C. O sequenciamento foi realizado pelo serviço de

sequenciamento da FCFRP-USP no sequenciador DNA 3500 *Genetic Analyzer da Applied Biosystems*.

### 3.15. Síntese das sondas *sense* e *anti-sense*

Inicialmente 5 µg dos recombinantes *labial*, *Ubx*, *abdA* ou *Abd-B* eram digeridos com enzimas *Apa I* para transcrição utilizando o promotor SP6 e síntese das sondas *sense*, ou com *Pst I*, para transcrição utilizando o promotor T7 e obtenção de sondas *anti-sense*. O recombinante *Abd-B* contém um sítio para enzima *Pst I* no inserto, portanto, este recombinante foi digerido com *Sac I* para a transcrição utilizando o promotor T7 e obtenção de sondas *anti-sense*. As sondas *sense* consistem naquelas que apresentam a mesma sequência do RNAm investigado e que portanto, não hibridizam, sendo utilizadas como controles nos experimentos de hibridação *in situ*. As sondas *anti-sense* são as sondas que apresentam complementaridade com os RNAm investigados, e desta forma possibilitam a formação de híbridos e detecção do padrão de expressão do RNAm de interesse.

Para a síntese de sonda *anti-sense LacZ* foi utilizado como ponto de partida o DNA recombinante disponível no laboratório *pLacZ*, o qual havia sido previamente digerido com *Pst I* e purificado nas mesmas condições descritas neste trabalho. Este recombinante tem como inserto o gene *LacZ*, o qual foi utilizado como molde para a síntese de sonda *anti-sense LacZ*.

Após a digestão, os plasmídeos linearizados eram purificados em gel de agarose com o emprego do Kit MinElute® Gel Extraction (QIAGEN), seguido de quantificação em gel de agarose 0,8 %. Para a síntese das sondas, era utilizado 1 µg do DNA molde digerido ao qual eram adicionados Dig RNA labeling mix 10x (Roche, concentração final 1 x), 20 U de inibidor de RNase (Promega), água DEPC (água tratada com Dietil Pirocarbonato) e 20 U da T7 RNA polimerase ou SP6 RNA polimerase (Roche) em um volume final de 20 µL. A reação de transcrição era incubada por duas horas, a 37 °C, o volume era completado para 50 µL com água DEPC, seguido de adição de tampão de carbonato de cálcio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 60 mM e NaHCO<sub>3</sub> 40 mM). Posteriormente, era realizada a hidrólise das sondas sintetizadas utilizando-se a fórmula descrita abaixo:

$$\text{Tempo de hidrólise} = \frac{\text{Tamanho do inserto transcrito (pb)} \cdot 0,2}{0,11 \times \text{tamanho do inserto transcrito (pb)} \times 0,2}$$

**Equação 1: Cálculo do tempo de hidrólise das sondas senso e anti-senso sintetizadas.** “Tempo de hidrólise” é igual ao tempo em minutos que a solução contendo o produto da transcrição *in vitro* deverá ser incubado à 65 °C para hidrólise e obtenção de fragmentos de 200 bases; “tamanho do inserto transcrito (pb)” é igual ao tamanho do inserto clonado em pb que foi transcrito, “0,2” é igual ao tamanho em Kb do produto que pretende-se obter após a hidrólise dos transcritos e 0,11 é uma constante.

Após a hidrólise alcalina das sondas, o pH da solução contendo as sondas hidrolisadas era neutralizado pela adição de 100 µL de acetato de sódio (concentração final 0,1 mM). A seguir, realizava-se a precipitação da sonda pela adição de 20 µL de Cloreto de Lítio (concentração final 0,3 mM), 100 µg de tRNA (Sigma) e etanol absoluto (concentração final 70%). A mistura era incubada durante a noite a -20 °C para precipitação e no dia seguinte as sondas eram centrifugadas à 15000 g, 20 minutos, a 4 °C, o sobrenadante era removido e o precipitado era lavado com etanol 70 %. Em seguida, as sondas eram novamente centrifugadas a 15000 g, 5 minutos, a 4 °C, o sobrenadante era removido e o precipitado era seco ao ar em temperatura ambiente. As sondas eram ressuspensas em 150 µL de tampão de hibridação [DNA de salmão 0,1mg/mL; formamida deionizada 50%; SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato tri-sódio diidratado 0,075 M, pH 7,0), heparina 0,05 mg/mL, tween 20 0,1%] e em seguida eram armazenadas à - 20 °C até o momento do uso.

### **3.16. Preparo de extratos de proteínas de embriões de *Psil. hygida***

Grupos de embriões com idades de 0 a 3 dias, 4 a 6 dias e 7 a 9 dias eram coletados da cultura e transferidos para uma placa de Petri contendo ágar 2%. Após a remoção de resíduos da cultura, os embriões eram transferidos para micropeneira de *nylon* e lavados com água MilliQ estéril. Após a lavagem com água, os embriões eram secados em papel de filtro e transferidos para um microtubo contendo 100 µL de tampão (250 mM sacarose, 0.1 mM EGTA e 10 mM Hepes, pH 7.2), 1 µL de coquetel inibidor de protease (Sigma - P8340-1), 1 µL de NaF (fluoreto de sódio, 10 mM) e 10 µL de NaVO<sub>3</sub> (metavanadato de sódio 100 mM) e em seguida os embriões eram homogeneizados por 3 minutos utilizando-se um micro homogenizador de

tecidos acoplado a um pistilo para microtubos. Os extratos proteicos então eram armazenados a -20 °C até o uso.

### **3.17. SDS-PAGE e *western blot***

Inicialmente dois géis SDS-PAGE eram preparados de acordo com Laemmli (1970) em sistema Mini-PrOTEAN® 3 Cell (Bio-Rad). Cerca de 6 µg de proteína total de embriões eram aplicados no gel. Após a corrida eletroforética, um dos géis era corado com Coomassie Blue enquanto que o outro era transferido para uma membrana de nitrocelulose (Hybond® ECL™, Cytiva). A transferência era realizada com o sistema de transferência semi-seco TE 77 PWR (Cytiva) na presença do tampão de transferência (0.025 M Tris; 0.2 M glicina; 0.001% SDS, 15% metanol).

Após a transferência, as membranas eram coradas com solução de Ponceau (ácido acético 5% e Ponceau Red dye 0,1%). As membranas coradas com Ponceau eram orientadas, a posição dos pesos moleculares na membrana era marcada e em seguida, o corante *Ponceau* era removido lavando-se a membrana por 15 minutos, 2 vezes, sob agitação e em temperatura ambiente com o tampão de remoção de Ponceau (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.2% Tween-20, pH 7.6).

A primeira etapa da imundetecção consistia na realização do bloqueio com TBS/T (Tris 0,05 M; NaCl 0,016 M, Tween 0,1 %, pH 7,5) + BSA 5%, por 1 hora. Em seguida, a membrana era incubada com o anticorpo primário anti-Antp ou anti-Ubx/abdA diluídos 1:500, durante a noite, a 4 °C. Posteriormente, era realizada uma lavagem em TBS/T por 10 minutos, seguida de duas lavagens com TBS/T por 5 minutos cada.

Após as etapas de lavagem para retirar o anticorpo primário que não se ligou às proteínas imobilizadas na membrana, era realizada uma incubação com o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG HRP linked (Cell Signaling Technology) diluído 1:500, por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, era realizada uma lavagem com TBS/T por 10 minutos e em seguida duas lavagens adicionais com TBS/T eram realizadas pelo tempo de 5 minutos cada. A revelação era realizada incubando-se a membrana com 2 mL de solução de revelação [Solução de Luminol (Cytiva) solução de Peroxidase (Cytiva) (1:1), por 5 minutos. A documentação do resultado era realizada em diferentes tempos de exposição no sistema de imagem ChemiDoc™ (Bio-Rad).



### 3.18. Fixação e permeabilização de embriões de *Psl. hygida* (Uliana et al., 2018)

Os embriões estagiados eram coletados das caixas de cultivo com o auxílio de pinça e transferidos para uma placa de Petri contendo ágar 2%. Em seguida, os embriões eram recobertos com solução de lavagem (NaCl 0,3 M, Triton-X 0,25%) e com o auxílio de um pincel eram transferidos uma micropeneira de *nylon*. A seguir, os embriões eram lavados com aproximadamente 5 mL de solução de lavagem e em seguida a peneira contendo os ovos era transferida para uma placa de Petri contendo 40 mL de uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl 2,6 %) para remoção do córion. A peneira contendo os embriões era agitada levemente a cada 1 minuto até atingir o tempo de 10 minutos. A seguir, os embriões eram lavados com água de torneira e então transferidos com o auxílio de um pincel, para um microtubo contendo 500 µL de PBS 1X (NaCl 0,136 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,01 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 mM). Em seguida, o sobrenadante era removido e os embriões eram lavados duas vezes com 500 µL de tampão citrato (tampão citrato 1 M, pH 5,0), sob agitação, por 5 minutos. O tampão citrato era removido e procedia-se à hidrólise alcalina que era realizada incubando-se os embriões em 1 mL de NaOH 1 M, à 37 °C, por 30 minutos. O sobrenadante era removido e a seguir realizavam-se duas lavagens com 500 µL de tampão citrato, sob agitação, por 5 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, o sobrenadante era removido e os embriões eram incubados em 1 mL de *Trichoderma harzianum* *lyzing enzymes* (10 mg/mL em tampão citrato) (Sigma-Aldrich), a 37 °C, sob agitação, por duas horas para realização de digestão enzimática. A etapa de hidrólise alcalina, anteriormente à digestão enzimática com *Trichoderma harzianum* *lyzing enzymes*, é necessária para o aumento da atividade quitinase (Sivan e Chet, 1989). Entretanto, a hidrólise alcalina pode levar à degradação do RNAm embrionário, portanto, alternativamente, preparações de embriões de *Psl. hygida* foram obtidas omitindo-se a etapa de hidrólise alcalina e com um acréscimo de quatro horas na incubação com *Trichoderma harzianum* *lyzing enzymes*.

Após o período de incubação com *Trichoderma harzianum* *lyzing enzymes*, o sobrenadante era removido e realizavam-se duas lavagens com 500 µL de PBS 1X, à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, os embriões eram transferidos para um frasco de cintilação contendo 750 µL de fixador (PBS 1 X; formaldeído 6%). Os embriões eram incubados sob agitação, durante 15 minutos, à temperatura ambiente e em seguida eram adicionados 750 µL de n-heptano à preparação. A seguir, os

embriões eram incubados sob agitação, durante 45 minutos, à temperatura ambiente. Na etapa subsequente, a fase aquosa (fase inferior) era removida, 2 mL de metanol:diclorometano (3:1) eram adicionados e os embriões eram agitados por aproximadamente 30 segundos. Nesta etapa, ocorria a remoção da membrana vitelínica dos embriões e os embriões que precipitavam no fundo do frasco eram transferidos para um microtubo de 1,5 mL. A seguir, os embriões eram lavados duas vezes com 500 µL de metanol, sob agitação, durante 5 minutos. Ao final, os embriões eram mantidos a - 20 °C até sua utilização.

Antes dos experimentos de imunolocalização ou hibridação *in situ* os embriões eram sonicados. Os embriões coletados e fixados como descrito acima eram lavados uma vez com 1 mL de PBT/Metanol (1:1), sob agitação, por 5 minutos e em seguida eram lavados duas vezes com 500 µL de PBT, sob agitação, por 5 minutos. A seguir procedia-se à sonicação dos embriões. Para tanto, adicionavam-se 500 µL de PBT (PBS1X, Tween 0,1%) a 100 µL de embriões armazenados em microtubos de 1,5 mL. Os embriões eram mantidos em gelo e eram sonicados durante diferentes tempos utilizando-se um sonicador Qsonia Sonicators modelo Q125, com amplitude de 20% e potência de 125 watts. A sonicação era realizada alternando-se pulsos de sonicação de 10 segundos, com incubação em gelo durante 10 segundos, para evitar o aquecimento dos embriões durante o procedimento. A seguir, os embriões eram lavados duas vezes com 500 µL de PBT, sob agitação, durante 5 minutos. Em seguida era realizada uma lavagem com metanol/PBT (1:1), sob agitação, por 5 minutos. Ao final, os embriões eram lavados duas vezes com metanol, sob agitação, durante cinco minutos. Os embriões sonicados eram então utilizados para os experimentos de imunolocalização ou hibridação *in situ* de RNAm.

### **3.19. Condicionamento de fêmeas e coletas de embriões de *D. melanogaster* para experimentos de hibridização *in situ***

Para a coleta de grandes quantidades de ovos de *D. melanogaster*, era necessário realizar o condicionamento de fêmeas, o que resultava no pleno desenvolvimento dos ovários. Para tanto, um número grande de adultos (oriundo de três frascos de cultivo de 500 mL) era colocado em um único frasco de cultivo de 500 mL contendo uma quantidade generosa de extrato de levedura. O conjunto de adultos era transferido para uma nova garrafa de cultivo a cada 24 horas durante três dias. Ao

término deste tempo, o conjunto de adultos era transferido para um Becker de plástico e tampado com uma placa de Petri contendo meio de oviposição (suco de uva 45,5%, açúcar cristal 8,7%, ágar 2,2%, NaOH 0,0125 N, ácido propiônico 0,46% e ácido fosfórico 0,045%).

De rotina, antes da realização das coletas realizava-se uma pré-coleta durante 2 horas que tinha como finalidade garantir que as coleções de embriões não contivessem embriões que tivessem ficado retidos no oviduto das fêmeas. Após tempos de coleta definidos os embriões eram retirados do meio de oviposição com o auxílio de uma espátula e transferidos para uma micro-peneira. Eram realizadas cinco lavagens com solução de lavagem (NaCl 0,3 M; Tris 0,01 M e TritonX-100 0,5%), utilizando-se aproximadamente 6 mL desta solução em cada lavagem e em seguida eram realizadas mais duas lavagens com cerca de 6 mL de água MilliQ autoclavada. Após estas lavagens procedia-se à remoção do córion dos embriões. Para tanto, a micro-peneira contendo os embriões era colocada por dois minutos em placa de Petri contendo cerca de 30 mL de água sanitária comercial diluída (concentração final cerca de 2,5 % de hipoclorito de sódio).

Após a remoção do córion os embriões eram lavados com água MilliQ até a completa remoção da água sanitária. A seguir transferiam-se os embriões para um microtubo e lavavam-se os embriões com solução de lavagem. O tampão de lavagem era removido e os embriões eram transferidos para um frasco de cintilação contendo 3 mL de tampão de fixação (PBS 1,3 X e EGTA 0,067 M). A seguir, 1 mL de formaldeído e 4 mL de n-heptano eram adicionados aos embriões que já encontrava-se no tampão de fixação. A fixação era realizada durante 25 minutos, sob agitação leve, à temperatura ambiente. Após a fixação, a fase inferior do fixador bifásico era removida e eram adicionados 8 mL de metanol. O metanol promove a remoção da membrana vitelínica e os embriões sem membrana vitelínica ficam depositados no fundo do frasco de cintilação. Após a remoção de toda a fase líquida os embriões eram transferidos para um microtubo e lavados duas vezes com 1 mL de metanol durante 5 minutos sob agitação. Em seguida, lavavam-se os embriões três vezes com 1 mL de etanol, por 5 minutos em cada lavagem. Os embriões coletados eram armazenados em metanol à -20 °C.

### **3.20. Protocolo de imunolocalização em embriões de *Pseudolycorella hygida* e *Drosophila melanogaster***

Amostras de embriões estagiados, previamente fixados, permeabilizados e sonicados eram empregadas nos experimentos de imunolocalização. Nos experimentos descritos neste trabalho utilizávamos os seguintes anticorpos: a) anti-engrailed, diluído 1:7; b) anti-antennapedia, diluído 1:10; c) anti-Ubx/AbdA diluído 1:5 e d) anti-Abd-B diluído 1:50. O anticorpo secundário utilizado em todos os experimentos de imunolocalização era o Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed, Alexa Fluor® 488 (Abcam), diluído 1:500<sup>2</sup>.

Após a sonicação, os embriões eram incubados em PBT (NaCl 0,136 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,01 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 mM) + BSA 1%, sob agitação, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Esta etapa era repetida 4 vezes e constitui a etapa de bloqueio. Em seguida os embriões eram incubados com o anticorpo primário diluído em PBT- BSA 1% sob agitação, durante a noite, a 4 °C. No dia seguinte, os embriões eram lavados duas vezes com PBT, sob agitação, por 5 minutos, à temperatura ambiente e em seguida, lavados quatro vezes com PBT- BSA 1%, 5 minutos, sob agitação. Em seguida, os embriões eram incubados com o anticorpo secundário diluído 1:500 em PBT-BSA 1%, sob agitação, 1 hora, à temperatura ambiente. A seguir, os embriões eram lavados duas vezes com 500 µL de PBT por 5 minutos, sob agitação e em seguida 4 vezes com PBT, sob agitação, por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a última lavagem, os embriões eram incubados sob agitação, por 5 minutos, à temperatura ambiente, em 200 µL de PBT-DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochlorid, concentração final 2,25 µM). Em seguida, os embriões eram lavados 2 vezes, sob agitação, por 5 minutos, à temperatura ambiente com 500 µL de PBS 1X (NaCl 0,136 M; 2,7 mM KCl; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,01 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. 2 Mm). Ao final, o sobrenadante era removido, três gotas do meio de montagem Fluoromount™ aqueous Mounting (Sigma) eram adicionadas e os embriões eram montados em lâminas histológicas para documentação.

---

<sup>2</sup> No anexo III estão descritos os anticorpos utilizados e os respectivos fabricantes.

### **3.21. Hibridação *in situ* em embriões de *Pseudolykoriella hygida* e *Drosophila melanogaster***

Embriões de *Pseudolykoriella hygida* ou *D. melanogaster*, coletados utilizando os protocolos anteriormente descritos, eram utilizados como ponto de partida nos experimentos de hibridação *in situ* (TAUTZ; PFEIFLE, 1989). Inicialmente os embriões eram lavados duas vezes com 500 µL de etanol, sob agitação, por 5 minutos. O sobrenadante era retirado e os embriões eram incubados em etanol:xileno (1:1), sob agitação leve, por 30 minutos. A seguir, os embriões eram lavados 3 vezes com etanol (500 µL de etanol em cada lavagem, sob agitação, por 10 minutos) e em seguida duas vezes com metanol (500 µL de metanol cada lavagem, sob agitação, por 10 minutos). Em seguida, o sobrenadante era removido e adicionavam-se 750 µL de metanol e 750 µL de PBT-formaldeído 5% (PBS1X; Tween 20 0,1%; formaldeído 5%) e incubavam-se os embriões sob agitação, por 5 minutos. O sobrenadante era removido e os embriões eram incubados em 1,5 mL de PBT-Formaldeído 5%, sob agitação leve, durante 25 minutos. Após esta etapa de pós-fixação, os embriões eram lavados três vezes com 500 µL de PBT sob agitação, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, adicionava-se 1,0 mL de PBT contendo Proteinase K (concentração final 4 µg/ml) e mantinham-se os embriões sob leve agitação, por 5 minutos. Após a remoção do sobrenadante, os embriões eram lavados em 500 µL de PBT, três vezes, durante 5 minutos cada lavagem. Os embriões eram novamente fixados por 25 minutos, sob agitação, em 1,5 mL de PBT-formaldeído 5%. A seguir, o sobrenadante era removido e os embriões eram lavados quatro vezes com 500 µL PBT, sob agitação, por 5 minutos, à temperatura ambiente.

A seguir, procedia-se à pré-hibridação. Após a remoção do sobrenadante, eram adicionados 750 µL de PBT e 750 µL de solução de hibridação [DNA de salmão 0,1mg/mL; formamida deionizada 50%; SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de tri-sódio diidratado 0,075 M), heparina 0,05 mg/mL, tween 20 0,1%], seguido de incubação sob agitação, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, adicionava-se 1,0 mL de solução de hibridação e incubavam-se os embriões a 55 °C, por 2 horas, sob leve agitação. Diferentes tempos de pré-hibridação foram testados (4 horas e 6 horas). Durante os minutos finais da pré-hibridação realizava-se a preparação das sondas. As sondas utilizadas haviam sido previamente marcadas com digoxigenina em reação de transcrição *in vitro*, conforme

anteriormente descrito. As sondas de interesse eram diluídas 1:100 em solução de hibridação e a seguir incubadas à 80 °C, em banho seco, por 4 minutos. A seguir a sonda desnaturada era mantida em gelo até sua utilização. Após a pré-hibridação, o sobrenadante era removido e adicionavam-se 60 µL de sonda previamente diluída e desnaturada aos embriões. Para os embriões transgênicos de *D. melanogaster*, a sonda anti senso *LacZ* era empregada e para os embriões de *Bradysia* eram empregadas sonda *senso* ou *anti senso* contra os genes *Hox Ubx*, *abdA* e *AbdB*. Os embriões eram incubados a 55°C, sob leve agitação, durante 12 horas.

Decorrido o período de hibridação, adicionava-se 1,0 mL de solução de hibridação e os embriões eram incubados por 30 minutos, a 55°C. O sobrenadante era removido e essa incubação era repetida uma vez. A seguir, o sobrenadante era removido e adicionavam-se 750 µL de solução de hibridação e 750 µL de PBT, seguido de incubação sob agitação, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. A seguir realizavam-se 4 lavagens com 500 µL de PBT, 10 minutos cada lavagem, à temperatura ambiente.

Em seguida, procedia-se à etapa de imunodeteção. Para tanto, os embriões eram incubados com anticorpo anti-DIG marcado com fosfatase alcalina, diluído em PBT (1:2000), sob agitação leve, por 1 hora. A seguir, os embriões eram lavados quatro vezes com 500 µL de PBT, sob agitação, durante 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante, os embriões eram lavados duas vezes com 500 µL de tampão de fosfatase alcalina (NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; Tris-HCl 100mM), durante 5 minutos. A seguir, os embriões eram incubados com 400 µL de solução corante (tampão fosfatase alcalina; NBT 0,033% e BCIP 0,016%), sob leve agitação, ao abrigo da luz, até que fosse observado o surgimento da coloração, que era verificado observando-se alíquotas dos embriões em estereomicroscópio. A solução corante era removida e os embriões eram fixados em 500 µL de PBT-formaldeído 5%, sob agitação, por 30 minutos. A seguir os embriões eram lavados duas vezes com 500 µL de PBT, sob agitação, durante 5 minutos. Após as lavagens com PBT, os embriões eram incubados em PBT:metanol (1:1), sob agitação, durante 5 minutos, seguido de 2 lavagens, de 5 minutos cada em 500 µL de metanol e 4 lavagens, de 15 minutos cada, em 500 µL de etanol. Posteriormente às lavagens em etanol, os embriões eram lavados com 500 µL de metanol. Para finalizar as lavagens, retirava-se o sobrenadante e acrescentavam-se 750 µL de metanol e 750 µL de PBT e mantinham-se os embriões sob agitação,

por cinco minutos. Em seguida, o sobrenadante era removido e os embriões eram lavados três vezes em 500 µL de PBT, sob agitação, por 10 minutos. Ao final, o sobrenadante era retirado e adicionavam-se 3 gotas de meio de montagem “Aqua-polymount” (Polysciences) e os embriões eram montados em lâminas histológicas para documentação. Modificações do protocolo acima foram testadas e estão resumidas na tabela 2.

**Tabela 2: Modificações testadas no protocolo de hibridação *in situ* em *Pseudolycoreiella hygida***

Protocolo	Sondas Testadas	Descrição da Modificação	Resultado Observado
Protocolo Tautz e Pfeifle, 1989	<i>Ubx</i> obtido a partir de clone genômico	Nenhuma	Marcações na cutícula dos embriões
Protocolo Tautz e Pfeifle, 1989	<i>abdA</i> obtido a partir de clone genômico	Nenhuma	Marcações na cutícula dos embriões
Protocolo Tautz e Pfeifle, 1989	<i>Ubx</i> ; <i>abdA</i> e <i>AbdB</i> obtidos a partir de clones genômicos	Nenhuma	Marcações na cutícula dos embriões
Protocolo Tautz e Pfeifle, 1989	<i>Ubx</i> ; <i>abdA</i> e <i>AbdB</i> obtidos a partir de clones genômicos e de cDNA	1) Omissão da etapa de hidrólise alcalina durante coleta de embriões e aumento do tempo de incubação com <i>Trichoderma harzianum</i> lyzing enzymes; 2) Aumento em 10 X da quantidade de sonda empregada 3) Testadas várias idades	Marcações na cutícula dos embriões.  Em embriões jovens houve uma marcação difusa presente também no controle realizado com sondas <i>senso</i>
Protocolo Tautz e Pfeifle, 1989	<i>Ubx</i> ; <i>abdA</i> e <i>AbdB</i> obtidos a partir de clones de cDNA	1) Omissão da etapa de hidrólise alcalina durante coleta de embriões e aumento do tempo de incubação com <i>Trichoderma harzianum</i> lyzing enzymes	Marcações na cutícula dos embriões
Protocolo Tautz e Pfeifle, 1989	<i>Ubx</i> ; <i>abdA</i> e <i>AbdB</i> obtidos a partir de clones genômicos e de cDNA	1) Omissão da etapa de hidrólise alcalina durante coleta de embriões e aumento do tempo de incubação com <i>Trichoderma harzianum</i> lyzing enzymes 2) 24 horas de hibridação	Marcações na cutícula dos embriões
Protocolo Tautz e Pfeifle, 1989 com utilização de solução de hibridação de	<i>Ubx</i> ; <i>abdA</i> e <i>AbdB</i> obtidos a partir de clones de segmento genômico e de cDNA	1) Omissão da etapa de hidrólise alcalina durante coleta de embriões e aumento do tempo de incubação com	Marcações na cutícula dos embriões

Sinigaglia <i>et al.</i> , 2018		<i>Trichoderma harzianum</i> lyzing enzymes 2) Não foi utilizada formamida na solução de hibridação; 3) Aumento na temperatura de hibridação	
Protocolo Tautz e Pfeifle, 1989	<i>Ubx</i> ; <i>abdA</i> e <i>AbdB</i> obtidos a partir de clones de segmento genômico e de cDNA	1) Omissão da etapa de hidrólise alcalina durante coleta de embriões e aumento do tempo de incubação com <i>Trichoderma harzianum</i> lyzing enzymes 2) Embriões foram lavados com PBTT (PBS 1X + Triton-X 0,1 %); 3) Embriões foram fixados em PBTT + DMSO 5%	Marcações na cutícula dos embriões  Algumas marcações difusas presentes também no controle realizado com sondas <i>sense</i>
Protocolo Tautz e Pfeifle, 1989	<i>Ubx</i> ; <i>abdA</i> e <i>AbdB</i> obtidos a partir de clones de segmento genômico e de cDNA	1) Omissão da etapa de hidrólise alcalina durante coleta de embriões e aumento do tempo de incubação com <i>Trichoderma harzianum</i> lyzing enzymes 2) Diminuição da temperatura de hibridação para 50 °C	Marcações na cutícula dos embriões

Coluna “Protocolo” descreve a referência do protocolo utilizado como ponto de partida. A coluna “Sondas testadas” descreve as sondas empregadas no experimento. A coluna “Descrição da modificação” descreve as modificações realizadas no protocolo de hibridação *in situ* ou no protocolo de coleta, fixação e permeabilização de embriões de *Pseudolycoriella hygida*. Na coluna “Resultados Obtidos” é descrito um breve resumo do resultado observado.

### 3.22 Documentação

Os embriões eram analisados e documentados com o auxílio de um microscópio DM 5000B (Leica), acoplado a uma câmera digital modelo DCF295 (Leica). Este microscópio permitia a análise de embriões tanto em campo claro, quanto em DIC (microscopia de contraste de interferência diferencial). A captura e o processamento das imagens eram realizados utilizando o *software* LAS 4.00 (Leica). Para microscopia de fluorescência era utilizado microscópio de fluorescência DM5000B Leica, acoplado a câmera digital DFC 500. As marcações com DAPI eram analisadas com filtro cubo A com faixa de excitação 340 – 380 nm e filtro supressor LP425, as marcações com Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed, Alexa Fluor® 488 eram analisadas utilizando o filtro cubo L5 para faixa de excitação 460 – 500 nm e filtro supressor



BP527/30. Para microscopia de fluorescência as imagens eram capturadas e processadas utilizando o software LAS 3.8.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Anotação e organização dos genes *Hox* em sciarídeos

Um dos objetivos deste trabalho era anotar os genes *Hox* e determinar a localização e organização destes genes no genoma de *Psl. hygida*. Nossos esforços foram dirigidos para anotação dos genes cuja função homeótica foi mantida durante a evolução, especificamente anotamos os genes do complexo Antennapedia (*lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr*, *Atnp*) e Ultrabithorax (*Ubx*, *abdA* e *AbdB*). Todos os genes *Hox* estão localizados no *scaffold* genômico 3, que corresponde ao cromossomo X de *Psl. hygida* (TRINCA *et al.*, 2023). O *locus Hox* de *Psl. hygida* apresenta 13,9 Mb e foi identificado o seguinte ordenamento destes genes ao longo do cromossomo X: *labial*, *proboscipedia*, *Deformed*, *Abdominal-B*, *abdominal-A*, *Ultrabithorax*, *Antennapedia* e *Sex Combs Reduced*. O tamanho de cada um dos genes também foi determinado: *lab* compreende 155187 pb, *pb* 266377 pb, *Dfd* 168691 pb, *AbdB* 222883 pb, *abdA* 123870 pb, *Ubx* 217812 pb, *Antp* 48740 pb e *Sex Combs Reduced* compreende 109342 pb, respectivamente (tabela 3).

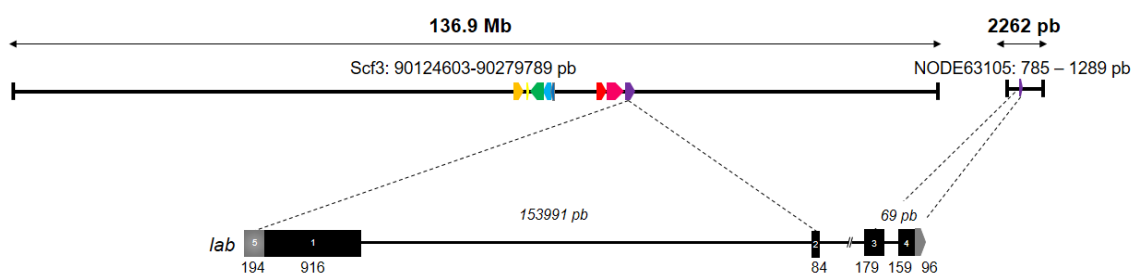
**Tabela 3: Coordenada dos genes *Hox* no genoma de *Pseudolycoriella hygida***

Gene	Início	Fim	Tamanho (pb)
<i>labial</i>	90124603	90279789	155187
Intergênico			239164
<i>proboscipedia</i>	89619064	89885440	266377
Intergênico			1557527
<i>Deformed</i>	87892846	88061536	168691
Intergênico			8292716
<i>Abdominal-B</i>	79377249	79600131	222883
Intergênico			476296
<i>abdominal-A</i>	78777085	78900954	123870
Intergênico			321636
<i>Ultrabithorax</i>	78237639	78455450	217812
Intergênico			614481
<i>Antennapedia</i>	77574420	77623159	48740
Intergênico			326007
<i>Sex Combs Reduced</i>	77139073	77248414	109342
<b>Tamanho do complexo <i>Hox</i> em Mb:</b>			<b>13,1</b>

A coluna "Gene" descreve os genes *Hox* e as regiões intergênicas. As colunas "Início" e "Fim" descrevem as coordenadas no *scaffold* genômico 3, de 136.9 Mb, anotado como cromossomo X. A coluna "Tamanho (pb)" descreve o tamanho de cada região. O tamanho do *locus Hox* está descrito na linha "Tamanho do *locus Hox* em Mb

#### 4.1.1. Anotação dos genes *Hox* em *Pseudolykoriella hygida*

Os genes *Hox* foram anotados utilizando como ponto de partida o conjunto de transcriptomas embrionários e o genoma de *Ps. hygida* (Trinca *et al.* 2023). O primeiro gene anotado foi o gene *labial* (*lab*). As buscas no transcriptoma utilizando sequências de *D. melanogaster* resultaram na identificação de um único transcrito de 1628 nucleotídeos (E\_24-72\_DN3482\_c0\_g1\_i1). O transcrito identificado foi utilizado como sequência de busca no genoma de *Ps. hygida* e resultou na identificação do *scaffold* genômico correspondente ao cromossomo X (136,9 Mb). Entretanto, o *scaffold* identificado não cobria toda a extensão do transcrito. Uma porção de 434 nucleotídeos da região 3' do transcrito foi identificada no *contig* genômico NODE63105 (2262 pb) que faz parte de uma das montagens do genoma. Este *contig*, que não faz parte da montagem final do genoma, contém dois éxons de *lab* e foi utilizado na proposta do modelo do gene (figura 5). As análises revelaram que o gene *lab* de *Ps. hygida* apresenta 4 éxons, dos quais dois deles estão distribuídos em um segmento genômico de pelo menos 155187 pb do cromossomo X (tabela 3). O transcrito identificado codifica um polipeptídeo de 445 aminoácidos (49 kDa). Buscas no NCBI revelaram que a sequência polipeptídica predita contém um domínio homeobox e apresenta alta similaridade com a proteína *lab* de *Bradysia tilicola* (figura 6 e tabela 4).



**Figura 5: Representação gráfica da estrutura do gene *labial* de *Ps. hygida*.** O número acima das linhas com setas indicam o tamanho total, 136.9 Mb e 2262 pb, do *scaffold* 3 (cromossomo X) e do contig NODE63105, respectivamente. O contig genômico NODE63105 foi incluído neste modelo, pois contém a extremidade 3' de *lab*. Os números abaixo descrevem as coordenadas do gene *labial* no *scaffold* 3 e do contig NODE63105. O ordenamento e a posição relativa do locus *Hox* no *scaffold* 3 está representada com setas coloridas, em roxo o gene *lab*, em rosa o gene *pb*, em vermelho o gene *Dfd*, em azul escuro o gene *AbdB*, em azul claro o gene *abdA*, em verde o gene *Ubx*, em amarelo gene *Antp* e em laranja o gene *Scr*. O modelo gênico do gene *lab* (seta roxa) está representado abaixo e mostra a posição de cada éxon, dos íntrons e das regiões 5' e 3' UTR, bem como a direção de transcrição do gene. Neste diagrama a proporção entre o tamanho dos éxons e íntrons não foi mantida. Em cinza, as regiões 5' e 3' UTR. Em preto, os éxons. O tamanho dos íntrons, em pares de bases, é mostrado acima de cada diagrama em itálico. Os números mostrados abaixo dos éxons e regiões 5' e 3' UTR indicam o tamanho destas regiões em pares de bases.

**Tabela 4: Resultado de BLASTp no banco nr do NCBI, utilizando como sequência de busca os polipeptídeos Hox de *Psl. hygida***

Polipeptídeo	Melhor Hit	Organismo	e-value	Identidade
lab	XP_037052155.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	97,00 %
pb-1	XP_037052151.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	89,20 %
pb-2	XP_037052147.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	89,81 %
pb-3	XP_037052148.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	89,89 %
Dfd	XP_037052138.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	93,68%
Scr	XP_037052134.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	98,54%
Antp	XP_037052126.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	98,68%
Ubx	XP_037052122.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	99,00%
abdA.1	XP_037052112.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	98,43%
abdA.2	XP_037052114.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	97,01%
abdA.3	XP_037052112.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	98,17%
abdA.4	XP_037052114.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	97,24%
abdA.5	XP_037052114.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	97,51%
abdA.6	XP_037052114.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	92,54%
abdA.7	XP_037052120.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	91,99%
abdA.8	XP_037052115.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	97,55%
abdA.9	XP_037052120.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	98,35%
abdA.10	XP_037052121.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	92,46%
abdA.11	XP_037052114.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	92,39%
AbdB.1	XP_037052106.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	87,28%
AbdB.2	XP_037052106.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	95,09%
AbdB.3	XP_037052106.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	95,09%
AbdB.4	XP_037052106.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	85,50%
AbdB.5	XP_037052106.1	<i>Bradysia tilicola</i>	0,0	94,70%

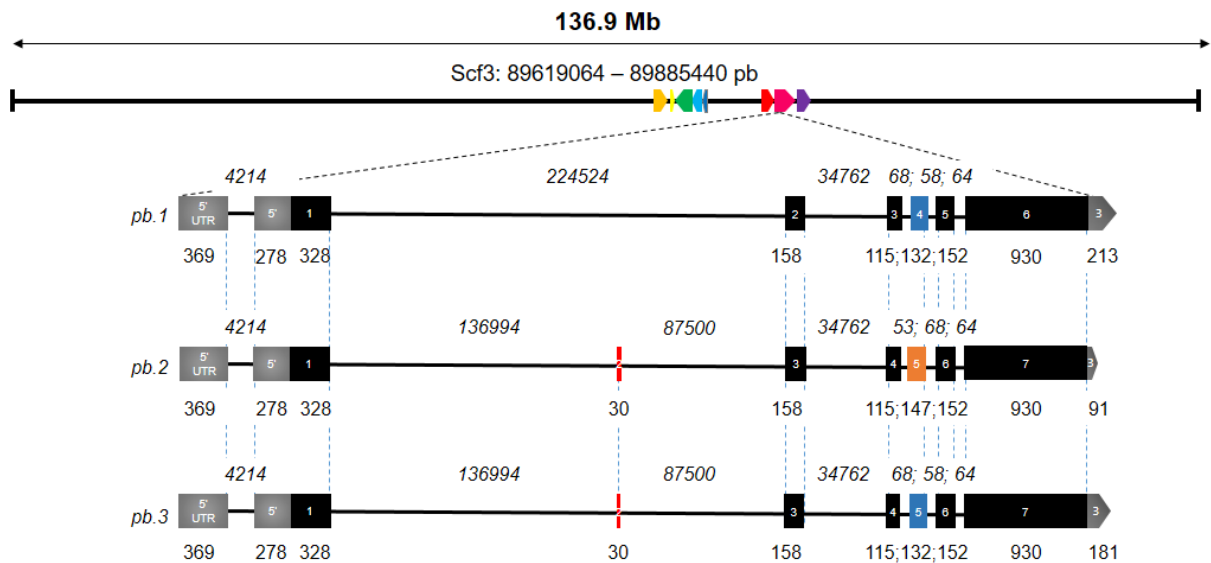
Coluna “Polipeptídeo” descreve a sequência polipeptídica que foi analisada no BLASTp. Coluna “Melhor hit” descreve o número de acesso do polipeptídeo com maior similaridade identificado no BLASTp. A coluna “Organismo” descreve o nome da espécie à qual o polipeptídeo com maior identidade encontrada pertence. A coluna “e-value” descreve o e-value do alinhamento entre o polipeptídeo de *Psl. hygida* e o identificado no BLASTp e a coluna “Identidade” descreve a identidade entre a sequência de busca e a sequência encontrada no banco de dados.

O gene *proboscipedia* (*pb*) constitui o segundo gene *Hox* anotado. Três transcritos foram identificados no transcriptoma embrionário: E\_0-12\_DN5648\_c2\_g2\_i3 (2704 nt, denominado isoforma 1 de *pb* ou *pb.1*), E\_72-120\_DN6531\_c0\_g1\_i3 (2597 nt, denominado isoforma 2 de *pb* ou *pb.2*) e E\_0-12\_DN5648\_c2\_g2\_i7 (2701 nt, denominado isoforma 3 de *pb* ou *pb.3*). Todos os transcritos identificados alinham no cromossomo X. O gene *pb* compreende pelo menos 266377 pb no genoma de *Psl.hygida* (tabela 3). A isoforma *pb.1* apresenta 6 éxons e as isoformas *pb.2* e *pb.3* apresentam 7 éxons (Figura 7). Os transcritos identificados codificam as seguintes proteínas preditas: *pb.1* (604 aminoácidos / 68 kDa); *pb.2* (619 aminoácidos / 70 kDa) e *pb.3* (614 aminoácidos / 69 kDa), que contêm o domínio *homeobox* (figura 6). Buscas nos bancos de dados NCBI confirmaram que

as sequências polipeptídicas apresentam alta similaridade com a proteína proboscipedia de *Bradysia tilicola* (tabela 4).

lab	MSSSLLGLPSSITNSLLANNNNNSGR <b>TNFTNKQLTELEKEFHFNKYLTRARRIEIANTL</b>	387
pb.1	-----AEFVAENGL <b>PRRLRTAYTNTQLLELEKEFHFNKYLCRPRRIEIAASL</b>	156
pb.2	-----SINDGAEFVAENGL <b>PRRLRTAYTNTQLLELEKEFHFNKYLCRPRRIEIAASL</b>	166
pb.3	-----SINDGAEFVAENGL <b>PRRLRTAYTNTQLLELEKEFHFNKYLCRPRRIEIAASL</b>	166
Dfd	-----VKGQYQPGME <b>PKRQRTAYTRHQLLELEKEFHFNKYLTRRRRIEIAHTL</b>	276
Antp	-----ERKRGRQTYTRY <b>QLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHAL</b>	259
Scr	S-----TVNANGET <b>KRQRTSYTRYQLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHAL</b>	287
Ubx	-----ANG-LRRRGRQTYTRY <b>QLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHAL</b>	247
abdA.1	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	244
abdA.2	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	243
abdA3	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	243
abdA.4	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	243
abdA.5	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	244
abdA.6	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	226
abdA.7	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	224
abdA.8	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	226
abdA.9	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	224
abdA.10	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	226
abdA.11	F-----NGPNGCPRRGR <b>QTYTRFQLELEKEFHFNHYLTRRRRIEIAHAL</b>	226
AbdB.1	VGVGAVGSCTPSNPLEWTGQVTV <b>RKKRKPYSKFQLELEKEFLFNAYVSKQKRWELARAL</b>	290
AbdB.2	VGVGAVGSCTPSNPLEWTGQVTV <b>RKKRKPYSKFQLELEKEFLFNAYVSKQKRWELARAL</b>	251
AbdB.3	VGVGAVGSCTPSNPLEWTGQVTV <b>RKKRKPYSKFQLELEKEFLFNAYVSKQKRWELARAL</b>	251
AbdB.4	VGVGAVGSCTPSNPLEWTGQVTV <b>RKKRKPYSKFQLELEKEFLFNAYVSKQKRWELARAL</b>	290
AbdB.5	VGVGAVGSCTPSNPLEWTGQVTV <b>RKKRKPYSKFQLELEKEFLFNAYVSKQKRWELARAL</b>	251
	* * * * *	
lab	<b>QLNETQVKIWFQNRMRKQKKRIKEGLVPAESVD--S-MPNVTASNSESTLPENS DNSRES</b>	444
Pb.1	<b>DLTERQVKVWFQNRMRKHKRQTL</b> SKSEDDENKDSLKGDDDSQ--QCNIIFPDSSSKK---	206
Pb.2	<b>DLTERQVKVWFQNRMRKHKRQTL</b> SKSEDDENKDSLKGDDDSQ--QCITIFPDSSSKK---	221
Pb.3	<b>DLTERQVKVWFQNRMRKHKRQTL</b> SKSEDDENKDSLKGDDDSQ--QCNIIFPDSSSKK---	216
Dfd	<b>TLSE</b> RQIKIWFQNRMRK <b>FKK</b> DNKLPNTKNTRKNGDS--NN---SSGKKPKRNNNISKK	331
Antp	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKWK</b> KENKTKGEPGSGDNADEITPPSS-----PQ-----	303
Scr	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKWK</b> KEHKMASMNIVPY---HMSPYGH-----PY-----	304
Ubx	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> EIQAIKELNEQEKQAQAQAAVAVAQVISEQN-----	328
abdA.1	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	301
abdA.2	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	304
abdA3	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	303
abdA.4	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	303
abdA.5	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	303
abdA.6	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	304
abdA.7	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	284
abdA.8	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	286
abdA.9	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	284
abdA.10	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	286
abdA.11	<b>CLTERQIKIWFQNRMRKLLK</b> ELRAVKEINEQARRDREEQEKMKQESLSQAQHNNKHSQ	286
AbdB.1	<b>NLTERQVKIWFQNRMRKNK</b> NSQRQSSQNNNNNTNSN-----HNHGQPPQTHHNP	344
AbdB.2	<b>NLTERQVKIWFQNRMRKNK</b> NSQRQSSQNNNNNTNSN-----HNHGQPPQTHHNP	305
AbdB.3	<b>NLTERQVKIWFQNRMRKNK</b> NSQRQSSQNNNNNTNSN-----HNHGQPPQTHHNP	305
AbdB.4	<b>NLTERQVSN</b> -----	299
AbdB.5	<b>NLTERQVSN</b> -----	260
	*****	

**Figura 6: Alinhamento das sequências polipeptídicas preditas dos genes homeóticos de *Psl. hygida*.** Alinhamento das sequências polipeptídicas preditas dos genes homeóticos de *Psl. hygida*, realizado com o Clustal Ômega (Madeira *et al.*, 2019). Em **negrito** está destacado o domínio homeobox (pfam00046) presente nas sequências polipeptídicas deduzidas a partir dos transcritos *Hox* de *Psl. hygida*. Os \* destacam os resíduos de aminoácidos conservados em todas as sequências polipeptídicas. Em amarelo estão destacados os resíduos de aminoácidos altamente conservados no domínio homeobox, pfam00046 (GEHRING, 1992).

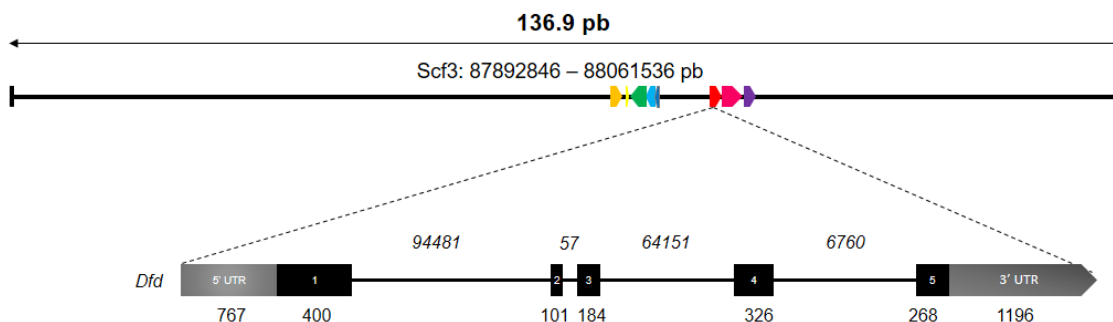


**Figura 7: Representação gráfica da estrutura do gene *proboscipedia* de *Psl. hygida*.** O número acima da linha com setas (**136.9 kb**) indica o tamanho total do *scaffold* 3 (cromossomo X) no qual localiza-se o *locus Hox* de *Psl. hygida*. Abaixo da linha com setas são mostradas as coordenadas do cromossomo X que compreendem o gene *proboscipedia*. As setas coloridas representam a localização dos genes *Hox* no cromossomo X, e a direção de transcrição de cada gene. Em roxo o gene *lab*, em rosa o gene *pb*, em vermelho o gene *Dfd*, em azul escuro o gene *AbdB*, em azul claro o gene *abdA*, em verde o gene *Ubx*, em amarelo gene *Antp* e em laranja o gene *Scr*. O modelo gênico do gene *pb* (seta rosa) está representado abaixo e mostra a posição de cada éxon, dos íntrons e das regiões 5' e 3' UTR, bem como a direção de transcrição do gene. Nestes diagramas entre o tamanho dos éxons e íntrons não foi mantida. Em cinza, as regiões 5' e 3' UTR. Em preto, os éxons comuns a todos as isoformas de *pb*. Em vermelho os éxons únicos de *pb.2* e *pb.3*. Em azul os éxons únicos de *pb.1* e *pb.3* e em laranja o éxon único de *pb.2*. O tamanho dos íntrons, em pares de bases, é mostrado acima de cada diagrama em itálico. Os números mostrados abaixo dos éxons e regiões 5' e 3' UTR indicam o tamanho destas regiões em pares de bases.

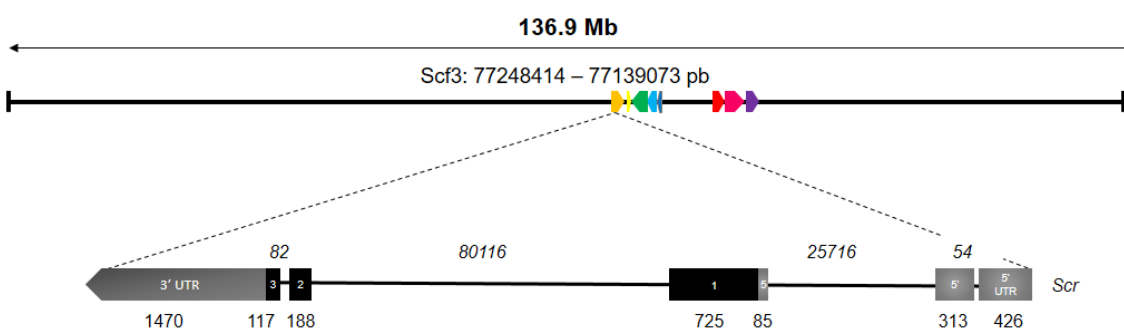
O terceiro gene *Hox* anotado foi o gene *Deformed (Dfd)*. Apenas um transcrito de *Dfd* foi identificado, E\_96-144\_DN8487\_c2\_g1\_i1 (3242 nt). O transcrito identificado alinha no cromossomo X. O gene *Dfd* compreende pelo menos 168690 pb no genoma de *Psl. hygida* (tabela 3) e apresenta 5 éxons (Figura 8). O transcrito identificado codifica uma proteína predita de 425 aminoácidos (25 kDa) que contém o domínio homeobox (figura 6). Buscas nos bancos de dados NCBI confirmaram que a sequência polipeptídica apresenta alta similaridade com a proteína Deformed de *Bradysia tilicola* (tabela 4).

Os genes *Hox* de *Psl. hygida* apresentam uma organização genômica distinta da observada em *D. melanogaster*. Para facilitar a leitura, optamos por realizar a descrição dos genes de *Psl. hygida* seguindo o ordenamento observado em *D. melanogaster* e descreveremos o ordenamento dos genes *Hox* de *Psl. hygida* no próximo tópico. O quarto gene anotado consistiu o gene *Sex combs reduced (Scr)*. Foi identificado um único transcrito, E\_0-12\_DN5350\_c0\_g2\_i3 (3324 nt) o qual alinha no

cromossomo X. O gene *Scr* apresenta 109341 pb de extensão e compreende a 3 éxons (figura 9). A sequência polipeptídica deduzida a partir do transcrito identificado apresenta 342 aminoácidos (37 kDa). O domínio homeobox está conservado (figura 6) e a sequência polipeptídica apresenta alta similaridade com *Scr* de *Bradysia tilicola* (tabela 4).

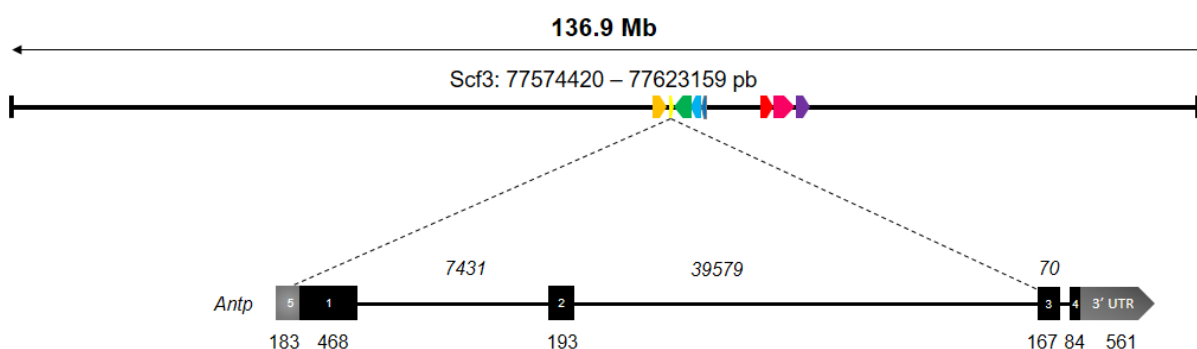


**Figura 8: Representação gráfica da estrutura do gene *Deformed* de *Psl. hygida*.** O número acima da linha com setas (**136.9 kb**) indica o tamanho total do scaffold 3 (cromossomo X) no qual localiza-se o locus *Hox* de *Psl. hygida*. Abaixo da linha com setas, são mostradas as coordenadas do cromossomo X que compreendem o gene *Deformed*. As setas coloridas representam a localização dos genes *Hox* no cromossomo X e a direção de transcrição de cada gene. Em roxo o gene *lab*, em rosa o gene *pb*, em vermelho o gene *Dfd*, em azul escuro o gene *AbdB*, em azul claro o gene *abdA*, em verde o gene *Ubx*, em amarelo gene *Antp* e em laranja o gene *Scr*. O modelo gênico do gene *Dfd* (seta vermelha) está representado abaixo e mostra a posição de cada éxon, dos íntrons e das regiões 5' e 3' UTR, bem como a direção de transcrição do gene. Neste diagrama a proporção entre o tamanho dos éxons e íntrons não foi mantida. Em cinza, as regiões 5' e 3' UTR. Em preto, os éxons. O tamanho dos íntrons, em pares de bases, é mostrado acima de cada diagrama em itálico. Os números mostrados abaixo dos éxons e regiões 5' e 3' UTR indicam o tamanho destas regiões em pares de bases



**Figura 9: Representação gráfica da estrutura do gene *Sex Combs Reduced* de *Psl. hygida*.** O número acima da linha com setas (**136.9 kb**) indica o tamanho total do scaffold 3 (cromossomo X) no qual localiza-se o locus *Hox* de *Psl. hygida*. Abaixo da linha com setas são mostradas as coordenadas do cromossomo X que compreendem o gene *Sex Combs Reduced*. As setas coloridas representam a localização dos genes *Hox* no cromossomo X e a direção de transcrição de cada gene. Em roxo o gene *lab*, em rosa o gene *pb*, em vermelho o gene *Dfd*, em azul escuro o gene *AbdB*, em azul claro o gene *abdA*, em verde o gene *Ubx*, em amarelo gene *Antp* e em laranja o gene *Scr*. O modelo gênico do gene *Scr* (seta laranja) está representado abaixo e mostra a posição de cada éxon, dos íntrons e das regiões 5' e 3' UTR, bem como a direção de transcrição do gene. Neste diagrama a proporção entre o tamanho dos éxons e íntrons não foi mantida. Em cinza, as regiões 5' e 3' UTR. Em preto, os éxons. O tamanho dos íntrons, em pares de bases, é mostrado acima de cada diagrama em itálico. Os números mostrados abaixo dos éxons e regiões 5' e 3' UTR indicam o tamanho destas regiões em pares de bases.

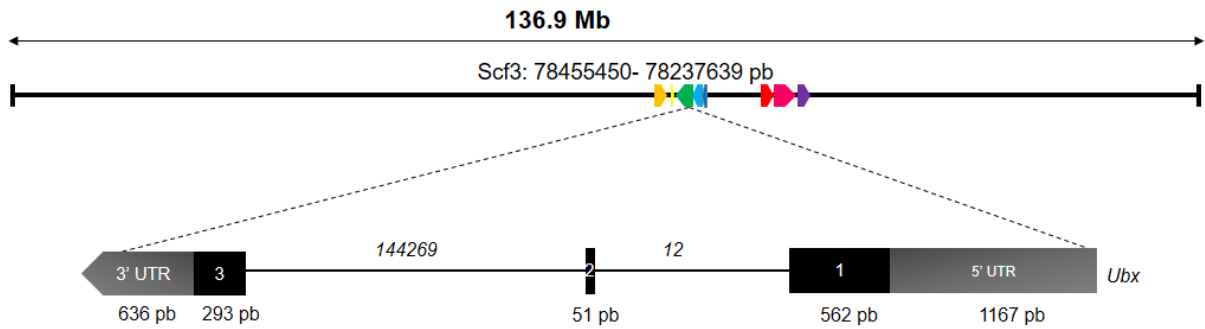
O gene *Antennapedia* de *Psl. hygida* foi o quinto gene *Hox* de *Psl. hygida* anotado. Foi identificado um transcrito de *Antp*, E\_96-144\_DN8810\_c0\_g2\_i2 de 2173 nucleotídeos. O transcrito identificado de *Antp* alinha com o cromossomo X, o gene apresenta 48740 pb de extensão e quatro éxons (figura 10). A sequência polipeptídica deduzida de *Antp* apresenta 303 aminoácidos (34 kDa). A sequência polipeptídica de *Antp* apresenta um domínio homeobox (figura 6) e alta similaridade com *Antp* de *Bradysia tilicola* (tabela 4).



**Figura 10: Representação gráfica da estrutura do gene *Antennapedia* de *Psl. hygida*.** O número acima da linha com setas (**13.9 Mb**) indica o tamanho total do *scaffold* 3 (cromossomo X) no qual localiza-se o *locus Hox* de *Psl. hygida*. Abaixo da linha com setas são mostradas as coordenadas do cromossomo X que compreendem o gene *Antennapedia*. As setas coloridas representam a localização dos genes *Hox* no cromossomo X e a direção de transcrição de cada gene. Em roxo o gene *lab*, em rosa o gene *pb*, em vermelho o gene *Dfd*, em azul escuro o gene *AbdB*, em azul claro o gene *abdA*, em verde o gene *Ubx*, em amarelo gene *Antp* e em laranja o gene *Scr*. O modelo gênico do gene *Antp* (seta amarela) está representado abaixo e mostra a posição de cada éxon, dos íntrons e das regiões 5' e 3' UTR, bem como a direção de transcrição do gene. Neste diagrama a proporção entre o tamanho dos éxons e íntrons não foi mantida. Em cinza, as regiões 5' e 3' UTR. Em preto, os éxons. O tamanho dos íntrons, em pares de bases, é mostrado acima de cada diagrama em itálico. Os números mostrados abaixo dos éxons e regiões 5' e 3' UTR indicam o tamanho destas regiões em pares de bases

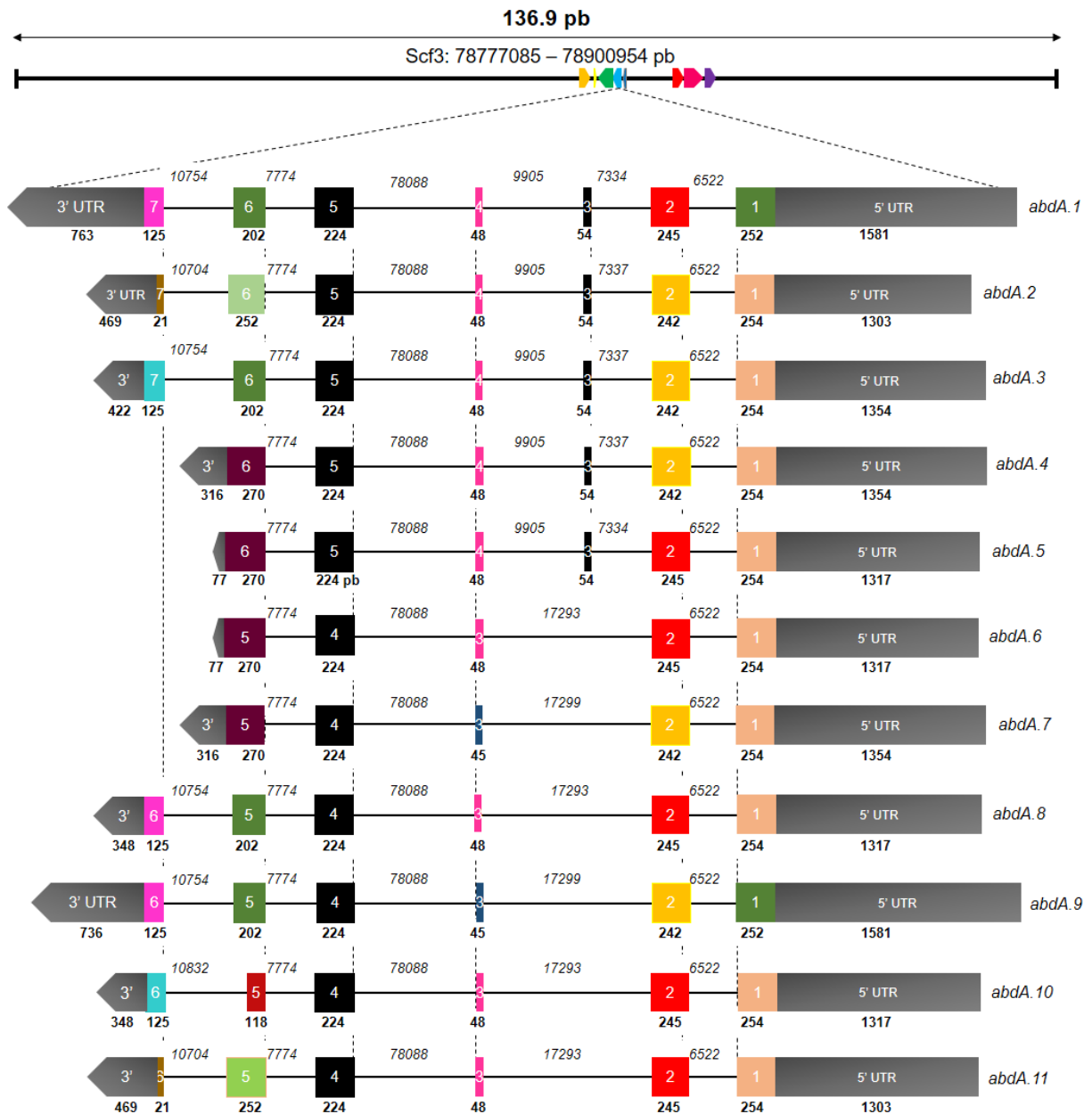
O sexto gene anotado foi o gene *Ultrabithorax (Ubx)*. A busca por transcritos de *Ubx* resultou na identificação de um transcrito, E\_96-144\_DN8873\_c2\_g1\_i1 (2709 nt). O transcrito identificado alinha no cromossomo X e o gene compreende pelo menos 217812 pb no genoma de *Psl. hygida* (tabela 3) e apresenta 3 éxons (figura 11). A sequência polipeptídica deduzida de *Ubx* apresenta 301 aminoácidos (32 kDa), apresenta o domínio homeobox e buscas no NCBI indicaram alta similaridade com *Ubx* de *Bradysia tilicola* (tabelas 4).





**Figura 11: Representação gráfica da estrutura do gene *Ultrabithorax* de *Psl. hygida*.** O número acima da linha com setas (**13.9 Mb**) indica o tamanho total do *scaffold 3* (cromossomo X) no qual localiza-se o *locus Hox* de *Psl. hygida*. Abaixo da linha com setas, são mostradas as coordenadas do cromossomo X que compreendem o gene *Ubx*. As setas coloridas representam a localização dos genes Hox no cromossomo X e a direção de transcrição de cada gene. Em roxo o gene *lab*, em rosa o gene *pb*, em vermelho o gene *Dfd*, em azul escuro o gene *AbdB*, em azul claro o gene *abdA*, em verde o gene *Ubx*, em amarelo gene *Antp* e em laranja o gene *Scr*. O modelo gênico do gene *Ubx* (seta verde) está representado abaixo e mostra a posição de cada éxon, dos íntrons e das regiões 5' e 3' UTR, bem como a direção de transcrição do gene. Neste diagrama a proporção entre o tamanho dos éxons e íntrons não foi mantida. Em cinza, as regiões 5' e 3' UTR. Em preto, os éxons. O tamanho dos íntrons, em pares de bases, é mostrado acima de cada diagrama em itálico. Os números mostrados abaixo dos éxons e regiões 5' e 3' UTR indicam o tamanho destas regiões em pares de bases.

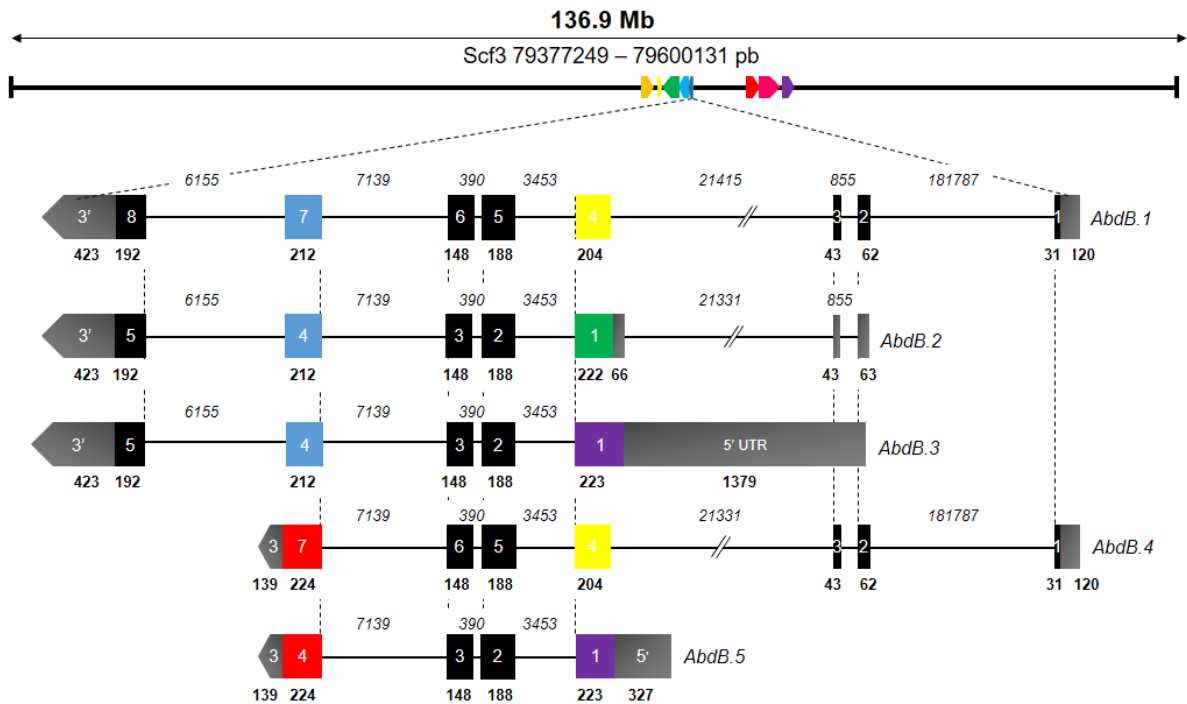
O sétimo gene anotado foi o gene *abdominal-A* (*abdA*). A busca no transcriptoma por sequências ortólogas de *abdA* resultou na identificação de onze transcritos os quais codificam diferentes isoformas proteicas (tabela 5). Os transcritos foram identificados como *abdA.1* (3496 nt), *abdA.2* (2867 nt), *abdA.3* (2955 nt), *abdA.4* (2762 nt), *abdA.5* (2489 nt), *abdA.6* (2435 nt), *abdA.7* (2705 nt), *abdA.8* (2763 nt), *abdA.9* (3436 nt), *abdA.10* (2679 nt) e *abdA.11* (2816 nt) (figura 12). A descrição dos transcritos, das isoformas proteicas, do tamanho dos polipeptídios deduzidos e das massas preditas está apresentada na tabela 5. Todos os transcritos identificados alinham com o cromossomo X de *Psl. hygida* e o tamanho do gene é de 123870 pb (tabela 3). A análise das sequências polipeptídicas deduzidas a partir dos transcritos identificados revelou que todas as sequências apresentam o domínio homeobox (figura 6) e alta similaridade com *abdA* de *Bradysia tilicola* (tabela 4).



**Figura 12: Representação gráfica da estrutura do gene *abdominal-A* de *Psl. hygida*.** O número acima da linha com setas (13.9 Mb) indica o tamanho total do scaffold 3 (cromossomo X) no qual localiza-se o *locus Hox* de *Psl. hygida*. Abaixo da linha com setas, são mostradas as coordenadas do cromossomo X que compreendem o gene *abdA*. As setas coloridas representam a localização dos genes *Hox* no cromossomo X e a direção de transcrição de cada gene. Em roxo o gene *lab*, em rosa o gene *pb*, em vermelho o gene *Dfd*, em azul escuro o gene *AbdB*, em azul claro o gene *abdA*, em verde o gene *Ubx*, em amarelo gene *Antp* e em laranja o gene *Scr*. O modelo gênico do gene *abdA* (seta azul claro) está representado abaixo e mostra a posição de cada éxon, dos íntrons e das regiões 5' e 3' UTR, bem como a direção de transcrição do gene. Neste diagrama a proporção entre o tamanho dos éxons e íntrons não foi mantida. Em cinza, as regiões 5' e 3' UTR. Em preto, o éxon 4 o qual é comum a todas as isoformas. Note que *abdA.1*, *abdA.2*, *abdA.3*, *abdA.4* e *abdA.5* apresentam um éxon único de 54 pb também representado em preto. As cores dos éxons destacam os éxons que são idênticos em diferentes isoformas, por exemplo, o éxon 1, em salmão, é idêntico nas isoformas *abdA.11*, *abdA.10*, *abdA.8*, *abdA.6*, *abdA.5*, *abdA.4*, *abdA.3* e *abdA.2*. O tamanho dos íntrons, em pares de bases, é mostrado acima de cada diagrama em itálico. Os números mostrados abaixo dos éxons e regiões 5' e 3' UTR indicam o tamanho destas regiões em pares de bases

O último dos genes *Hox* anotado no genoma de *Psl. hygida* consistiu o gene *abdominal-B*. As buscas no transcriptoma resultaram na identificação de cinco transcritos que codificam diferentes isoformas proteicas de AbdB. Os transcritos foram identificados como *AbdB.1* (1623 nt), *AbdB.2* (1591 nt), *AbdB.3* (2831 nt), *AbdB.4* (1159 nt) e *AbdB.5* (1249 nt) (figura 13). Todos os transcritos identificados alinham com o cromossomo X e o tamanho do gene compreende 222817 pb. As sequências polipeptídicas deduzidas a partir dos transcritos identificados foram denominadas AbdB.1 (359 aa/40 kDa), AbdB.2 (320 aa/35 kDa), AbdB.3 (320 aa/35 kDa), AbdB.4 (299 aa/33kDa) e AbdB.5 (260 aa/28 kDa) (tabela 5). Os polipeptídeos AbdB.2 e AbdB.3 são idênticos, porém, diferem em sua estrutura gênica, enquanto que as isoformas AbdB.4 e AbdB.5 apresentam um domínio homeobox incompleto. Buscas no NCBI revelaram que estes polipeptídeos apresentam alta similaridade com *Abdominal-B* de *Bradysia coprohila* (tabela 4) e que as isoformas AbdB.1, AbdB.2 e AbdB.3 apresentam o domínio homeobox completo e uma região C-terminal variável (figura 6).

Em conjunto, os resultados demonstram que os genes *Hox* estão conservados em *Psl. hygida* e que todos os genes mapeados localizam-se no cromossomo X. O número de isoformas varia entre 1 (*lab*, *Dfd*, *Scr*, *Antp*, *Ubx*) e 11 (*abdA*), enquanto que a extensão dos genes varia entre 48739 pb (*Antp*) e 217811 pb (*Ubx*). O tamanho dos transcritos identificados também varia, onde o maior transcrito identificado foi o *Dfd* (6242 nt), enquanto que o menor transcrito encontrado foi *AbdB.4* (1159 nt). Em relação às sequências polipeptídicas deduzidas, o tamanho varia entre 619 aa (pb.2) e 260 aa (AbdB.5).



**Figura 13: Representação gráfica da estrutura do gene *Abdominal-B* de *Psl. hygida*.** O número acima da linha com setas (**13.9 Mb**) indica o tamanho total do *scaffold* 3 (cromossomo X) no qual localiza-se o *locus Hox* de *Psl. hygida*. Abaixo da linha com setas, são mostradas as coordenadas do cromossomo X que compreendem o gene *AbdB*. As setas coloridas representam a localização dos genes *Hox* no cromossomo X e a direção de transcrição de cada gene. Em roxo o gene *lab*, em rosa o gene *pb*, em vermelho o gene *Dfd*, em azul escuro o gene *AbdB*, em azul claro o gene *abda*, em verde o gene *Ubx*, em amarelo gene *Antp* e em laranja o gene *Scr*. O modelo gênico do gene *AbdB* (seta azul escuro) está representado abaixo e mostra a posição de cada éxon, dos íntrons e das regiões 5' e 3' UTR, bem como a direção de transcrição do gene. Neste diagrama a proporção entre o tamanho dos éxons e íntrons não foi mantida. Em cinza, as regiões 5' e 3' UTR. Os éxons representados pela cor preta são os éxons comuns a todas as isoformas. Éxons representados por cores diferentes constituem éxons encontrados em uma ou mais isoformas. Note que os éxons de 31 pb, 62 pb e 43 pb são únicos de *AbdB.1* e *AbdB.4*. O tamanho dos íntrons, em pares de bases, é mostrado acima de cada diagrama em itálico. Os números mostrados abaixo dos éxons e regiões 5' e 3' UTR indicam o tamanho destas regiões em pares de bases.

**Tabela 5: Resumo dos dados da anotação dos genes *Hox* de *Psil. hygida***

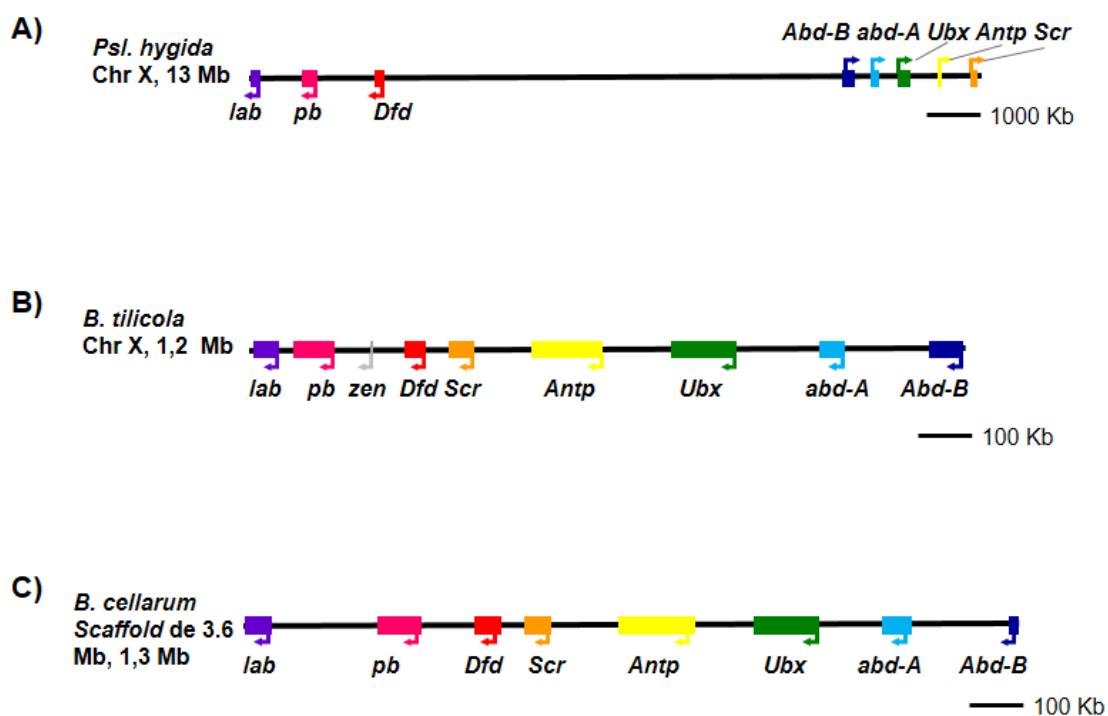
Gene	Transcrito Identificado	Nome da Isoforma	Tamanho do transcrito (nt)	Tamanho do polipeptideo (a.a)	Massa do polipeptideo (kDa)	Coordenada de Início no Genoma	Coordenada de Fim no Genoma	Tamanho do gene (pb)
<i>lab</i>	E_24-72_DN3482_c0_g1_i1_RC	<i>Lab</i>	1628	445	49	90124603	90279789	155187
<i>pb</i>	E_0-12_DN5648_c2_g2_i3	<i>pb.1</i>	2704	604	68	89619064	89885440	266377
<i>pb</i>	E_72-120_DN6531_c0_g1_i3	<i>pb.2</i>	2597	619	70	89619079	89885319	266241
<i>pb</i>	E_0-12_DN5648_c2_g2_i7	<i>pb.3</i>	2701	614	69	89619064	89885409	266346
<i>Dfd</i>	E_96-144_DN8487_c2_g1_i1	<i>Dfd</i>	6242	425	25	87892846	88061536	168691
<i>Scr</i>	E_0-12_DN5350_c0_g2_i3	<i>Scr</i>	3324	342	37	77139073	77248414	109342
<i>Antp</i>	E_96-144_DN8810_c0_g2_i2	<i>Antp</i>	2173	303	34	87892846	88061536	168691
<i>Ubx</i>	E_96-144_DN8873_c2_g1_i1	<i>Ubx</i>	2709	301	32	78455450	78237639	217812
<i>abdA</i>	E_96-144_DN7496_c0_g1_i3_RC	<i>abdA.1</i>	3496	383	42	78900954	78777085	123870
<i>abdA</i>	E_0-48_DN6567_c0_g1_i4	<i>abdA.2</i>	2867	364	40	78900678	78777483	123196
<i>abdA</i>	E_0-12_DN5460_c0_g1_i4	<i>abdA.3</i>	2955	382	42	78900729	78777396	123334
<i>abdA</i>	E_0-12_DN5460_c0_g1_i1	<i>abdA.4</i>	2762	363	39	78900729	78788343	112387
<i>abdA</i>	E_24-72_DN7451_c0_g1_i5_RC	<i>abdA.5</i>	2489	364	40	78900692	78788582	112111
<i>abdA</i>	E_24-72_DN7451_c0_g1_i4_RC	<i>abdA.6</i>	2435	346	38	78900692	78788582	112111
<i>abdA</i>	E_0-12_DN5460_c0_g1_i3	<i>abdA.7</i>	2705	344	37	78900729	78788343	112387
<i>abdA</i>	E_24-72_DN7451_c0_g1_i1_RC	<i>abdA.8</i>	2763	365	40	78900692	78777500	123193
<i>abdA</i>	E_96-144_DN7496_c0_g1_i2_RC	<i>abdA.9</i>	3436	363	40	78900954	78777085	123870
<i>abdA</i>	E_24-72_DN7451_c0_g1_i2_RC	<i>abdA.10</i>	2679	337	37	78900692	78777500	123193
<i>abdA</i>	E_0-48_DN6567_c0_g1_i2	<i>abdA.11</i>	2816	347	38	78900678	78777483	123196
<i>AbdB</i>	E_96-144_DN8873_c2_g4_i2	<i>AbdB.1</i>	1623	359	40	79600131	79377315	222817
<i>AbdB</i>	E_0-48_DN5537_c0_g1_i1_RC	<i>AbdB.2</i>	1591	320	35	79418194	79377306	40889
<i>AbdB</i>	E_48-96_DN4610_c0_g1_i1_RC	<i>AbdB.3</i>	2831	320	35	79397216	79377249	19968
<i>AbdB</i>	E_96-144_DN8873_c2_g4_i3	<i>AbdB.4</i>	1159	299	33	79600131	79383934	216198
<i>AbdB</i>	E_96-144_DN8873_c2_g4_i1	<i>AbdB.5</i>	1249	260	28	79396164	79383934	12231

Coluna “Gene” descreve o nome do gene; “transcrito identificado” descreve o código do transcrito identificado no banco de transcriptoma embrionário (número de acesso GenBank GICH00000000.1) ; “Nome da Isoforma” descreve o nome da isoforma dado ao transcrito identificado; “Tamanho do transcrito (nt)” descreve o tamanho do transcrito em nucleotídeos; “Tamanho do polipeptideo” descreve o tamanho do polipeptideo deduzido em aminoácidos; “Massa do polipeptideo em kDa” descreve a massa do polipeptideo predita em kDa; “Coordenada de início no genoma” e “Coordenada de fim no genoma” descrevem as coordenadas de início e fim no cromossomo 3 de cada transcrito mapeado, “Tamanho do gene” mostra a extensão no genoma (em pb) de cada isoforma mapeada.

#### 4.1.2 Organização dos genes *Hox* em *Psl. hygida*, *B. tilicola* e *B. cellarum*

A localização e tamanho do *locus Hox*, bem como a organização dos genes *Hox* no *locus* podem variar tanto em insetos, como na ordem Diptera (PACE *et al.*, 2016; MATTHEWS *et al.*; 2018; MUHAI; HOLLAND, 2023). Para investigar a organização e localização genômica de *Hox* nos sciarídeos *B. tilicola* e *B. cellarum* e realizar comparações com os achados em *Psl. hygida* utilizamos os dados genômicos disponíveis para estas duas espécies.

Assim como em *Psl. hygida*, em *Bradysia tilicola* o genoma disponível está montado em nível cromossômico (URBAN *et al.*, 2021). Os genes *Hox* de *B. tilicola* foram anotados a partir dos dados disponíveis no GenBank (PRJNA672144). Nesse sciarídeo, o *locus Hox* reside no *scaffold* genômico de 9.68 Mb, o qual foi descrito como cromossomo X e compreende 1,2 Mb (figura 14 B e tabela 6).



**Figura 14: Organização do locus *Hox* em *Psl. hygida*, *B. tilicola* e *B. cellarum*.** Em roxo o gene *labial* (*lab*), em rosa *proboscipedia* (*pb*), em vermelho *Deformed* (*Dfd*), em azul escuro *Abdominal-B* (*AbdB*), em azul claro *abdominal-A* (*abdA*), em verde *Ultrabithorax* (*Ubx*), em amarelo *Antennapedia* (*Antp*) e em laranja *Sex Combs Reduced* (*Scr*). As setas abaixo ou acima das caixas que representam os genes mostram a direção de transcrição de cada gene e os números ao lado, em Mb, indicam a extensão do *locus Hox* nos sciarídeos investigados. **A)** Organização dos genes *Hox* no cromossomo X de *Psl. hygida*. **B)** Organização dos genes *Hox* no cromossomo X de *B. tilicola*. **C)** Organização dos genes *Hox* em *B. cellarum*. O genoma de *B. cellarum* não foi montado em nível cromossômico, portanto, não foi possível identificar se o *scaffold* genômico identificado reside no cromossomo X.

**Tabela 6: Coordenadas dos genes *Hox* em *Bradysia tilicola***

Gene	Início	Fim	Tamanho (pb)
<i>labial</i>	8086242	8131221	44980
Segmento Intergênico			134011
<i>proboscipedia</i>	7997211	8070411	73201
Segmento Intergênico			231258
<i>Deformed</i>	7839154	7877436	38283
Intergênico			117935
<i>Sex Combs Reduced</i>	7759502	7805001	45500
Segmento Intergênico			279715
<i>Antennapedia</i>	7525287	7654468	129182
Segmento Intergênico			356220
<i>Ultrabithorax</i>	7298249	7410560	112312
Segmento Intergênico			292741
<i>abdA</i>	7117820	7163426	45607
Segmento Intergênico			262995
<i>AbdB</i>	6900432	6963754	63323
<b>Tamanho do complexo <i>Hox</i> em Mb:</b>			<b>1,2</b>

A coluna “Gene” descreve os genes *Hox* e as regiões intergênicas. As colunas “Início” e “Fim” descrevem as coordenadas no *scaffold* genômico de 9.68 Mb anotado como Cromossomo X de *B. tilicola*. A coluna “Tamanho (pb)” descreve o tamanho de cada região. O tamanho do *locus Hox* está descrito na linha “Tamanho do *locus Hox* em Mb”.

O genoma de *Bradysia cellarum* não foi montado em nível cromossômico (LI *et al.*, 2022). Entretanto, nesse sciarídeo o *locus Hox* está contido em um único *scaffold* genômico de 3.6 Mb (JAFDOW010000387), o que permitiu determinar o tamanho deste *locus* (1,3 Mb), bem como revelou o ordenamento dos genes ao longo do *scaffold* genômico identificado (figura 14 C e tabela 7).

Tanto em *B. tilicola* quanto em *B. cellarum*, o ordenamento encontrado para os genes *Hox* foi o seguinte: *labial*, *proboscipedia*, *Deformed*, *Sex Combs Reduced*, *Ultrabithorax*, *abdominal-A* e *Abdominal-B*. Além disso, verificamos que todos os genes *Hox* nestes dois sciarídeos apresentam a mesma direção de transcrição. Em conjunto nossa análise revelou que em pelo menos dois sciarídeos, *B. tilicola* e *Psil. hygida*, os genes *Hox* estão localizados no cromossomo X. Quanto à organização dos genes no *locus*, nossos dados mostram que *Psil. hygida* apresenta uma organização distinta da observada nos dois outros sciarídeos.

**Tabela 7: Coordenadas aproximadas dos genes *Hox Bradysia cellarum***

<b>Gene</b>	<b>Início</b>	<b>Fim</b>	<b>Tamanho (pb)</b>
<i>labial</i>	1816278	1861677	45400
Segmento Intergênico			143462
<i>proboscipedia</i>	1718216	1797899	79684
Segmento Intergênico			327963
<i>Deformed</i>	1469937	1518593	48657
Segmento Intergênico			140609
<i>Sex Combs Reduced</i>	1377985	1425421	47437
Segmento Intergênico			186007
<i>Antennapedia</i>	1239415	1265091	25677
Segmento Intergênico			365460
<i>Ultrabithorax</i>	899632	1012342	112711
Segmento Intergênico			283596
<i>abdA</i>	728747	782531	53785
Segmento Intergênico			251432
<i>AbdB</i>	531100	547461	16362
<b>Tamanho do locus <i>Hox</i> em Mb:</b>			<b>1,3</b>

A coluna “Gene” descreve os genes *Hox* e as regiões intergênicas. As colunas “Início” e “Fim” descrevem a coordenadas aproximadas no *scaffold* genômico de 3.6 Mb de *B. cellarum* no qual os transcritos de *Hox* de *Ps. hygida* se alinham. A coluna “Tamanho (pb)” descreve o tamanho de cada região. O tamanho do *locus Hox* está descrito na linha “Tamanho do *locus Hox* em Mb”.

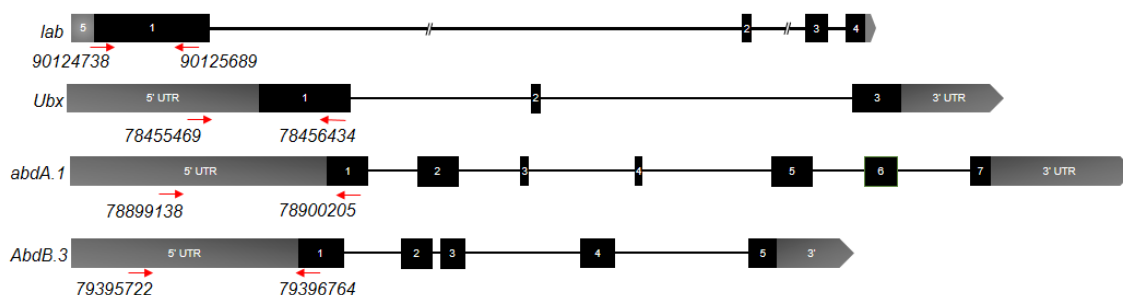
#### 4.2 Clonagem dos genes *Hox* de *Pseudolycorella hygida*

A ampliação da caracterização dos genes *Hox* em *Ps. hygida* depende da obtenção de dados experimentais. Visando a realização de experimentos de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) e caracterização do padrão de expressão dos RNAm *Hox* durante o desenvolvimento embrionário utilizando a técnica de hibridação *in situ*, realizamos a clonagem de sequências parciais de quatro genes *Hox* (*lab*, *Ubx*, *abdA* e *AbdB*). Para tanto, utilizamos como ponto de partida tanto DNA genômico, como cDNA de embriões de 4 a 6 dias, época em que é possível observar a segmentação dos embriões (Uliana, 2018).

Fragmentos genômicos parciais dos genes *labial*, *Ultrabithorax*, *abdA* e *AbdB* foram obtidos a partir da amplificação de DNA genômico extraído de embriões de *Ps. hygida*. Os insertos foram clonados no vetor pGEM-T e validados por sequenciamento. Todos os clones obtidos apresentavam os insertos esperados e confirmaram a anotação realizada (Figuras 15 e 16). Foram obtidos clones contendo os seguintes insertos: 952 pb do gene *labial*, 966 pb do gene *Ultrabithorax*, 1068 pb do gene *abdominal-A* e 1043 pb do gene *AbdB*. As regiões clonadas e as coordenadas genômicas dos oligonucleotídeos utilizados



para amplificação dos insertos a partir do DNA genômico estão apresentadas na figura 15.

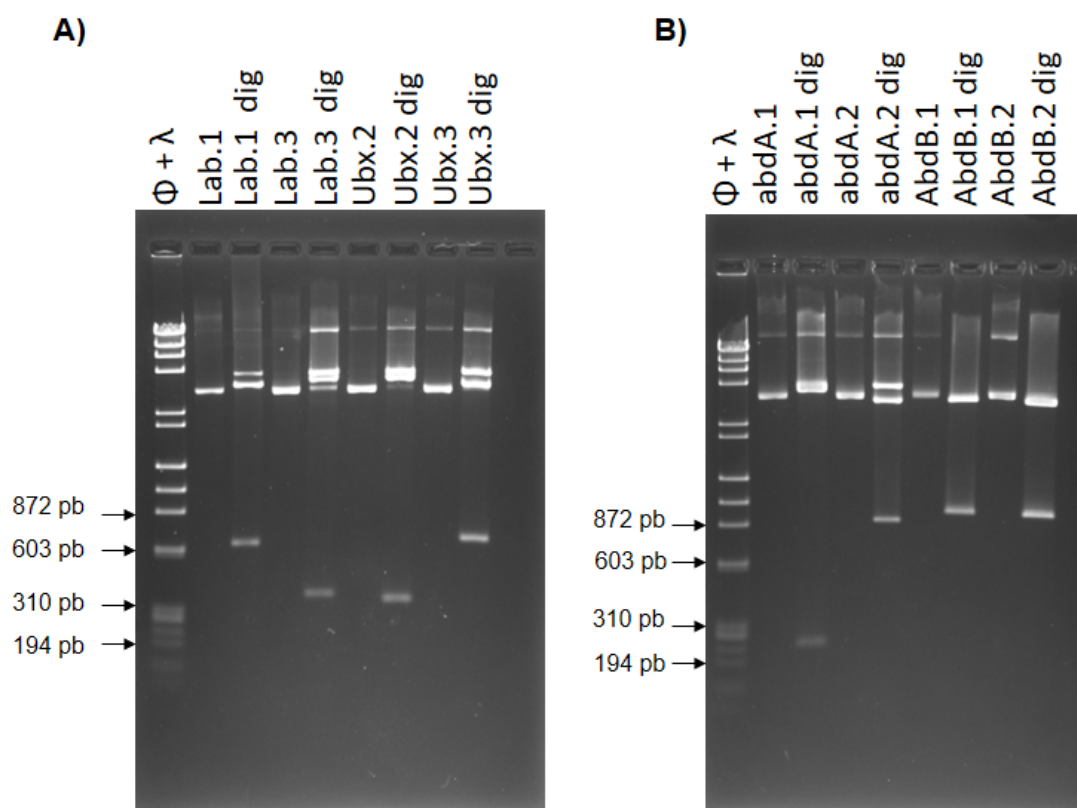


**Figura 15: Representação das regiões amplificadas e clonadas no vetor pGEM-T dos genes *Hox* de *Psl. hygida*.** Os números em itálico referem-se às coordenadas genômicas dos oligonucleotídeos utilizados. As setas em vermelho mostram a localização dos oligonucleotídeos nos diagramas dos modelos gênicos de *lab* (*labial*), *Ubx* (*Ultrabithorax*), *abdA.1* (*abdominal-A*) e *AbdB.3* (*Abdominal-B*).

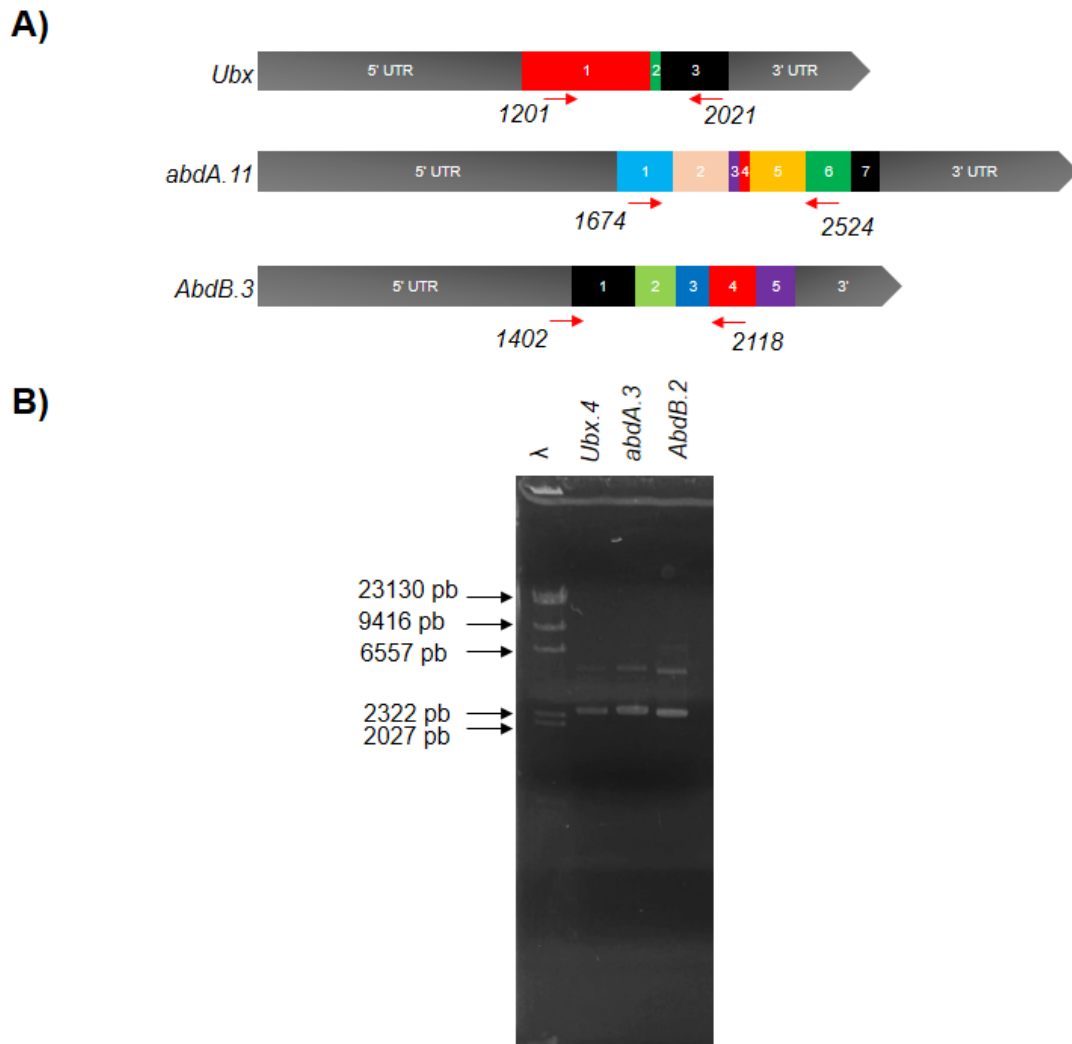
O resultado da análise do padrão de digestão dos clones obtidos com diferentes enzimas de restrição é apresentado na figura 16. Uma vez que o vetor pGEM-T permite a clonagem direta de produtos de PCR, podemos encontrar recombinantes em ambas as orientações. Especificamente, os recombinantes das séries *labial*, *Ultrabithorax* e *abdominal-A* foram digeridos com a enzima *Sph* I, para a qual existe um sítio de restrição no vetor e outro localizado assimetricamente no inserto. Como pode ser observado, foram obtidos recombinantes em ambas as orientações nessas três séries (Figura 16). No caso dos recombinantes da série *Abdominal-B* utilizamos a enzima *Pst* I, para a qual existe um sítio de restrição no vetor e outro interno no inserto. Como pode ser observado, os recombinantes mostrados na figura 16 apresentam a mesma orientação. Embora os insertos clonados constituam fragmentos genômicos, todos os insertos clonados compreendem sequências do 5' UTR e éxons codificadores e por este motivo, esses clones foram utilizados em experimentos de hibridação *in situ* de RNAm.

Porções das regiões codificadoras dos genes *Ubx*, *abdA* e *AbdB* também foram amplificadas a partir do cDNA de embriões de *Psl. hygida* com idade de 4-6 dias de desenvolvimento. O desenho deste segundo conjunto de clones visou amplificar regiões codificadoras que estivessem presentes na maioria das isoformas preditas (figura 17 A). Os insertos foram clonados no vetor pGEM-T (figura 17 B) e posteriormente validados por sequenciamento (figuras 18 – 23).

Todos os clones obtidos apresentavam o inserto esperado, confirmando parcialmente os modelos gênicos.



**Figura 16: Análise do padrão de restrição dos clones *Hox* obtidos a partir de DNA genômico.** A) Análise dos clones *labial* e *Ultrabithorax*. Nos poços “Lab.1” e “Lab.3” foram aplicados 100 ng dos recombinantes obtidos para o gene *labial*. No poço “Lab.1 dig”. e “Lab.3 dig”. foram aplicados 400 ng dos recombinantes *Lab.1* ou *Lab.3* digeridos com a enzima *Sph* I. Dependendo da orientação no vetor, o recombinante de *labial* poderia liberar um inserto de 635 pb ou 367 pb. Nos poços “Ubx.2” e “Ubx.3” foram aplicados 100 ng dos recombinantes obtidos do gene *Ubx*. Nos poços “Ubx.2 dig”. e “Ubx.3 dig” foram aplicados 400 ng dos recombinantes *Ubx.2* ou *Ubx.3* digeridos com a enzima *Sph* I. Os recombinantes de *Ubx* podem liberar um inserto de 348 pb ou 668 pb. B) Análise dos clones *abdA* e *AbdB*. Nos poços “AbdA.1” e *abdA.2*” foram aplicados 100 ng dos recombinantes do gene *abdA*. Nos poços “*abdA.1 dig*” e *abdA.2 dig*” foram aplicados 400 ng do produto da digestão dos recombinantes *abdA.1* ou *abdA.2* com a enzima *Sph* I. Os recombinantes de *abdA* podem liberar um fragmento de 230 pb ou 883 pb. Nos poços “AbdB.1” e “AbdB.2” foram aplicados 100 ng dos recombinantes do gene *AbdB*. Nos poços “AbdB.1 dig” e *AbdB.2 dig*” foram aplicados 400 ng do clone *AbdB.1* ou *AbdB.2* digerido com a enzima *Pst* I. Os recombinantes de *AbdB* quando digeridos com *Pst* I liberam um fragmento de 967 pb ou 76 pb. Nota-se que foram obtidos clones apenas em uma orientação para *AbdB*. Nos poços “ $\lambda + \phi$ ” foram aplicados 3  $\mu$ L do marcador  $\phi X174/Hae$  III e 4  $\mu$ L do marcador  $\lambda/Hind$  III, as setas apontam para os fragmentos de 872 pb, 603 pb, 310 pb e 194 pb, respectivamente.



**Figura 17: Clonagem parcial dos genes *Ubx*, *abdA* e *AbdB* a partir de cDNA de embriões de *Psl. hygida*.** **A)** Os diagramas mostram a estrutura das isoformas *Ubx* (*Ultrabithorax*), *abdA.1* (*abdominal-A*) e *AbdB-B.3* (*Abdominal-B*). Os números em itálico referem-se às coordenadas dos oligonucleotídeos utilizados nas sequências gênicas preditas e as setas em vermelho mostram a localização dos oligonucleotídeos. Note que todos os oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar regiões codificadoras. **B)** Clones obtidos a partir do cDNA de embriões dos genes *Ubx*, *abdA* e *AbdB*. Nos poços “Ubx.4”, “abdA.3” e “AbdB.2” foram aplicados aproximadamente 100 ng dos recombinantes. No poço “λ” foram aplicados 4 μL do marcador  $\lambda$ Hind III onde pode-se observar os fragmentos de 23130 pb, 9416 pb, 6557 pb, 2322 pb e 2027 pb.

Para *Ultrabithorax* foram obtidos dois diferentes clones. O Clone.1.*Ubx* apresenta um inserto que não contém a sequência codificada pelo éxon 2 de 51 pb (figura 11 e figura 18). Já o Clone.4.*Ubx* contém a sequência de 850 pb esperada e foi utilizado para a síntese das sondas. (Figuras 11 e figura 18). O fato de um dos clones de *Ubx* (Clone.1.*Ubx*) não conter o éxon 2 de 51 pb, sugere a existência de uma isoforma não mapeada a partir dos dados de transcriptoma.

Foram obtidos 3 clones de *abdA* a partir do cDNA de embriões. Para o desenho dos oligonucleotídeos para amplificação do cDNA de *abdA*, utilizamos

como ponto de partida a sequência da isoforma *abdA.1* (figura 17). O Clone.1.*abdA* contém um inserto de uma isoforma de *abdA* não mapeada (figura 12 e figura 19). O Clone.2.*abdA* apresenta uma deleção de 3 nucleotídeos que pode constituir também uma isoforma não mapeada (figura 20). O terceiro recombinante de *adb-A* obtido apresenta um inserto compatível com o transcrito da isoforma *abdA.9* (figura 21). Este clone foi utilizado para a obtenção de sondas para a realização de experimentos de hibridação *in situ*.

O terceiro conjunto de recombinantes obtidos é do gene *AbdB*. Ao desenhar os oligonucleotídeos para amplificar o cDNA de *AbdB*, foram selecionadas regiões comuns a todas isoformas mapeadas. Os recombinantes obtidos para *AbdB* são idênticos à sequência esperada e mostramos o resultado do sequenciamento do Clone.2.*abdB* (Figura 22). Os clones selecionados foram empregados como molde para a síntese de sondas *senso* e *anti-senso* que foram utilizadas em experimentos de hibridação *in situ* em embriões de *Psil. hygida*.

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      290      300      310      320      330      340      350
Ph_Ubx -----GGG CATCCACATC AAGCATCTGG GATGAGTATG ACAGCATCAT CCCACCATGA TCAATCATCA
Clone1.Ubx_F AGTGATTGGG CATCCACATC AAGCATCTGG GATGAGTATG ACAGCATCAT CCCACCATGA TCAATCATCA
Clone1.Ubx_R AGTGATTGGG CATCCACATC AAGCATCTGG GATGAGTATG ACAGCATCAT CCCACCATGA TCAATCATCA
Clone4.Ubx_F -GGGATTGGG CATCCACATC AAGCATCTGG GATGAGTATG ACAGCATCAT CCCACCATGA TCAATCATCA
Clone4.Ubx_R -GGGATTGGG CATCCACATC AAGCATCTGG GATGAGTATG ACAGCATCAT CCCACCATGA TCAATCATCA
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      360      370      380      390      400      410      420
Ph_Ubx GCCACAGCAG CCTATCGAGG TTTTCCACTA TCGTTGGGTA TGTCACCATA TGCAAATCAT CATCTTCATC
Clone1.Ubx_F GCCACAGCAG CCTATCGAGG TTTTCCACTA TCGTTGGGTA TGTCACCATA TGCAAATCAT CATCTTCATC
Clone1.Ubx_R GCCACAGCAG CCTATCGAGG TTTTCCACTA TCGTTGGGTA TGTCACCATA TGCAAATCAT CATCTTCATC
Clone4.Ubx_F GCCACAGCAG CCTATCGAGG TTTTCCACTA TCGTTGGGTA TGTCACCATA TGCAAATCAT CATCTTCATC
Clone4.Ubx_R GCCACAGCAG CCTATCGAGG TTTTCCACTA TCGTTGGGTA TGTCACCATA TGCAAATCAT CATCTTCATC
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      430      440      450      460      470      480      490
Ph_Ubx AGTCCCCTTC AACACAAGAA TCGCCATACG ATGCCAGTAT AACAGCAGCA TGCACCAAAT TATATGACGG
Clone1.Ubx_F AGTCCCCTTC AACACAAGAA TCGCCATACG ATGCCAGTAT AACAGCAGCA TGCACCAAAT TATATGACGG
Clone1.Ubx_R AGTCCCCTTC AACACAAGAA TCGCCATACG ATGCCAGTAT AACAGCAGCA TGCACCAAAT TATATGACGG
Clone4.Ubx_F AGTCCCCTTC AACACAAGAA TCGCCATACG ATGCCAGTAT AACAGCAGCA TGCACCAAAT TATATGACGG
Clone4.Ubx_R AGTCCCCTTC AACACAAGAA TCGCCATACG ATGCCAGTAT AACAGCAGCA TGCACCAAAT TATATGACGG
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      500      510      520      530      540      550      560
Ph_Ubx AGCTTACAAT AAAGATTGCT CGAAAACGGC TACAACCGGT GAAACAAATG GTTATAAGGA TGTATGGAAAT
Clone1.Ubx_F AGCTTACAAT AAAGATTGCT CGAAAACGGC TACAACCGGT GAAACAAATG GTTATAAGGA TGTATGGAAAT
Clone1.Ubx_R AGCTTACAAT AAAGATTGCT CGAAAACGGC TACAACCGGT GAAACAAATG GTTATAAGGA TGTATGGAAAT
Clone4.Ubx_F AGCTTACAAT AAAGATTGCT CGAAAACGGC TACAACCGGT GAAACAAATG GTTATAAGGA TGTATGGAAAT
Clone4.Ubx_R AGCTTACAAT AAAGATTGCT CGAAAACGGC TACAACCGGT GAAACAAATG GTTATAAGGA TGTATGGAAAT
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      570      580      590      600      610      620      630
Ph_Ubx ACATCGTCTA GTGGTAGCAC GGGTCAAAAT AGTTCGGTTC CGGTACGACC ATCAGCGTGT ACACCCGGACT
Clone1.Ubx_F ACATCGTCTA GTGGTAGCAC GGGTCAAAAT AGTTCGGTTC CGGTACGACC ATCAGCGTGT ACACCCGGACT
Clone1.Ubx_R ACATCGTCTA GTGGTAGCAC GGGTCAAAAT AGTTCGGTTC CGGTACGACC ATCAGCGTGT ACACCCGGACT
Clone4.Ubx_F ACATCGTCTA GTGGTAGCAC GGGTCAAAAT AGTTCGGTTC CGGTACGACC ATCAGCGTGT ACACCCGGACT
Clone4.Ubx_R ACATCGTCTA GTGGTAGCAC GGGTCAAAAT AGTTCGGTTC CGGTACGACC ATCAGCGTGT ACACCCGGACT
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      640      650      660      670      680      690      700
Ph_Ubx CTCGAGTTGG TTATTTGGAT GGAGCAGCTG CTAGTCCGGC TAGTCGAGGT GGTTCACCGA CTGGTGTTC
Clone1.Ubx_F CTCGAGTTGG TTATTTGGAT GGAGCAGCTG CTAGTCCGGC TAGTCGAGGT GGTTCACCGA CTGGTGTTC
Clone1.Ubx_R CTCGAGTTGG TTATTTGGAT GGAGCAGCTG CTAGTCCGGC TAGTCGAGGT GGTTCACCGA CTGGTGTTC
Clone4.Ubx_F CTCGAGTTGG TTATTTGGAT GGAGCAGCTG CTAGTCCGGC TAGTCGAGGT GGTTCACCGA CTGGTGTTC
Clone4.Ubx_R CTCGAGTTGG TTATTTGGAT GGAGCAGCTG CTAGTCCGGC TAGTCGAGGT GGTTCACCGA CTGGTGTTC
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      710      720      730      740      750      760      770
Ph_Ubx TGGCAGTGCA TGGAAATGCCT CACAATGTTC CATTACCGGA GCTAGTAGTC AAGGAGCAGC GGCAGGTCTA
Clone1.Ubx_F TGGCAGTGCA TGGAAATGCCT CACAATGTTC CATTACCGGA GCTAGTAGTC AAGGAGCAGC GGCAGGTCTA
Clone1.Ubx_R TGGCAGTGCA TGGAAATGCCT CACAATGTTC CATTACCGGA GCTAGTAGTC AAGGAGCAGC GGCAGGTCTA
Clone4.Ubx_F TGGCAGTGCA TGGAAATGCCT CACAATGTTC CATTACCGGA GCTAGTAGTC AAGGAGCAGC GGCAGGTCTA
Clone4.Ubx_R TGGCAGTGCA TGGAAATGCCT CACAATGTTC CATTACCGGA GCTAGTAGTC AAGGAGCAGC GGCAGGTCTA
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      780      790      800      810      820      830      840
Ph_Ubx CATCAAGCGA GTAATCATAC GTTTTACCCA TGGATGGCAA TAGCAGGTAA GAGATATCTT GAATCTCTTG
Clone1.Ubx_F CATCAAGCGA GTAATCATAC GTTTTACC-A TGGATGGCAA TAGCAGGT- - - - - - - -
Clone1.Ubx_R CATCAAGCGA GTAATCATAC GTTTTACC-A TGGATGGCAA TAGCAGGT- - - - - - - -
Clone4.Ubx_F CATCAAGCGA GTAATCATAC GTTTTACCCA TGGATGGCAA TAGCAGGTAA GAGATATCTT GAATCTCTTG
Clone4.Ubx_R CATCAAGCGA GTAATCATAC GTTTTACCCA TGGATGGCAA TAGCAGGTAA GAGATATCTT GAATCTCTTG
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      850      860      870      880      890      900      910
Ph_Ubx CGAGCTCTCT ACTTCCAGAT TGGATAGGTG CCAATGGGCT GCGGAGGCGA GGACGACAAA CATAACAAG
Clone1.Ubx_F - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Clone1.Ubx_R - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Clone4.Ubx_F CGAGCTCTCT ACTTCCAGAT TGGATAGGTG CCAATGGGCT GCGGAGGCGA GGACGACAAA CATAACAAG
Clone4.Ubx_R CGAGCTCTCT ACTTCCAGAT TGGATAGGTG CCAATGGGCT GCGGAGGCGA GGACGACAAA CATAACAAG
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      920      930      940      950      960      970      980
Ph_Ubx GTACCAAACA TTAGAACTAG AAAAAGAGTT CCACACAAAT CACTACCTAA CAAGACGACG CCGGATCGAA
Clone1.Ubx_F GTACCAAACA TTAGAACTAG AAAAAGAGTT CCACACAAAT CACTACCTAA CAAGACGACG CCGGATCGAA
Clone1.Ubx_R GTACCAAACA TTAGAACTAG AAAAAGAGTT CCACACAAAT CACTACCTAA CAAGACGACG CCGGATCGAA
Clone4.Ubx_F GTACCAAACA TTAGAACTAG AAAAAGAGTT CCACACAAAT CACTACCTAA CAAGACGACG CCGGATCGAA
Clone4.Ubx_R GTACCAAACA TTAGAACTAG AAAAAGAGTT CCACACAAAT CACTACCTAA CAAGACGACG CCGGATCGAA
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
Ph_Ubx ATGGCTCACG CACTATGTCT CACAGAACGG CAAATAAAAA TTTGGTTCCA GAATCGACGA ATGAAATTGA
Clone1.Ubx_F ATGGCTCACG CACTATGTCT CACAGAACGG CAAATAAAAA TTTGGTTCCA GAATCGACGA ATGAAATTGA
Clone1.Ubx_R ATGGCTCACG CACTATGTCT CACAGAACGG CAAATAAAAA TTTGGTTCCA GAATCGACGA ATGAAATTGA
Clone4.Ubx_F ATGGCTCACG CACTATGTCT CACAGAACGG CAAATAAAAA TTTGGTTCCA GAATCGACGA ATGAAATTGA
Clone4.Ubx_R ATGGCTCACG CACTATGTCT CACAGAACGG CAAATAAAAA TTTGGTTCCA GAATCGACGA ATGAAATTGA
      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
Ph_Ubx AAAAAGAAAT TCAAGCAATA AAAGAACTTA ACGAACAGGA GAAACAAGCC CAAGCCCA-- - - - - - - -
Clone1.Ubx_F AAAAAGAAAT TCAAGCAATA AAAGAACTTA ACGAACAGGA GAAACAAGCC CAAGCCCAAA TCCC----GC
Clone1.Ubx_R AAAAAGAAAT TCAAGCAATA AAAGAACTTA ACGAACAGGA GAAACAAGCC CAAGCCCAAA TCCC----GC
Clone4.Ubx_F AAAAAGAAAT TCAAGCAATA AAAGAACTTA ACGAACAGGA GAAACAAGCC CAAGCCCAAA TCCACTAGTGC
Clone4.Ubx_R AAAAAGAAAT TCAAGCAATA AAAGAACTTA ACGAACAGGA GAAACAAGCC CAAGCCCAAA TCCACTAGTGC

```

Figura 18: Resultado do sequenciamento do recombinante *Ubx.1*. Na linha Ph\_Ubx seqüência do inserto esperado (em azul). Nas linhas Clone.1.Ubx.F, Clone.1.Ubx.R,

Clone.4Ubx.F e Clone.4 Ubx.R resultados do sequenciamento dos recombinante *Ubx.1* e *Ubx.4* com os primers M13 ou M13 Reverso, respectivamente. Grifado em vermelho a região de 51 pb que não está contida no inserto do clone 1.Ubx. Em vermelho, sequência do vetor pGEM-T.

	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840
abd.11_inserto	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
Clone1.abdA.F	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
Clone1.abdA.R	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.1	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.2	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.3	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.4	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.5	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.6	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.7	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.8	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.9	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
abdA.10	ATGTATCAAA	TCATCCATCA	TCGCATAGTA	GTCTATCAGG	AATGCCTGGA	TTTTCTGGAC	TGGAGGACAA	ATCATGCAGG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
abd.11_inserto	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
Clone1.abdA.F	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
Clone1.abdA.R	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.1	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.2	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.3	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.4	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.5	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.6	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.7	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.8	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.9	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
abdA.10	TACACAGATA	GCGTAATGAA	TAGTTATCAA	TCCATGGGGG	TCCC GCCATC	TGCATCAAGT	TTTGACAAAT	TTTATCATCA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
abd.11_inserto	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
Clone1.abdA.F	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
Clone1.abdA.R	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.1	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.2	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.3	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.4	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.5	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.6	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.7	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.8	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.9	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
abdA.10	AGCAGCTGCT	GCATCAGCCG	TTTCAGCTGC	ATCGGCTGGT	GTGGTTGGAG	TCGATTTCATT	AGGAAATTGT	ACACAATCGT
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
abd.11_inserto	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
Clone1.abdA.F	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
Clone1.abdA.R	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.1	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.2	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.3	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.4	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.5	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.6	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.7	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.8	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.9	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA
abdA.10	CAACCGGAGT	TGTTTCAACT	GCCGGCTCGG	CTGGTGCTGG	ATTACCAGAC	TTGCCGAGAT	ATCCCTGGAT	GGCGTTAACA

Figura 19: Resultado do sequenciamento do recombinante *abdA.1*. Na linha *abdA.11\_inserto* está mostrada a sequência do inserto esperado. Nas linhas *Clone.1.abdA.F* e *Clone.1.abdA.R* sequências obtidas a partir do sequenciamento do recombinante com os primers M13 ou M13 Reverso, respectivamente. As sequências *abdA.1*, *abdA.2*, *abdA.3*, *abdA.4*, *abdA.5*, *abdA.6*, *abdA.7*, *abdA.8*, *abdA.9* e *abdA.10* correspondem às sequências das isoformas mapeadas de *abdA*. Em vermelho estão destacadas as sequências do Clone.1 *abdA* que diferem de todas as isoformas mapeadas.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      220      230      240      250      260      270      280
abdA.11_inserto -----ACAAATCAACATCG GAAGGTAGTC CGCTGACAAG TTCCGAAGGC AGCCCCACGT
Clone.2.abdA,F CATGGCCGCG GGATTACAAC ATCAACATCG GAAGGTAGTC CGCTGACAAG TTCCGAAGGC AGCCCCACGT
Clone.2.abdA.R CATGGCCGCG GGATTACAAC ATCAACATCG GAAGGTAGTC CGCTGACAAG TTCCGAAGGC AGCCCCACGT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      290      300      310      320      330      340      350
abdA.11_inserto CACCACCAAC TAGCAAAATG TATCCATATG TATCAAATCA TCCATCATCG CATAGTAGTC TATCAGGAAT
Clone.2.abdA,F CACCACCAAC TAGCAAAATG TATCCATATG TATCAAATCA TCCATCATCG CATAGTAGTC TATCAGGAAT
Clone.2.abdA.R CACCACCAAC TAGCAAAATG TATCCATATG TATCAAATCA TCCATCATCG CATAGTAGTC TATCAGGAAT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360      370      380      390      400      410      420
abdA.11_inserto GCCTGGATT TCTGGACTGG AGGACAAATC ATGCAGGTAC ACAGATAGCG TAATGAATAG TTATCAATCC
Clone.2.abdA,F GCCTGGATT TCTGGACTGG AGGACAAATC ATGCAGGTAC ACAGATAGCG TAATGAATAG TTATCAATCC
Clone.2.abdA.R GCCTGGATT TCTGGACTGG AGGACAAATC ATGCAGGTAC ACAGATAGCG TAATGAATAG TTATCAATCC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      430      440      450      460      470      480      490
abdA.11_inserto ATGGGGGTCC CGCCATCTGC ATCAAGTTTT GCACAATTTT ATCATCAAGC AGCTGCTGCA TCAGCCGTTT
Clone.2.abdA,F ATGGGGGTCC CGCCATCTGC ATCAAGTTTT GCACAATTTT ATCATCAAGC AGCTGCTGCA TCAGCCGTTT
Clone.2.abdA.R ATGGGGGTCC CGCCATCTGC ATCAAGTTTT GCACAATTTT ATCATCAAGC AGCTGCTGCA TCAGCCGTTT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      500      510      520      530      540      550      560
abdA.11_inserto CAGCTGCATC GGCTGGTGTG GTTGGAGTCG ATTCATTAGG AAATTGTACA CAATCGTCAA CCGGAGTTGT
Clone.2.abdA,F CAGCTGCATC GGCTGGTGTG GTTGGAGTCG ATTCATTAGG AAATTGTACA CAATCGTCAA CCGGAGTTGT
Clone.2.abdA.R CAGCTGCATC GGCTGGTGTG GTTGGAGTCG ATTCATTAGG AAATTGTACA CAATCGTCAA CCGGAGTTGT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      570      580      590      600      610      620      630
abdA.11_inserto TTCAACTGCC GGCTCGGCTG GTGCTGGATT ACCAGACTTG CCGAGATATC CCTGGATGGC GTTAACAGTT
Clone.2.abdA,F TTCAACTGCC GGCTCGGCTG GTGCTGGATT ACCAGACTTG CCGAGATATC CCTGGATGGC GTTAACAGTT
Clone.2.abdA.R TTCAACTGCC GGCTCGGCTG GTGCTGGATT ACCAGACTTG CCGAGATATC CCTGGATGGC GTTAACAGTT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      640      650      660      670      680      690      700
abdA.11_inserto GCAGACTGGA TGGGACCTTT CGATAGAGTT GTGTGTGGAG ATTTTAATGG TCCAAATGGT TGTCGGAGAA
Clone.2.abdA,F CAGACTGGA TGGGACCTTT CGATAGAGTT GTGTGTGGAG ATTTTAATGG TCCAAATGGT TGTCGGAGAA
Clone.2.abdA.R CAGACTGGA TGGGACCTTT CGATAGAGTT GTGTGTGGAG ATTTTAATGG TCCAAATGGT TGTCGGAGAA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      710      720      730      740      750      760      770
abdA.11_inserto GGCGAGGCAG ACAAACCTAC ACACGTTTTC AAACATTAGA ATTAGAAAAA GAATTTTCATT TCAATCATT
Clone.2.abdA,F GGCGAGGCAG ACAAACCTAC ACACGTTTTC AAACATTAGA ATTAGAAAAA GAATTTTCATT TCAATCATT
Clone.2.abdA.R GGCGAGGCAG ACAAACCTAC ACACGTTTTC AAACATTAGA ATTAGAAAAA GAATTTTCATT TCAATCATT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      780      790      800      810      820      830      840
abdA.11_inserto CTTAACCCGC CGACGAAGAA TAGAAATCGC CCACGCCTCT TGTTAACCGG AGAGGCAAAAT TAAAATTTGG
Clone.2.abdA,F CTTAACCCGC CGACGAAGAA TAGAAATCGC CCACGCCTCT TGTTAACCGG AGAGGCAAAAT TAAAATTTGG
Clone.2.abdA.R CTTAACCCGC CGACGAAGAA TAGAAATCGC CCACGCCTCT TGTTAACCGG AGAGGCAAAAT TAAAATTTGG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      850      860      870      880      890      900      910
abdA.11_inserto TTCCAAAATC GAAGGATGAA ATTGAAAAAG GAACCTAGAG CTGTTAA-GG AAATTAATGA ACAGGCTCGC
Clone.2.abdA,F TTCCAAAATC GAAGGATGAA ATTGAAAAAG GAACCTAGAG CTGTTAAAGG AAATTAATGA ACAGGCTCGC
Clone.2.abdA.R TTCCAAAATC GAAGGATGAA ATTGAAAAAG GAACCTAGAG CTGTTAA-GG AAATTAATGA ACAGGCTCGC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      920      930      940      950      960      970      980
abdA.11_inserto CGCGATCGAG AAGAACAAGA GAAAATGAAG GCCCAAGAAT CATTGAAGTC CGCCCAGCAC AATAACAAC
Clone.2.abdA,F CGCGATCGAG AAGAACAAGA GAAAATGAAG -CCCAAGAAT CATTGAAGTC CGCCCAGCAC AATAACAAC
Clone.2.abdA.R CGCGATCGAG AAGAACAAGA GAAAATGAAG GCCCAAGAAT CATTGAAGTC CGCCCAGCAC AATAACAAC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
abdA.11_inserto ATTCACATCA AGACCATCCG ATTGTGCCAC AAAACACCGG TGGTAATACA CATTTACATC ATGTAGTTCA
Clone.2.abdA,F ATTCACATCA -GACCATCCG ATTGTGCCAC AAA-CACCGG TGGTAATACA CATTTACATC ATGTAGTTCA
Clone.2.abdA.R ATTCACATCA AGACCATCCG ATTGTGCCAC AAAACACCGG TGGTAATACA CATTTACATC ATGTAGTTCA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
abdA.11_inserto AAATGACCTC AAAATGGGTC TAGCTG-----
Clone.2.abdA,F AAATGACCTC AAAATGGGTC TAGCTGA-TC ACTAGTGCG- -CGC-TGCAG -TCGAC-ATA TGGGAGAAGC
Clone.2.abdA.R AAATGACCTC AAAATGGGTC TAGCTGAATC ACTAGTGCGG CCGCCTGCAG GTCGACCATA TGGGAGAGTC

```

**Figura 20: Resultado do sequenciamento do recombinante *abdA.2*.** Na linha *abdA.11\_inserto* está mostrada a sequência do inserto esperado (em azul). Nas linhas *Clone.2.abdA.F* e *Clone.2.abdA.R* sequências obtidas a partir do sequenciamento do recombinante com os primers M13 ou M13 Reverso, respectivamente. Grifado em vermelho estão destacados 3 nucleotídeos que não estão presentes na sequência do inserto esperado. Em vermelho, sequência do vetor pGEM-T.

	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
abdA.11_inserto							-----ACAAC
abdA.9	GC	CC	AG	TA	AT	AA	CT
Clone3.abdA.F	CGTA	AT	GC	GC	CG	CAT	TG
Clone3.abdA.R	ACT	GG	GC	CG	CG	CAT	G
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
abdA.11_inserto	AT	GA	CG	TT	AG	CA	TA
abdA.9	AT	GA	CG	TT	AG	CA	TA
Clone3.abdA.F	AT	GA	CG	TT	AG	CA	TA
Clone3.abdA.R	AT	GA	CG	TT	AG	CA	TA
	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
abdA.11_inserto	TA	TA	TC	CA	TA	GC	TA
abdA.9	TA	TA	TC	CA	TA	GC	TA
Clone3.abdA.F	TA	TA	TC	CA	TA	GC	TA
Clone3.abdA.R	TA	TA	TC	CA	TA	GC	TA
	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890
abdA.11_inserto	AG	AT	AC	TA	TT	AT	CG
abdA.9	AG	AT	AC	TA	TT	AT	CG
Clone3.abdA.F	AG	AT	AC	TA	TT	AT	CG
Clone3.abdA.R	AG	AT	AC	TA	TT	AT	CG
	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960
abdA.11_inserto	AT	GC	AT	AG	TC	CA	GC
abdA.9	AT	GC	AT	AG	TC	CA	GC
Clone3.abdA.F	AT	GC	AT	AG	TC	CA	GC
Clone3.abdA.R	AT	GC	AT	AG	TC	CA	GC
	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030
abdA.11_inserto	GT	AT	AA	CA	CG	TT	TC
abdA.9	GT	AT	AA	CA	CG	TT	TC
Clone3.abdA.F	GT	AT	AA	CA	CG	TT	TC
Clone3.abdA.R	GT	AT	AA	CA	CG	TT	TC
	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
abdA.11_inserto	GT	AC	CG	CT	GT	GC	TT
abdA.9	GT	AC	CG	CT	GT	GC	TT
Clone3.abdA.F	GT	AC	CG	CT	GT	GC	TT
Clone3.abdA.R	GT	AC	CG	CT	GT	GC	TT
	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170
abdA.11_inserto	CG	GT	AT	TC	CG	GC	CA
abdA.9	CG	GT	AT	TC	CG	GC	CA
Clone3.abdA.F	CG	GT	AT	TC	CG	GC	CA
Clone3.abdA.R	CG	GT	AT	TC	CG	GC	CA
	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240
abdA.11_inserto	AC	AA	AT	GA	GA	AT	TC
abdA.9	AC	AA	AT	GA	GA	AT	TC
Clone3.abdA.F	AC	AA	AT	GA	GA	AT	TC
Clone3.abdA.R	AC	AA	AT	GA	GA	AT	TC
	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310
abdA.11_inserto	TG	CC	CG	TG	TA	AA	AT
abdA.9	TG	CC	CG	TG	TA	AA	AT
Clone3.abdA.F	TG	CC	CG	TG	TA	AA	AT
Clone3.abdA.R	TG	CC	CG	TG	TA	AA	AT
	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380
abdA.11_inserto	AT	GA	CT	AA	AT	GA	CA
abdA.9	AT	GA	CT	AA	AT	GA	CA
Clone3.abdA.F	AT	GA	CT	AA	AT	GA	CA
Clone3.abdA.R	AT	GA	CT	AA	AT	GA	CA
	2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450
abdA.11_inserto	AA	CC	AA	G	CC	CA	TC
abdA.9	AA	CC	AA	G	CC	CA	TC
Clone3.abdA.F	AA	CC	AA	G	CC	CA	TC
Clone3.abdA.R	AA	CC	AA	G	CC	CA	TC
	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520
abdA.11_inserto	TT	AA	GC	AT	TG	TA	TC
abdA.9	TT	AA	GC	AT	TG	TA	TC
Clone3.abdA.F	TT	AA	GC	AT	TG	TA	TC
Clone3.abdA.R	TT	AA	GC	AT	TG	TA	TC
	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590
abdA.11_inserto	AG	CT	GC	TA	TT	TA	TC
abdA.9	AG	CT	GC	TA	TT	TA	TC
Clone3.abdA.F	AG	CT	GC	TA	TT	TA	TC
Clone3.abdA.R	AG	CT	GC	TA	TT	TA	TC

**Figura 21: Resultado do sequenciamento do recombinante *abdA.3*.** Na linha *abdA.11\_inserto* está mostrada a sequência do inserto esperado (em azul). Na linha *abdA.9*



sequência parcial do transcrito da isoforma *abdA.9*. Nas linhas Clone.3.*abdA.F* e Clone.3.*abdA.R* sequências obtidas a partir do sequenciamento do recombinante com os primers M13 ou M13 Reverso, respectivamente. Em vermelho está destacada a ausência de 5 nucleotídeos, característico da isoforma *abdA.9*. Em vermelho, sequência do vetor pGEM-T.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      290      300      310      320      330      340      350
AbdB_inserto ----- CCCACCCAGC
Clone2.AbdB.F --CCTAT-GG GCGA-TTGGG CCCGACGTCG CATGCTCCCG GCCGCCATGG CCGCGGGATT CCCACCCAGC
Clone2.AbdB.R TCACTATAGG GCGAATTGGG CCCGACGTCG CATGCTCCCG GCCGCCATGG CCGCGGGATT CCCACCCAGC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360      370      380      390      400      410      420
AbdB_inserto ATTCAGCATC AAACACAATC AGCTAACGGT CATATTGTGC CACAGCAACA ACAGCAGCAA AGTAATTCAT
Clone2.AbdB.F ATTCAGCATC AAACACAATC AGCTAACGGT CATATTGTGC CACAGCAACA ACAGCAGCAA AGTAATTCAT
Clone2.AbdB.R ATTCAGCATC AAACACAATC AGCTAACGGT CATATTGTGC CACAGCAACA ACAGCAGCAA AGTAATTCAT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      430      440      450      460      470      480      490
AbdB_inserto CAATTGTTCA ACAACAAGGC ACAGTGGCGA CTGGTCAAAC ACAAAATCGTG GCGCCGTCGA CGGCAGGTGA
Clone2.AbdB.F CAATTGTTCA ACAACAAGGC ACAGTGGCGA CTGGTCAAAC ACAAAATCGTG GCGCCGTCGA CGGCAGGTGA
Clone2.AbdB.R CAATTGTTCA ACAACAAGGC ACAGTGGCGA CTGGTCAAAC ACAAAATCGTG GCGCCGTCGA CGGCAGGTGA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      500      510      520      530      540      550      560
AbdB_inserto ATCACCAGCG AGTGTAGCT CGCAGCCGGC AGGACCACTT CATATACCAG CCAAACGTCC CGGTTTCGAA
Clone2.AbdB.F ATCACCAGCG AGTGTAGCT CGCAGCCGGC AGGACCACTT CATATACCAG CCAAACGTCC CGGTTTCGAA
Clone2.AbdB.R ATCACCAGCG AGTGTAGCT CGCAGCCGGC AGGACCACTT CATATACCAG CCAAACGTCC CGGTTTCGAA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      570      580      590      600      610      620      630
AbdB_inserto ACGGATCCGA CCGTTATAAG GCATCCCCAT CCATGGGGAT CATAACGAGC GGGCTTCGAC TCGCAGTATC
Clone2.AbdB.F ACGGATCCGA CCGTTATAAG GCATCCCCAT CCATGGGGAT CATAACGAGC GGGCTTCGAC TCGCAGTATC
Clone2.AbdB.R ACGGATCCGA CCGTTATAAG GCATCCCCAT CCATGGGGAT CATAACGAGC GGGCTTCGAC TCGCAGTATC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      640      650      660      670      680      690      700
AbdB_inserto ATACTCATT TCAATATTAT TTAGAACGAG AACGAAAACC AGTATATTAT GGTATCCGG ATGGTGCACA
Clone2.AbdB.F ATACTCATT TCAATATTAT TTAGAACGAG AACGAAAACC AGTATATTAT GGTATCCGG ATGGTGCACA
Clone2.AbdB.R ATACTCATT TCAATATTAT TTAGAACGAG AACGAAAACC AGTATATTAT GGTATCCGG ATGGTGCACA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      710      720      730      740      750      760      770
AbdB_inserto ATTTCCACAG CCTACTGGA ACTACCGTGA TCAACCATCA TATTTAACAG ATGAACGTCA CACAGCTCGT
Clone2.AbdB.F ATTTCCACAG CCTACTGGA ACTACCGTGA TCAACCATCA TATTTAACAG ATGAACGTCA CACAGCTCGT
Clone2.AbdB.R ATTTCCACAG CCTACTGGA ACTACCGTGA TCAACCATCA TATTTAACAG ATGAACGTCA CACAGCTCGT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      780      790      800      810      820      830      840
AbdB_inserto CAATCTGTTG AAGGTGGATC TCAGTCAAGT TATGAGACTG GGTACACAGC AGGCCGATTG AGGTATATG
Clone2.AbdB.F CAATCTGTTG AAGGTGGATC TCAGTCAAGT TATGAGACTG GGTACACAGC AGGCCGATTG AGGTATATG
Clone2.AbdB.R CAATCTGTTG AAGGTGGATC TCAGTCAAGT TATGAGACTG GGTACACAGC AGGCCGATTG AGGTATATG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      850      860      870      880      890      900      910
AbdB_inserto CAGCCGATTA CACTGCTGCA TCATCTTTAT CAGTGGGAGT TGGTGTCTGTC GGGTCATGCA CACCGTCAAA
Clone2.AbdB.F CAGCCGATTA CACTGCTGCA TCATCTTTAT CAGTGGGAGT TGGTGTCTGTC GGGTCATGCA CACCGTCAAA
Clone2.AbdB.R CAGCCGATTA CACTGCTGCA TCATCTTTAT CAGTGGGAGT TGGTGTCTGTC GGGTCATGCA CACCGTCAAA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      920      930      940      950      960      970      980
AbdB_inserto TCCACTGGAA TGGACCGGTC AAGTFACTGT TCGAAAAAAA CGTAAACCAT ATTCGAAATT CCAGACCCGT
Clone2.AbdB.F TCCACTGGAA TGGACCGGTC AAGTFACTGT TCGAAAAAAA CGTAAACCAT ATTCGAAATT CCAGACCCGT
Clone2.AbdB.R TCCACTGGAA TGGACCGGTC AAGTFACTGT TCGAAAAAAA CGTAAACCAT ATTCGAAATT CCAGACCCGT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
AbdB_inserto GAATTAGAAA AGGAGTTTCT TTTTAATGCT TACGTATCAA AACAAAAACG ATGGGAGCTG GCTAGGGCTT
Clone2.AbdB.F GAATTAGAAA AGGAGTTTCT TTTTAATGCT TACGTATCAA AACAAAAACG ATGGGAGCTG GCTAGGGCTT
Clone2.AbdB.R GAATTAGAAA AGGAGTTTCT TTTTAATGCT TACGTATCAA AACAAAAACG ATGGGAGCTG GCTAGGGCTT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
AbdB_inserto TGAACT-----
Clone2.AbdB.F TGAACTAATC ACTAGTGGCG CCGCTGCAG GTCGACCATA TGGGAGAGCT CCCAACGCGT TGGATGCATA
Clone2.AbdB.R TGAACTAATC ACTAGTGGCG CCGCTGCAG GTCGACCATA TGGGAGAGCT CCCAACGCGT TGGATGCATA

```

**Figura 22: Resultado do sequenciamento do recombinante *AbdB.2*.** Na linha *abdB\_inserto* está mostrada a sequência do inserto esperado (em azul). Nas linhas Clone.2.AbdB.F e Clone.2.AbdB.R sequências obtidas a partir do sequenciamento do recombinante com os primers M13 ou M13 Reverso, respectivamente. Em vermelho, sequência do vetor pGEM-T.

### **4.3 Padrão de expressão dos genes *Hox* durante o desenvolvimento embrionário de *Pseudolycoriella hygida***

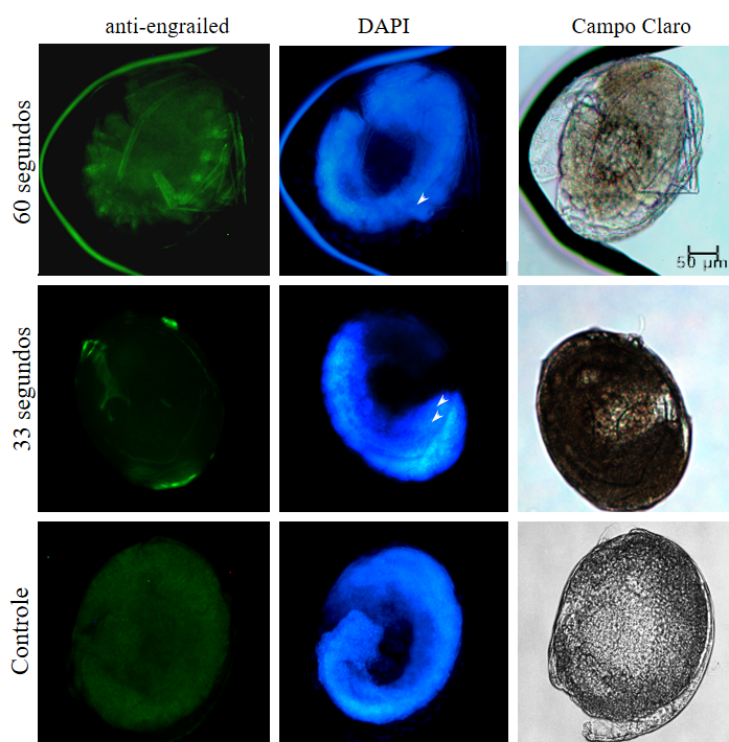
Diferentemente de *Drosophila melanogaster*, organismo para o qual existe um grande número de protocolos disponíveis, o avanço do conhecimento em um modelo não convencional como *Ps. hygida*, um díptero basal da infraordem Bibionomorpha, depende em grande parte do desenvolvimento de ferramentas e padronização de protocolos. Para estudar o padrão de expressão dos genes *Hox* durante o desenvolvimento embrionário de *Ps. hygida*, investimos parte dos nossos esforços para o estabelecimento tanto de um protocolo de hibridação *in situ*, como de um protocolo de imunolocalização de proteínas em embriões de *Ps. hygida*.

#### **4.3.1 Padronização de experimentos de Imunolocalização de proteínas em *Ps. hygida***

O desenvolvimento embrionário de *Ps. hygida* dura 9 dias e dados anteriores do nosso grupo mostraram que durante o desenvolvimento embrionário ocorre a secreção da cutícula serosal que apresenta como um dos principais componentes a quitina, a qual torna os embriões impermeáveis a diferentes moléculas, incluindo anticorpos (ULIANA *et al.*, 2018). Dados preliminares mostraram que o protocolo químico-enzimático originalmente estabelecido para o estudo de embriões de *Ps. hygida* resultava em embriões permeáveis a DAPI, mas impermeáveis a anticorpos (ULIANA, *et al.* 2018). Dentre os vários métodos descritos que aumentam a permeabilidade de embriões de insetos, optamos por testar um protocolo anteriormente utilizado para realização de experimentos de imunolocalização em larvas de *D. melanogaster* (PATEL, 1994).

Embriões coletados e fixados conforme o protocolo químico-enzimático (ULIANA *et al.*, 2018) foram submetidos a diferentes tempos de sonicação, seguido de protocolo para detecção da proteína engrailed. O anticorpo anti-engrailed foi escolhido pois a proteína engrailed atua na cascata de segmentação, o padrão de expressão é de fácil detecção e esse mesmo anticorpo já foi utilizado com sucesso em outro sciarídeo, *R. americana* (VANARIO-ALONSO *et al.*, 1996). Embriões sonicados por 33 segundos apresentaram fraca marcação para o anticorpo comercial anti-engrailed

(Mab4D9) de *D. melanogaster*, enquanto que embriões sonicados por 60 segundos apresentaram marcação robusta e preservaram a morfologia do embrião (figura 23). O padrão de expressão de engrailed em embriões de *Psil. hygida* é similar ao de *D. melanogaster*, apresentando um padrão de expressão na porção posterior de cada segmento. Esses resultados indicaram que a sonicação aumenta a permeabilidade dos embriões de *Psil. hygida*, possivelmente pela ruptura mecânica da cutícula serosal e que o tempo ótimo de sonicação encontra-se no intervalo entre 33 e 60 segundos. Tanto os experimentos de hibridação *in situ* quanto imunolocalização, dependem do emprego de anticorpos, seja para detectar a formação dos híbridos RNA:RNA ou as proteínas de interesse. Portanto, para a realização de experimentos de imunolocalização de proteínas e experimentos de hibridação *in situ* em embriões de *Psil. hygida*, o tempo de 60 segundos de sonicação foi empregado.



**Figura 23: Padrão de expressão da proteína engrailed em embriões de *Psil. hygida*.** Coleções de embriões de 6 a 7 dias foram sonicadas durante 33 ou 60 segundos e submetidas ao protocolo de imunolocalização. Anticorpo primário monoclonal anti-engrailed (1:7), anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com Alexa 388 (1:500). A coluna anti-engrailed mostra o padrão de expressão de engrailed (faixas no sentido anteroposterior dos embriões), a coluna DAPI mostra o resultado da marcação com DAPI e a coluna campo claro mostra a morfologia dos embriões em campo claro. Na linha controle os embriões foram submetidos ao protocolo de imunolocalização na ausência do anticorpo primário (anti-engrailed). Note que é possível observar que os embriões apresentam autofluorescência. Os resultados foram documentados em microscópio de fluorescência (Leica DM5000B / câmera DFC500 / software Las 3.8).

#### 4.3.2 Padrão de expressão de Antennapedia, Ultrabithorax/abdominal-A e Abdominal-B

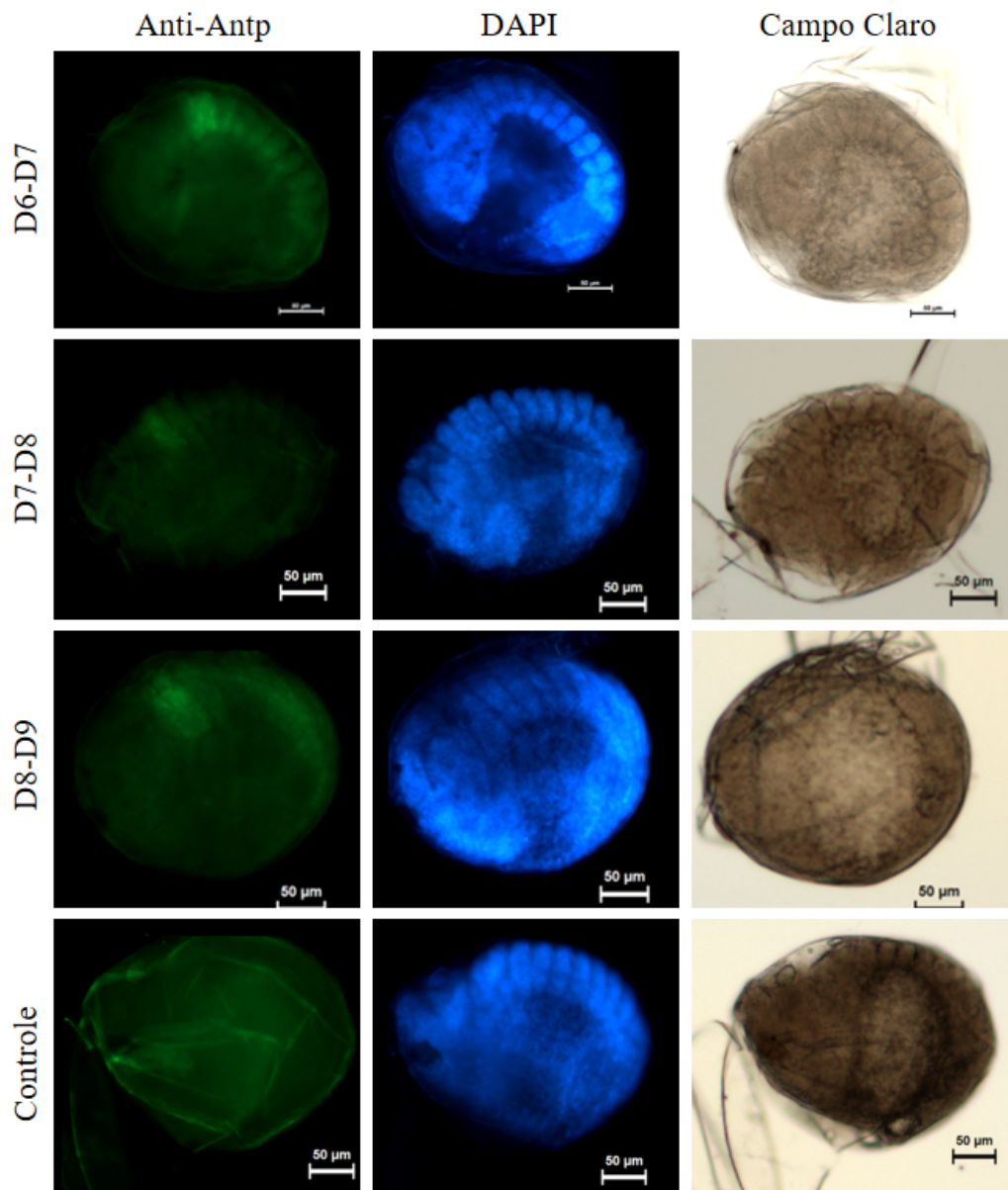
Experimentos de imunolocalização de proteínas *Hox* em embriões de *Psil. hygida* foram realizados com a finalidade de analisar o padrão de expressão de Antennapedia, Ultrabithorax, abdominal-A e Abdominal-B. Para tanto, anticorpos comerciais obtidos contra proteínas de *D. melanogaster* foram utilizados. Especificamente, utilizamos os seguintes anticorpos: anti-antennapedia (4C3), anti-Ubx/abdA (FP6.87), e anti-AbdB (1A2E9).

A expressão da proteína Antennapedia pode ser observada principalmente a partir do sexto dia e se mantém até o nono dia do desenvolvimento e apresenta um padrão de marcação desde a metade do primeiro segmento torácico e mais fracamente, até o final da região caudal do embrião de *Psil. hygida* (figura 24). O anticorpo anti-Ubx/abdA é capaz de reconhecer ambas as proteínas Ubx e abdA. As proteínas Ultrabithorax e abdominal-A apresentam um padrão de expressão inicialmente observado em embriões com idade entre 5 e 6 dias que se mantém até o nono dia do desenvolvimento. A marcação observada compreende a região entre a metade posterior do segundo segmento torácico até o quinto segmento abdominal do embrião (figura 25). A análise mais detalhada, realizada através da comparação dos padrões de expressão em embriões com idades semelhantes, confirma que a expressão da proteína Antennapedia é detectada a partir da metade posterior do primeiro segmento torácico em embriões de *Psil. hygida*, enquanto que a expressão de Ubx/abdA é observada a partir da metade do segundo segmento torácico de embriões de *Psil. hygida* (figura 26). Em conjunto nossos dados sugerem que o padrão de expressão das proteínas Antennapedia, Ultrabithorax e Abdominal A estão conservados em *Psil. hygida*.

Os resultados derivados dos experimentos de imunolocalização em embriões de *Psil. hygida* são parcialmente suportados por resultados preliminares de *western blot* contendo extratos proteicos de embriões de 0 a 3 dias, 4 a 6 dias e 7 a 9 dias. Como pode ser observado, diferentes isoformas de Antp e Ubx/abdA foram detectadas em extratos proteicos de embriões de 7 a 9 dias (figura 27). No caso da proteína Antp detectamos pelo menos duas isoformas proteicas, em extratos de 7 a 9 dias, cujos pesos moleculares

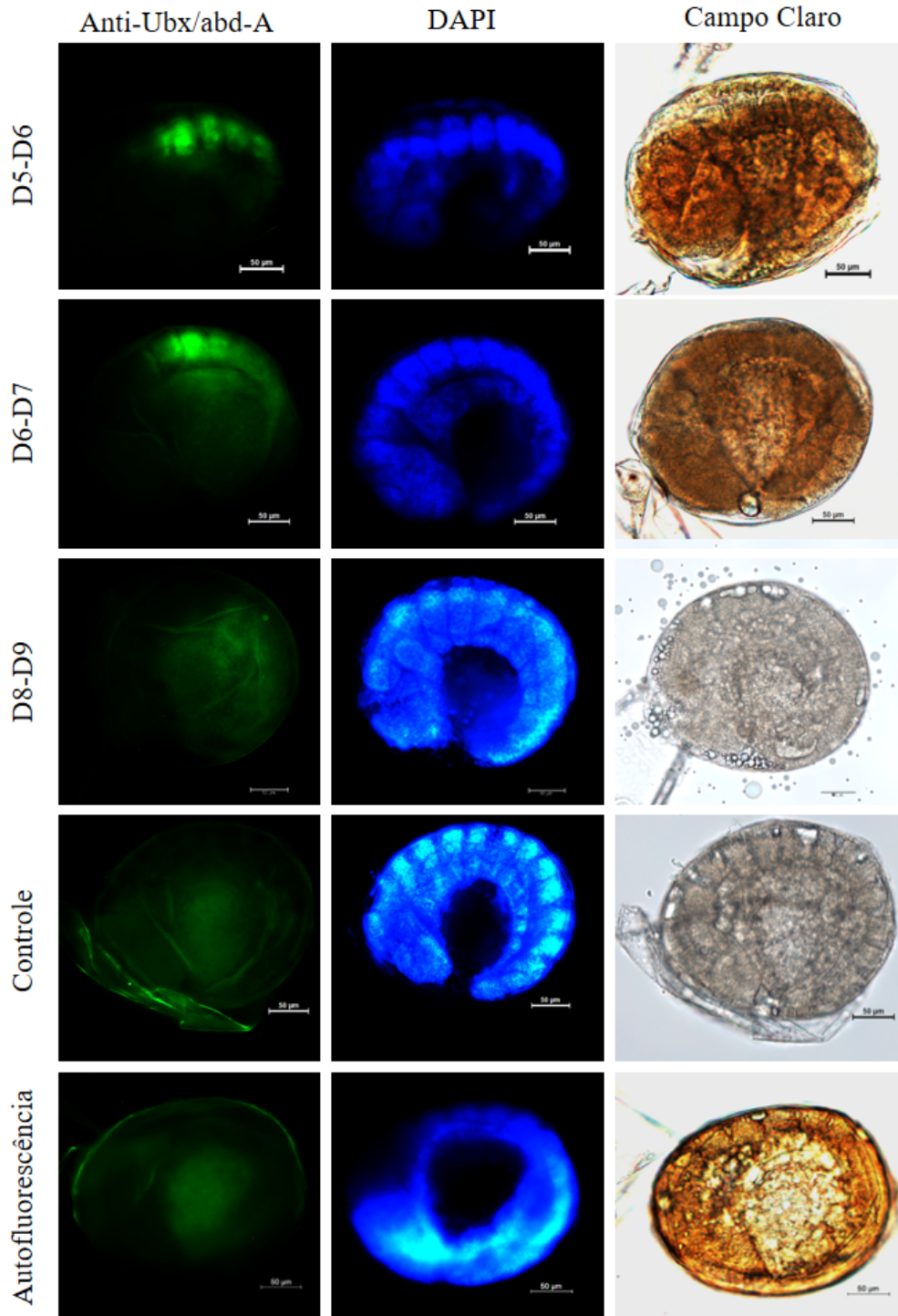
encontra-se na faixa de 40–50 kDa, enquanto que as isoformas preditas apresentam peso molecular em torno de 34 kDa (tabela 5). Quando um *blot* idêntico foi incubado com o anticorpo anti-UBx/abdA detectamos várias bandas com tamanho dentro do esperado, entre 30 – 40 kDa, que provavelmente correspondem a diferentes isoformas de Ubx e abdA cujo peso molecular predito varia entre 32 kDa (Ubx) e 42 kDa (abdA.1 e abdA.3). Em conjunto, os resultados de *western blots* sugerem que os maiores níveis de expressão das isoformas detectadas pelos anticorpos utilizados ocorrem em embriões tardios, entre o sétimo e o nono dia do desenvolvimento.

Acerca o padrão de expressão de AbdB, não foi possível detectar expressão de AbdB em embriões de *Psil. hygida* empregando o anticorpo comercial disponível contra a proteína AbdB de *D. melanogaster*. Entretanto, experimentos de imunolocalização de AbdB em *Drosophila melanogaster*, revelaram que o anticorpo anti-AbdB utilizado apresentava boa qualidade e era capaz de reconhecer a proteína AbdB de *D. melanogaster* (figura 28). A não detecção de AbdB em embriões de *Psil. hygida* pode ser explicada pela baixa similaridade entre a proteína AbdB de *D. melanogaster* e o ortólogo em *Psil. hygida*. De fato, o polipeptídeo utilizado para obtenção do anticorpo comercial contra AbdB de *D. melanogaster* apresenta apenas 34 % de identidade com AbdB de *Psil. hygida* (Figura 29).

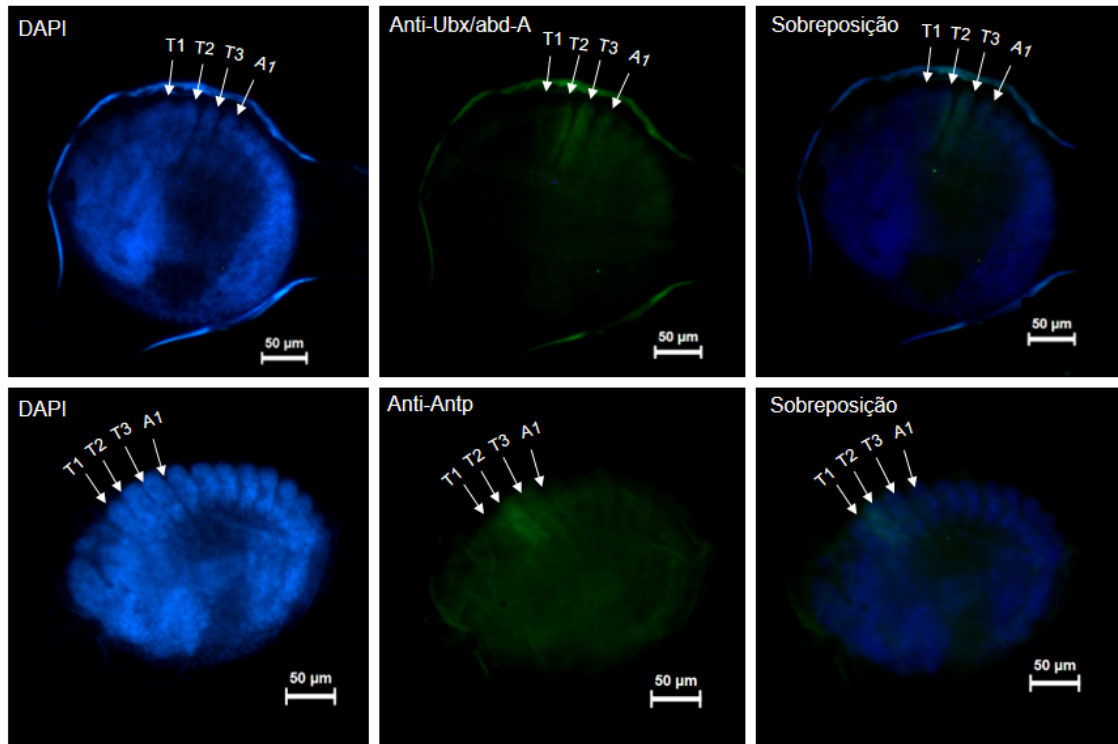


**Figura 24: Padrão de expressão da proteína Antennapedia em embriões de *Psl. hygida*.** Coleções de embriões de 6 a 9 dias foram sonicadas por 60 segundos e submetidas ao protocolo de imunolocalização. Anticorpo primário monoclonal anti-antennapedia (1:10), anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com Alexa 388 (1:500). A coluna anti-antp mostra o padrão de expressão de Antennapedia (faixas no sentido anteroposterior dos embriões), a coluna DAPI mostra o resultado da marcação com DAPI e a coluna campo claro mostra a morfologia dos embriões em campo claro. Na linha controle os embriões foram submetidos ao protocolo de imunolocalização na ausência do anticorpo primário (anti-Antp). Note que é possível observar que os embriões apresentam autofluorescência. Os resultados foram documentados em microscópio de fluorescência (Leica DM5000B / câmera DFC500 / software Las 3.8).

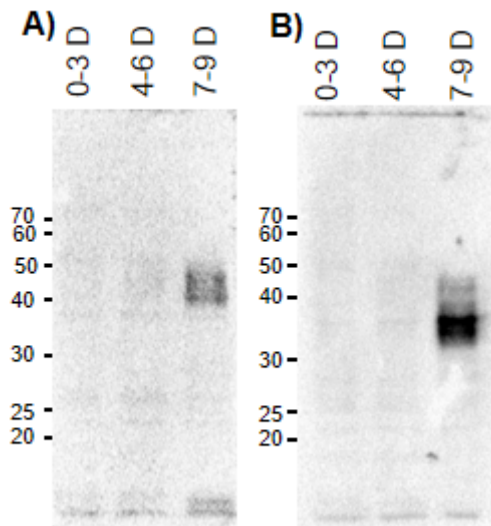




**Figura 25: Padrão de expressão da proteína Ultrabithorax e abdominal-A em embriões de *Psil. hygida*.** Coleções de embriões de 5 a 9 dias foram sonicadas por 60 segundos e submetidas ao protocolo de imunolocalização. Anticorpo primário monoclonal anti-Ubx/abdA (1:5), anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com Alexa 388 (1:500). A coluna anti-Ubx/abdA mostra o padrão de expressão de Ubx/abdA (faixas no sentido anteroposterior dos embriões), a coluna DAPI mostra o resultado da marcação com DAPI e a coluna campo claro mostra a morfologia dos embriões em campo claro. Na linha controle, os embriões foram submetidos ao protocolo de imunolocalização na ausência do anticorpo primário (anti-Ubx/abdA), na linha autofluorescência embriões foram submetidos ao protocolo de imunolocalização na ausência de anticorpo primário e secundário, podendo ser observada a autofluorescência dos embriões de *Psil. hygida*. Os resultados foram documentados em microscópio de fluorescência (Leica DM5000B / câmera DFC500 / software Las 3.8).

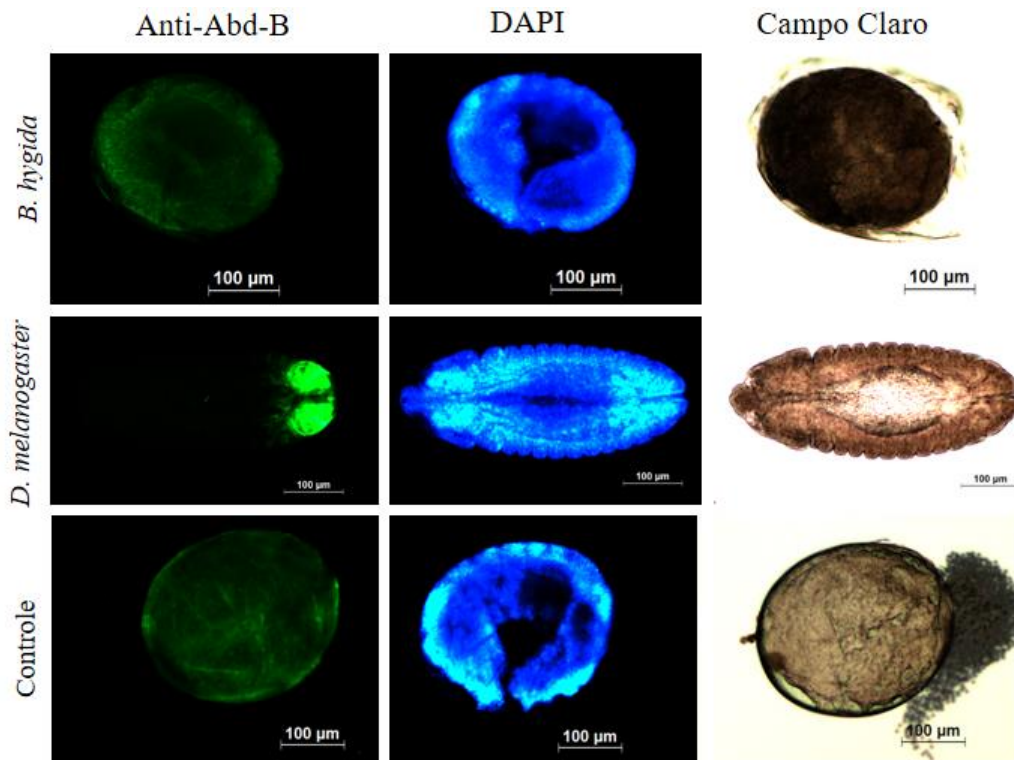


**Figura 26: Comparação entre o padrão de expressão de Antennapedia e Ultrabithorax-abdominal-A em embriões de *Psl. hygida*.** A figura mostra a comparação do padrão de expressão das proteínas Antp e Ubx/abdA em embriões com idade entre 7-8 dias. A coluna DAPI mostra embriões corados com DAPI, “Anti-Ubx/abdA” mostra embrião marcado com anti-Ubx/abdA e “Anti-antp” mostra embrião marcado com anti-antp. “Sobreposição” mostra a sobreposição entre a marcação com DAPI e Anti-Ubx/abdA ou Anti-antp. As setas apontam para os três segmentos torácicos (T1, T2 e T3) e para o primeiro segmento abdominal (A1).



**Figura 27: Detecção de proteínas Hox em extratos de proteína total de embriões de *Pseudolycorella hygida*.** Nas raías “0-3 D”, “4-6 D” e “6-9 D” foram aplicados 6 μg de extratos de proteína total de embriões com 0 a 3 dias, 4 a 6 dias e 7 a 9 dias de desenvolvimento. A) Blot incubado com anti-Antp, seguido de detecção com Anti-rabbit-HRP e revelado com solução de luminol: peroxidase. B) Blot incubado com Ubx/abdA seguido de detecção com Anti-rabbit-HRP e revelado com solução de luminol: peroxidase. Os números à esquerda das figuras indicam a posição dos polipeptídeos do marcador de peso moléculas em kDa.





**Figura 28: Experimento de imunolocalização de AbdB em embriões de *Pseudolycorielliella hygida* e *Drosophila melanogaster*.** Coleções de embriões *PsI. hygida* de 6 a 7 dias foram sonicadas por 60 segundos e submetidas ao protocolo de imunolocalização. Coleções de embriões de *D. melanogaster* de 0 a 24 horas foram submetidas ao protocolo de imunolocalização. Anticorpo primário monoclonal anti-AbdB (1:50), anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com Alexa 388 (1:500). Os resultados foram documentados em microscópio de fluorescência (Leica DM5000B / câmera DFC500 / software Las 3.8).

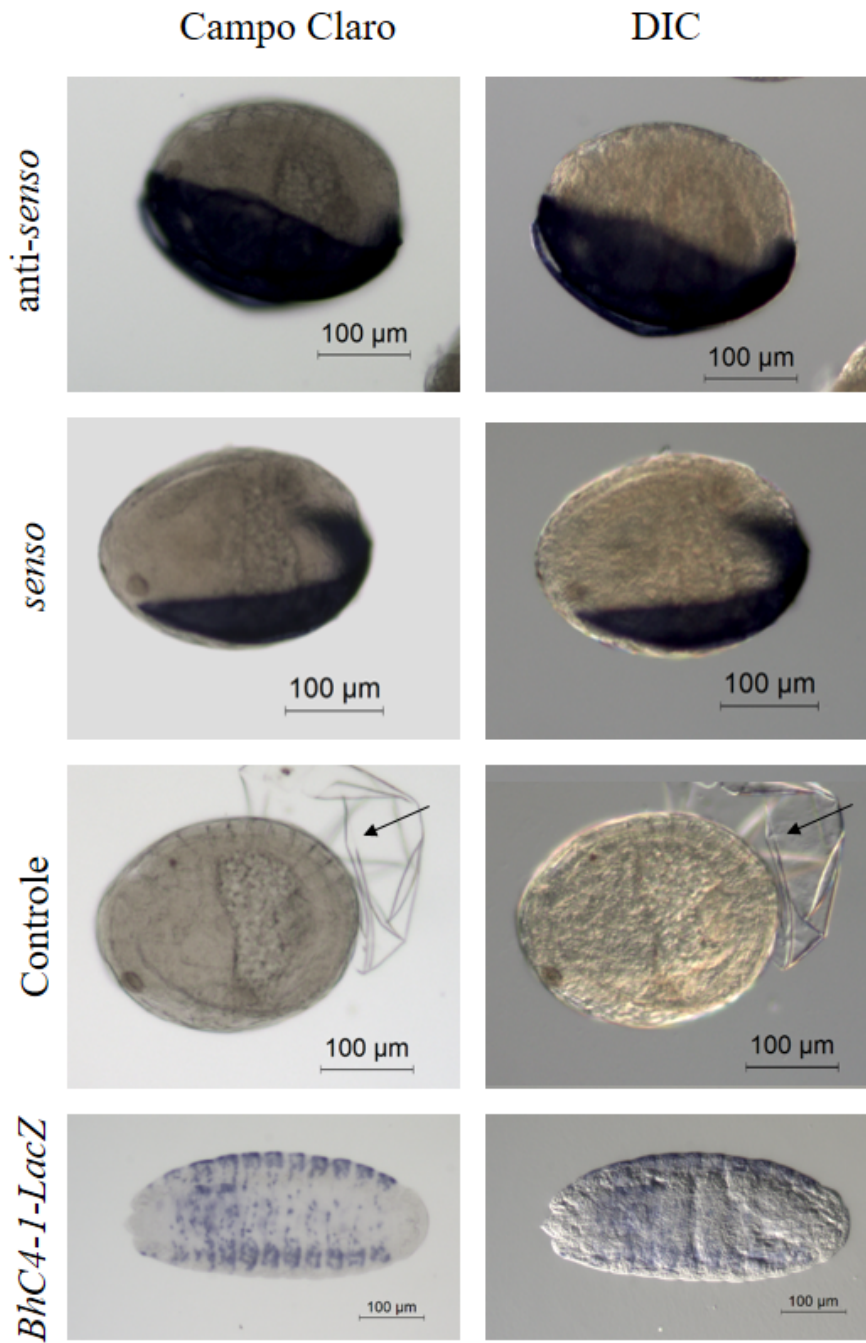
AbdB_1A2E9	-----GYYDR--KHMFAYPYPETQFPVVG	21
Dm_AbdB	IRAGPGFETDTSAAVKRHTAHWAYNDEGFNQHYGS--GYYDR--KHMFAYPYPETQFPVVG	68
Ph_AbdB.1	KR--PGFETDP--TVIRHPPHWPWGSYEAGFDSQYHTHSQYYLERERKPVVYGYPDGAQFPQ	176
Ph_AbdB.2	KR--PGFETDP--TVIRHPPHWPWGSYEAGFDSQYHTHSQYYLERERKPVVYGYPDGAQFPQ	137
Ph_AbdB.3	KR--PGFETDP--TVIRHPPHWPWGSYEAGFDSQYHTHSQYYLERERKPVVYGYPDGAQFPQ	137
Ph_AbdB.4	KR--PGFETDP--TVIRHPPHWPWGSYEAGFDSQYHTHSQYYLERERKPVVYGYPDGAQFPQ	176
Ph_AbdB.5	KR--PGFETDP--TVIRHPPHWPWGSYEAGFDSQYHTHSQYYLERERKPVVYGYPDGAQFPQ	137
	** * **	
AbdB_1A2E9	QYWGNPYRFDQTTSAAAAAAYMDEADGHVSAARQSVEGTSTSSYEPPTYSSPGGLRGYP	81
Dm_AbdB	QYWGNPYRFDQTTSAAAAAAYMNEAERHVSAAARQSVEGTSTSSYEPPTYSSPGGLRGYP	128
Ph_AbdB.1	PYWNYRDQPSYLTD-----ERHTARQSVEGGSQSSYETG--YTAGGLRSYA	220
Ph_AbdB.2	PYWNYRDQPSYLTD-----ERHTARQSVEGGSQSSYETG--YTAGGLRSYA	181
Ph_AbdB.3	PYWNYRDQPSYLTD-----ERHTARQSVEGGSQSSYETG--YTAGGLRSYA	181
Ph_AbdB.4	PYWNYRDQPSYLTD-----ERHTARQSVEGGSQSSYETG--YTAGGLRSYA	220
Ph_AbdB.5	PYWNYRDQPSYLTD-----ERHTARQSVEGGSQSSYETG--YTAGGLRSYA	181
	** * * ***** * ** * ***** *	
AbdB_1A2E9	SQNYSSSGASGGLSVGAVG-CTPNP-----	105
Dm_AbdB	SENYSSSGASGGLSVGAVGPNPLHEWTGQVSVRKKRKPYSKFQTTLELEKEFLFNAY	188
Ph_AbdB.1	ADYTAAS--SLSVGAVGSCPTPNP-LEWTGQVTVRKKRKPYSKFQTTLELEKEFLFNAY	277
Ph_AbdB.2	ADYTAAS--SLSVGAVGSCPTPNP-LEWTGQVTVRKKRKPYSKFQTTLELEKEFLFNAY	238
Ph_AbdB.3	ADYTAAS--SLSVGAVGSCPTPNP-LEWTGQVTVRKKRKPYSKFQTTLELEKEFLFNAY	238
Ph_AbdB.4	ADYTAAS--SLSVGAVGSCPTPNP-LEWTGQVTVRKKRKPYSKFQTTLELEKEFLFNAY	277
Ph_AbdB.5	ADYTAAS--SLSVGAVGSCPTPNP-LEWTGQVTVRKKRKPYSKFQTTLELEKEFLFNAY	238
	* * ***** **	

**Figura 29: Alinhamento entre AbdB de *Pseudolycorielliella hygida* e o polipeptídeo imunogênico utilizado para obtenção do anticorpo anti-AbdB de *D. melanogaster*.** 1A2E9 constitui a sequência polipeptídica utilizada para obtenção do anticorpo anti-AbdB 1A2E9 (Celniker *et al.*, 1989). A sequência Dm\_AbdB constitui a sequência de AbdB isoforma A de *D. melanogaster* (NP\_650577.1). Ph\_AbdB.1, Ph\_AbdB.2, Ph\_AbdB.3, Ph\_AbdB.4 e Ph\_AbdB.5 correspondem às 5 isoformas de AbdB anotadas em *PsI. hygida*. Em amarelo estão destacados os aminoácidos conservados. Alinhamento realizado utilizando o software Clustal Ômega (Madeira *et al.*, 2019).

### 4.3.3 Experimentos de hibridação *in situ* em embriões de *Pseudolycoriella hygida*

Como ponto de partida para a realização de experimentos de hibridação *in situ*, tanto os clones dos genes *Hox* obtidos a partir do DNA genômico embrionário, como clones obtidos a partir de cDNA embrionário foram utilizados para a síntese de sondas senso e anti-senso complementares aos genes *labial*, *Ultrabithorax*, *abdominal-A* e *Abdominal-B*. O protocolo amplamente utilizado em *Drosophila melanogaster* de Tautz e Pfeifle, 1989 foi inicialmente empregado para a realização de experimentos de hibridação *in situ*. Um segundo protocolo, de Sinigaglia *et al.* 2018 foi também utilizado em uma parte dos experimentos para testar protocolos de hibridação *in situ* que não utilizassem formamida no tampão de hibridação. Apesar da realização de 20 experimentos com 9 protocolos diferentes, não tivemos sucesso na detecção dos mRNAs dos genes investigados em embriões de *Ps. hygida*. Em contraste, marcações inespecíficas em remanescentes da cutícula serosal foram observadas rotineiramente. Imagens representativas desse conjunto extenso de experimentos são mostradas na figura 31.

Em experimentos controle, utilizando embriões transgênicos de *Drosophila melanogaster* que expressam *RNA<sup>m</sup>-LacZ* nas células da epiderme, tivemos sucesso na detecção do RNA<sup>m</sup> transgênico, sugerindo que os reagentes utilizados para a síntese das sondas, coleta de embriões, lavagens, hibridação e etapas finais apresentavam-se de boa qualidade e não estavam contaminados com RNAse, o que poderia explicar a ausência de detecção dos RNA<sup>m</sup> *Hox* investigados. Ademais, experimentos controle onde os embriões de *Ps. hygida* não foram incubados com as sondas e foram incubados com o anticorpo anti-DIG não mostraram marcações nos remanescentes da cutícula serosal, sugerindo que parte das sondas podem ter sido capturadas pela cutícula e que as lavagens para remoção das sondas não foram suficientes para remoção desta marcação inespecífica (figura 30). O estabelecimento do protocolo de experimentos de hibridação *in situ* no embrião deste organismo modelo continua uma questão em aberto, entretanto, os esforços empenhados durante a realização dessa dissertação constituem uma importante etapa para futuras tentativas no estabelecimento de protocolos de hibridação *in situ* em embriões de *Ps. hygida*.



**Figura 30: Experimentos de hibridação *in situ* em embriões de *Pseudolycoria hygida* e *Drosophila melanogaster*.** Coleções de embriões de *Ps. hygida* foram sonicados por 60 segundos e submetidas ao protocolo de hibridação de Tautz e Pfeifle, 1989. Linha “anti-senso” mostra embrião hibridado com sondas anti-senso para *Ubx*, *abdA* e *AbdB*. A linha “Senso” mostra embrião hibridado com sondas *senso* anti-*Ubx*, anti-*abdA* e anti-*AbdB*. A linha “Controle” mostra embrião submetido ao protocolo de hibridação *in situ* realizado na ausência de sondas e que foi submetido ao processo de revelação. As setas apontam para o remanescente da cutícula serosal. Note que neste caso não há marcação na cutícula. A linha *BhC4-1-lacZ* mostra um embrião de *Drosophila melanogaster* submetido ao mesmo protocolo de hibridação *in situ* que os embriões de *Ps. hygida* e que foram incubados com sonda anti-senso para o RNAm *lacZ*. Os resultados foram documentados em microscopia de luz (coluna “Campo Claro”) e Microscopia de luz com DIC (coluna “DIC”) em microscópio Leica DM5000B acoplado à câmera digital DCF295.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ORGANIZAÇÃO DOS GENES *HOX* EM SCIARÍDEOS

A análise dos genes *Hox* em *Psil. hygida*, *B. tilicola* e *B. cellarum* revelou que o *locus Hox* canônico (*lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *abd-A* e *Abd-B*) está conservado nos três sciarídeos investigados. Estes resultados estão de acordo com um estudo no qual o complexo *Hox* foi analisado em genomas sequenciados e montados de 243 organismos, de 13 diferentes ordens da classe Insecta, nos quais os genes *Hox* tidos como canônicos estão conservados em todos os genomas analisados (MUHAIR; HOLLAND, 2023).

Em *Psil. hygida*, os genes *Hox* estão organizados no seguinte ordenamento *lab*, *pb*, *Dfd*, *Abd-B*, *abd-A*, *Ubx*, *Antp* e *Scr*. Uma organização distinta do *locus* foi encontrada em *B. tilicola* e *B. cellarum*, organismos nos quais o *locus Hox* apresenta o seguinte ordenamento: *lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *abdA* e *AbdB*. A extensão genômica do *locus Hox* também variou entre os sciarídeos analisados. Em *Psil. hygida*, o *locus Hox* apresenta aproximadamente 13 Mb de extensão, enquanto que nos sciarídeos *B. tilicola* e *B. cellarum* a extensão do *locus Hox* varia entre 1,2 e 1,3 Mb. O ordenamento destes genes em *Psil. hygida* sugere a ocorrência de uma translocação associada a uma inversão dos genes *lab*, *pb* e *Dfd*. Dípteros apresentam um número maior de rearranjos do complexo *Hox* quando comparados com organismos de outras ordens da classe Insecta. Na ordem Diptera, os genes *lab*, *pb* e *Dfd* podem ocorrer no final do complexo (MULHAIR; HOLLAND, 2013), situação similar à observada no *locus Hox* de *Psil. hygida*. Um segmento genômico de 8,1 Mb, separa os genes *Dfd* e *Abd-B* o qual pode ter sido originado a partir de um evento de translocação associado à uma inversão.

Em *Aedes aegypti*, os genes *Hox* estão organizados em dois cromossomos autossômicos: o gene *lab* está localizado no cromossomo 2 enquanto que o restante do complexo *Hox* está localizado no cromossomo 1. Em *Culex quinquefasciatus*, uma organização semelhante é observada, o gene *lab* encontra-se localizado no cromossomo 3 (homólogo ao cromossomo 2 de *A. aegypti*) enquanto que o restante do *locus* encontra-se localizado no cromossomo 1. Em *Anopheles gambiae*, os genes *Hox* estão organizados de

maneira distinta e apresenam o seguinte ordenamento: *Dfd*, *pb*, *lab*, *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *abdA* e *AbdB*, enquanto que em *D. melanogaster* e *D. virilis* o ordenamento dos genes *Hox* é o seguinte: *lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *abdA* e *AbdB*. Apesar das variações observadas, de modo geral, a associação entre os genes *Ubx*, *abdA* e *AbdB* parece ter sido mantida ao longo da evolução (PACE, 2016; MATTHEWS, 2018; MULHAIR; HOLLAND, 2013).

Os dados acerca da organização genômica dos genes *Hox* em sciarídeos sugerem que em pelo menos dois sciarídeos, *PSI. hygida* e *B. tilicola*, os genes *Hox* estão localizados no cromossomo X. Este é um fato interessante tendo em vista os mecanismos de determinação sexual em sciarídeos no qual ocorre a eliminação de um ou dois cromossomos paternos X e nos quais as células somáticas femininas são XX e as masculina X0 (GERBI; 2022). Os mecanismos de determinação sexual e compensação de dose no díptero *D. melanogaster* foram amplamente investigados. Neste organismo, as fêmeas apresentam dois cromossomos X e os machos apresentam um cromossomo X e um Y. A relação X/autossomos regula a expressão do gene *Sex-lethal (Sxl)*, o qual participa da regulação do *splicing* e transcrição de genes envolvidos na determinação sexual e compensação de dose (LUCCHESI; KURODA, 2015). O gene *Sxl* foi identificado em três sciarídeos, *B. tilicola*, *R. americana* e *T. pubescens*, entretanto, o papel deste gene parece ser distinto em sciarídeos (Simon, 2016).

Estudos sugerem que diferenças níveis de expressão de *Hox* estão relacionados à diversificação morfológica e evolução. Por exemplo, em drosofilídeos, diferenças nos níveis de expressão de *Ubx* levam a diferentes padrões de distribuição de tricomas no fêmur posterior do segundo e terceiro par de patas (MERABET; CARNESESCCHI, 2022). Estudos acerca dos mecanismos de compensação de dose e manutenção dos níveis de expressão de *Hox* em sciarídeos poderão ser realizados para compreender se há implicações biológicas do *locus Hox* pertencer ao cromossomo sexual e revelar novos dados acerca os papéis destes processos na evolução de Dípteros.

O complexo Bithorax de *D. melanogaster*, que compreende os genes *Ubx*, *abdA* e *AbdB*, tem se mostrado um excelente modelo para estudos acerca de regulação da expressão gênica (SRINIVASAN; MISHRA 2020). No complexo Bithorax de *D. melanogaster*, vários elementos *cis*-regulatórios como elementos

iniciadores, *enhancers*, domínios de limite da cromatina, elementos de resposta a Polycomb, sequências alvo do promotor, e elementos de ancoragem do promotor foram caracterizados. Interessantemente, estudos revelaram que os elementos *cis*-reguladores também são colineares de acordo com sua função em regular os genes homeóticos no eixo ântero-posterior (MAEDA; KARCH, 2009; SRINIVASAN; MISHRA 2020). Neste sentido, o refinamento da caracterização do *locus Hox* de *Psl. hygida*, um Díptero basal, e dos genes *AbdB*, *abdA* e *Ubx* e a comparação com dados disponíveis acerca a distribuição de elementos de DNA conservados entre dípteros e *D. melanogaster*, podem contribuir para o entendimento da dinâmica e evolução da regulação dos *Hox* na ordem Diptera.

A identificação dos genes *Hox* em três espécies de sciarídeos associada à descrição da localização destes genes no cromossomo X de *Psl. hygida* e *B. tilicola* representam um avanço acerca o entendimento da organização de *Hox* em dípteros. Parte dos nossos dados ainda carecem de validação e para tanto os fragmentos genômicos clonados de 4 dos 8 genes *Hox* de *Psl. hygida* (figuras 15 e 16) servirão como ponto de partida para a síntese de sondas e realização de experimentos de *FISH* que permitirão confirmar a localização do genes *Hox* no cromossomo X de *Psl. hygida*. Embora genomas montados com *Hi-C* apresentem ótima qualidade e possam ser utilizados para validar rearranjos cromossômicos como aqueles que ocorrem em células tumorais, erros de orientação e ordenamento podem ser encontrados e muitas vezes estão associados a *scaffolds* curtos (BURTON *et al.*, 2013). O genoma de *Psl. hygida* apresenta em sua composição 62,66 % de sequências repetitivas e o cromossomo X de *Psl. hygida* apresenta 139.1 Mb (TRINCA *et al.*, 2023). A distância entre os genes *lab* e *AbdB* é de cerca de 10.7 Mb enquanto que a distância entre *lab* e *Ubx* é de cerca de 11.8 Mb. Mapas citogenéticos de cromossomos politênicos de glândulas salivares de *Psl. hygida* encontram-se disponíveis (SAUAIA, 1971) e experimentos de hibridação *in situ* em cromossomos politênicos ou cromossomos metafásicos podem validar os resultados obtidos acerca a localização dos genes *Hox* e sua organização, embora sejam necessários testes para confirmar se a técnica apresenta resolução suficiente para determinar os rearranjos verificados no *locus*.

## 5.2 OS GENES *Hox* DE *Pseudolycoriella hygida*

Os modelos gênicos dos genes *Hox* propostos neste trabalho revelam que o *locus Hox* de *Psl. hygida* está localizado entre as coordenadas 77139073 pb – 90279789 pb do cromossomo X. A análise dos dados de anotação genômica revela que o *locus Hox* contém outros genes codificadores de proteínas, situação similar à observada em *D. melanogaster* (anexo IV). Todos os genes *Hox* estão conservados e o número de isoformas transcricionais varia entre 1 isoforma (*lab*, *Dfd*, *Scr*, *Antp* e *Ubx*) a 11 isoformas (*abdA*). De modo similar, em *D. melanogaster* o número de isoformas varia entre 1 (*Dfd* e *Antp*) a 10 isoformas (*AbdB*) (GRAMATES *et. al.*, 2022) e em *B. tilicola* o número de isoformas varia entre 1 (*Dfd* e *Antp*) a 13 (*abd-A*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). O tamanho dos transcritos identificados em *Psl. hygida* varia entre 1249 pb (*Abd-B.5*) à 6242 pb (*Dfd*) (tabela 5). Em *Psl. hygida*, as isoformas anotadas se referem apenas aos transcritos expressos durante o estágio embrionário e a anotação de transcritos expressos em outras fases do desenvolvimento poderão revelar a existência de isoformas adicionais de *Hox*.

A tradução *in silico* dos transcritos identificados revelou que a maioria das isoformas anotadas apresenta o homeodomínio completo e provavelmente são funcionais (figura 6). O *stop* códon encontrado nos polipeptídeos *Abd-B.4* e *Abd.5* está localizado na porção final do homeodomínio e é possível que algum erro na montagem destes transcritos tenha ocorrido, o que pode ser explicado se os transcritos destas isoformas forem menos abundantes no embrião. O tamanho dos polipeptídeos completos deduzidos dos *Hox* de *Psl. hygida* variou entre 301 aa (*Ubx*) e 619 aa (*Pb.2*). Finalmente, a análise das sequências polipeptídicas deduzidas revelou conservação entre as proteínas *Hox* de *Psl. Hygida* e *B. tilicola* (tabela 4).

A análise das sequências dos clones dos genes *Hox Ubx*, *abd-A* e *Abd-B*, obtidos a partir de cDNA de embriões de *Psl. hygida*, confirmou a existência das isoformas anotadas para os genes *Ubx*, *abdA* e *AbdB* e sugere a existência de isoformas adicionais. Os dados de sequenciamento dos clones de *Ubx* confirmaram a isoforma de *Ubx* anotada e revelaram a existência de uma segunda isoforma não identificada no banco de transcriptoma embrionário (figura 18). A análise dos clones *abdA.1* e *abdA.2* mostrou a existência de isoformas



não identificadas no banco de transcriptoma embrionário. Finalmente, os clones obtidos confirmaram a presença de transcritos *AbdB* em embriões de 4-6 dias idênticos aos identificados no transcriptoma embrionário. Em conjunto, os clones obtidos a partir de DNA genômico e cDNA contribuem para a validação dos modelos gênicos obtidos e constituem ferramentas valiosas a serem utilizadas na confecção de sondas para experimentos de *hibridação in situ* de RNAm e FISH.

### **5.3 HIBRIDAÇÃO *in situ* EM EMBRIÕES DE *PsI. hygida***

Termodinamicamente, duas fitas complementares de ácidos nucleicos podem se anelar sob condições apropriadas, o que é denominado hibridação (YOUNG *et al.*, 2020). Experimentos de hibridação *in situ* fornecem informações úteis acerca o padrão de expressão de RNAm em um dado tecido ou espécime (TAUTZ; PFEIFLE, 1989). O experimento de hibridação *in situ* consiste nas etapas de coleta, fixação e permeabilização do tecido, hibridação, tratamento pós-hibridação e detecção dos híbridos formados. A permeabilização do espécime deve ser suficiente para que ocorra penetração da sonda e reagentes de detecção e branda o suficiente para garantir que a morfologia seja preservada (YOUNG *et al.*, 2020).

Os clones obtidos serviram como ponto de partida para síntese de sondas anti-*senso* e *senso* dos RNAm de *Ubx*, *abdA* e *AbdB*. Neste trabalho, foi utilizado como ponto de partida o protocolo amplamente empregado em embriões de *D. melanogaster*, no qual a detecção dos híbridos RNA:sonda é realizada utilizando-se um anticorpo que reconhece a molécula com o qual a sonda foi marcada durante sua síntese (TAUTZ; PFEIFLE, 1989). O protocolo utilizado para fixar embriões de *PsI. hygida* utiliza um coquetel enzimático que torna os embriões permeáveis a pequenas moléculas como DAPI. Entretanto, os embriões mantêm-se impermeáveis a anticorpos (ULIANA *et al.*, 2018). A sonicação é capaz de aumentar a permeabilidade a anticorpos em embriões e larvas de primeiro estágio de *D. melanogaster* (PATEL, 1992). Neste trabalho, a digestão enzimática parcial dos embriões em etapa anterior à fixação foi combinada com uma etapa de sonicação, realizada após a fixação o que resultou em embriões permeáveis a anticorpos (figura 23). Esta modificação constitui um



avanço metodológico que permitiu a realização de experimentos de imunolocalização em embriões neste modelo não convencional.

Após a padronização dos experimentos de imunolocalização em embriões de *Psil. hygida*, iniciamos a padronização de experimentos de hibridação *in situ* de RNAm. Sondas *sense* (utilizadas como controle) e *anti-sense* para os genes *Ubx*, *abdA* e *AbdB* foram marcadas com DIG e podem ser detectadas utilizando-se um anticorpo anti-DIG. Em síntese, os protocolos utilizados não resultaram na detecção dos RNAm *Hox* em estruturas internas do embrião. Em contraste, remanescentes da cutícula serosal apresentaram intensa marcação (figura 30). Para investigar o anticorpo empregado, foram realizados experimentos controles nos quais os embriões foram incubados com a solução de hibridação na ausência de sondas. Após a incubação com o anticorpo anti-DIG, previamente pré-adsorvido em embriões coletados e fixados com o protocolo de Uliana *et al.* 2018, obtivemos embriões sem marcação alguma, sugestivo de interação inespecífica entre as sondas e a cutícula do embrião. Experimentos de hibridação *in situ* em embriões que apresentam estruturas extraembrionárias complexas como *Parhyale hawaiensis*, *Centruroides sculpturatus* e *Phalangium opilio*, têm sido realizados com sucesso, entretanto, nestes artrópodes os embriões são dissecados durante a etapa de fixação e permeabilização (REHM *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2012 e SHARMA *et al.*, 2013). Infelizmente, o embrião de *Psil. hygida* não é grande o suficiente para que a dissecação manual seja possível e apresenta cerca de 500 µm de diâmetro (dados não mostrados).

A maioria das soluções de hibridação leva em sua composição alguns dos reagentes a seguir: tampão citrato (SSC), formamida, Dextran sulfato, soroalbumina bovina (BSA), tRNA ou DNA e a sonda (YOUNG *et al.*, 2020). A formamida é capaz de diminuir a energia livre da ligação das fitas de ácidos nucleicos, possibilitando que a hibridação ocorra em temperaturas mais baixas sem a perda de especificidade (YOUNG *et al.*, 2020). Embora marcações na cutícula tenham sido observadas, estruturas internas do embrião não apresentavam qualquer sinal de marcação (figura 31). Assim, para favorecer a formação do híbrido RNA:sonda em estruturas internas dos embriões, testamos a diminuição da temperatura de hibridação o que não resultou em mudanças significativas nos resultados obtidos nos experimentos onde utilizamos o protocolo clássico de Tautz e Pfeifle, 1989.

Em *Clytia hemisphaerica*, protocolos que utilizaram formamida na solução de hibridação apresentaram resultados insatisfatórios, nos quais a morfologia do espécime apresentava-se comprometida dificultando a observação dos resultados. A substituição da formamida por Ureia 8 M resultou na obtenção de espécimes com morfologia preservada e resultados de hibridação com melhor resolução (SINIGAGLIA *et al.*, 2018). Em *Psl. hygida*, a substituição da formamida por Uréia 8M não resultou em embriões com significativa melhora na morfologia, nem detecção dos RNAm de *Hox* em estruturas internas do embrião e nem na diminuição da detecção de marcações inespecíficas na cutícula serosal (figura 34).

O padrão de expressão dos RNAm *Hox* em embriões de *Psl. hygida* permanece uma questão em aberto. Além das questões já discutidas, a não detecção de RNAm em estruturas internas do embrião poderia ser explicada por: a) níveis de expressão dos genes analisados abaixo do limite de detecção dos métodos empregados; b) presença de altos níveis de expressão de RNase endógena que resultaria na degradação de RNAs durante a etapa de tratamento enzimático (2 a 6 horas, 37 °C); c) pela utilização de embriões em estágios anteriores aos quais são verificados os maiores níveis das proteínas Antp, Ubx e abdA (Figura 27). Experimentos controle utilizando sondas específicas para transcritos de genes que são altamente expressos durante todo o desenvolvimento embrionário poderão ser tentados e deverão informar acerca da existência de RNase endógena nos embriões. A adição de inibidores de RNase na etapa de tratamento enzimático dos embriões de *Psl. hygida* também poderá ser tentada. Em conjunto, os experimentos realizados constituem uma contribuição relevante a ser utilizada como ponto de partida na padronização de um protocolo de hibridação *in situ* em embriões de *Psl. hygida*.

#### **5.4 PADRÃO DE EXPRESSÃO DE Antp E Ubx/abdA**

Para a investigação do padrão de proteínas de interesse padronizamos neste trabalho um protocolo que permite a imunolocalização de proteínas em embriões de *Psl. hygida*. Na cascata de segmentação de insetos, o *engrailed* constitui um gene *segment-polarity* que é expresso na porção posterior de cada segmento de *D. melanogaster* e cujo padrão de expressão é similar no sciarídeo *R. americana*. Assim, para padronizar os experimentos de imunolocalização

investigamos o padrão de expressão de engrailed que também se mostrou conservado em embriões de *Psl. hygida* (VANARIO-ALONSO *et al.*, 1996).

Os experimentos de imunolocalização revelaram que o gene *Antp* é expresso entre o primeiro segmento torácico (T1) e quinto segmento abdominal (A5) e *Ubx/abdA* tem o início de expressão no segundo segmento torácico (T2) e é continuamente expresso nos demais segmentos abdominais. Os domínios de expressão de *Antp* e *Ubx/abdA* se sobrepõe entre os segmentos T2 a A5. Os padrões de expressão de *Antp* e *Ubx/abd* em *Psl. hygida*, são semelhantes aos observados em *D. melanogaster*, demonstrando conservação entre os domínios de expressão dos três genes *Hox* analisados. Nossos dados concordam com os dados existentes na literatura que revelaram que os domínios de expressão de genes *Hox* anteriores, podem apresentar sobreposição com domínios de expressão de genes *Hox* posteriores (WIRZ *et al.*, 1986; KELSH, 1994; HUGHES; KAUFMAN, 2002, WANNINGER, 2023)

Especificamente, em *D. melanogaster*, a proteína *Antp* é expressa entre o primeiro segmento torácico (T1) e o sétimo segmento abdominal (A7), enquanto que as proteínas *Ubx/abdA* são expressas entre o segundo segmento torácico (T2) até o A8 (WIRZ *et al.*, 1986; KELSH, 1994; HUGHES; KAUFMAN, 2002). Em *D. melanogaster* a proteína *abd-A* determina a identidade dos segmentos A2 – A8 e o fenótipo da ausência de expressão desta proteína nestes segmentos abdominais leva ao desenvolvimento destes segmentos com fenótipo semelhante ao segmento abdominal 1 (A1) (HUGHES; KAUFMAN, 2002). Em *Bombyx*, *Antp* é expresso nos três primeiros segmentos torácicos e mais fracamente nos segmentos abdominais, enquanto que em *Manduca*, a proteína *Antp* é expressa nos três segmentos torácicos e primeiro segmento abdominal. Além disso, em *Apis*, *Antp* é expresso nos três segmentos torácicos enquanto que nos segmentos abdominais é expresso em gradiente (HUGHES; KAUFMAN, 2002). Quanto ao padrão de *Ubx*, os dados disponíveis revelam que em *Tribolium* o domínio de expressão desta proteína inicia em uma região mais anterior do que em *D. melanogaster*. O início da expressão de *Ubx* ocorre no primeiro ao terceiro segmento torácico o qual se expande para os segmentos posteriores (HUGHES; KAUFMAN, 2002). Por outro lado, o padrão de expressão de *Antp* apresenta-se alterado em diferentes crustáceos (HUGHES; KAUFMAN, 2002). O padrão de expressão de proteínas *Hox* ao longo do desenvolvimento

embrionário em sciarídeos não foi anteriormente investigado. Em conjunto, nossos dados sugerem que o padrão de expressão de Antp e Ubx/abdA encontram-se conservados em *Psl. hygida*, um díptero basal da infraordem Bibionomorpha.

A expressão das proteínas Antp e Ubx/abd-A foi confirmada em experimentos de *Western Blots*, os quais sugerem a presença de várias isoformas proteicas de Antp e Ubx/abd-A em extratos totais de embriões de *Psl. hygida* com idades entre 7 – 9 dias. As isoformas proteicas detectadas de Ubx/abd-A apresentam-se dentro do peso molecular esperado enquanto que as isoformas de Antp apresentam um peso molecular maior do que o predito. Essa diferença pode ser atribuída a modificações pós-traducionais na proteína Antp. Alternativamente, no embrião de *Psl. hygida* a proteína Antp pode estar complexada com outras proteínas e os complexos não teriam sido desmontados nas condições utilizadas de preparo das amostras. Experimentos futuros utilizando diferentes tampões de extração deverão ser tentados para melhor investigar o peso molecular da proteína Antp em embriões de *Psl. hygida*.

Os resultados obtidos em *Psl. hygida* sugerem que o padrão de expressão de Antp e Ubx/abdA estão conservados neste díptero basal. Um fato interessante, é que mesmo com a translocação e inversão dos genes *lab*, *pb* e *Dfd*, a colinearidade espacial no padrão de expressão ao longo do eixo anteroposterior de Antp e Ubx/abdA foi mantida. Experimentos de imunolocalização para caracterizar o padrão de expressão de outras proteínas *Hox* e a investigação da conservação dos elementos *cis*-reguladores de *Hox* em *Psl. hygida* deverão fornecer novas informações acerca da evolução deste *locus* na ordem Diptera.

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho revelou que os genes *Hox* encontram-se conservados nos três *sciarídeos* para os quais existem dados genômicos disponíveis *Psl. hygida*, *B. tilicola* e *B. cellarum*. Os dados obtidos sugerem que tanto em *B. tilicola* como em *Psl. hygida*, o *locus Hox* está localizado no cromossomo X. Os dados disponíveis para *Psl. hygida* sugerem a ocorrência de uma translocação seguida de uma inversão dos genes *lab*, *pb* e *Dfd*, o que deverá ser confirmado em experimentos de FISH em cromossomos politênicos. Embora o padrão de expressão do RNAm de genes *Hox* em embriões de *Psl. hygida* constitua uma questão em aberto, os resultados aqui apresentados servem como um ponto de partida importante para estudos futuros.

A padronização de um protocolo de imunolocalização constitui uma contribuição relevante deste trabalho e permite a realização de experimentos de imunolocalização de outras proteínas de interesse em embriões de *Psl. hygida*. Os padrões de expressão das proteínas em, Antp e Ubx/abdA encontram-se conservados entre *D. melanogaster* e *Psl. hygida*. Embora nossos dados sugiram a ocorrência de uma translocação e inversão nos genes *lab*, *pb* e *Dfd* em *Psl. hygida*, os dados de imunolocalização de Antp e Ubx/abdA sugerem que a colinearidade espacial está conservada neste díptero basal.

## 7 TRABALHOS FUTUROS

No presente trabalho, apresentamos a caracterização inicial do *locus Hox* de *Psil. hygida*. Os achados sugerem que neste sciarídeo parte do *locus Hox* encontra-se translocada e invertida. Os clones genômicos obtidos servirão como ponto de partida para experimentos de FISH em cromossomos politênicos, os quais permitirão validar os resultados obtidos quanto ao ordenamento dos genes no *locus Hox*. Neste sentido, recentemente padronizamos a metodologia de esmagamento de cromossomos politênicos no laboratório, que constitui a primeira etapa dos experimentos de FISH.

Uma questão que permanece em aberto é a busca por genes cujas funções homeóticas foram perdidas durante a evolução (*zen*, *ftz* e *bcd*). Buscas preliminares foram realizadas, entretanto o mapeamento destes genes no genoma de *Psil. hygida* carece de estudos mais aprofundados para investigar a ocorrência de translocações, inversões, duplicações ou até mesmo a ausência destes genes. Outra questão que poderá ser investigada refere-se à conservação de elementos *cis*-reguladores que participam do controle da expressão dos genes *Hox* em *Psil. hygida*. Como mencionado anteriormente, os dados obtidos a partir da análise de expressão de *Antp* e *Ubx/abdA* sugerem que a colinearidade espacial está conservada, enquanto que os dados da anotação genômica dos genes *Hox* em *Psil. hygida* sugerem que parte do *locus* passou por uma translocação e inversão. Propomos que a caracterização de elementos regulatórios de *Hox* em *Psil. hygida* pode contribuir para o entendimento da evolução dos genes *Hox* em dípteros.

Por fim, novas alterações no protocolo de hibridação *in situ* poderão ser realizadas incluindo: teste de diferentes pHs na solução de hibridação, uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no protocolo de fixação, fixação a 4 °C e utilização de inibidores de RNase durante a fixação de embriões de *Psil. hygida*. A caracterização do padrão de expressão de proteínas *Hox* também poderá ser ampliada utilizando-se anticorpos capazes de reconhecer as demais proteínas *Hox*. Embora não tenha sido tentada, uma abordagem interessante constitui a realização de ensaios funcionais em *Psil. hygida*. Neste sentido, o silenciamento de diferentes genes *Hox* em embriões de *Psil. hygida* permitirá ampliar a caracterização do *locus Hox* neste modelo não convencional.

## 8. REFERÊNCIAS

- AKAM, M. *et al.* The evolving role of *Hox* genes in arthropods. **Development** (Cambridge, England). Supplement, p. 209–215, 1994. DOI: 10.1242/dev.1994.Supplement.209
- A.H. KIRK-SPRIGGS. Introduction and brief history of afrotropical Dipterology. **In Manual of Afrotropical Diptera**, A.H. Kirk-Spriggs, and B.J. Sinclair, eds. (South African National Biodiversity Institute), pp. 1-67, 2017. Disponível em: <https://www.nhm.ac.uk/our-science/our-work/biodiversity/manual-afrotropical-diptera.html>. Acesso em 02 de Jan. de 2023.
- ALONSO, C. E.; CASTRO E SILVA, T. M.; ABDELHAY, E. Transcription in *Rhynchosciara americana* embryos early development. **Biochemical genetics**, v. 29, n. 7–8, p. 293–300, 1991. DOI: 10.1007/BF00554137
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- ANDREADIS, S. S. *et al.* Isolation of a female-emitted sex pheromone component of the fungus gnat, *Lycoriella ingenua*, attractive to males. **Journal of chemical ecology**, v. 41, n. 12, p. 1127–1136, 2015. DOI: 10.1007/s10886-015-0650-2
- ANDRIOLI, L. P. Toward new *Drosophila* paradigms. **Genesis** (New York, N.Y.: 2000), v. 50, n. 8, p. 585–598, 2012. DOI: 10.1002/dvg.22019
- ANDRIOLI, L. P.; GORAB e J, E. M. The DNA puff C4 expresses a salivary secretion protein in *Trichosia pubescens* (Diptera; Sciaridae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, v. 67, 2008.. DOI: 10.1002/arch.20222
- ATALLAH, J.; LOTT, S. E. Evolution of maternal and zygotic mRNA complements in the early *Drosophila* embryo. **PLoS genetics**, v. 14, n. 12, p. e1007838, 2018. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007838
- BABYTSKIY, A. I. *et al.* New findings of pest sciarid species (Diptera, Sciaridae) in Ukraine, with the first record of *Bradysia difformis*. **Biosystems diversity**, v. 27, n. 2, p. 131–141, 2019. DOI: 10.15421/011918
- BADARACCO, A.; GORAB, E. Unusual chromatin state in *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). **Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**, v. 23, n. 4, p. 781–790, 2015. DOI: 10.1007/s10577-015-9497-1
- BALAVOINE, G.; DE ROSA, R.; ADOUTTE, A. *Hox* clusters and bilaterian phylogeny. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 24, n. 3, p. 366–373, 2002. DOI: 10.1016/s1055-7903(02)00237-3
- BASSO, L. R., Jr *et al.* The induction of DNA puff BhC4-1 gene is a late response to the increase in 20-hydroxyecdysone titers in last instar dipteran larvae. **Mechanisms of development**, v. 110, n. 1–2, p. 15–26, 2002. DOI: 10.1016/s0925-4773(01)00589-5
- BORGES, A.; RODRIGUES, V. P.; GASPAS, M. A. Unequal X chromosomes in *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae) females: karyotype assembly and morphometric analysis. **Genetica**, v. 108, p. 101–105, 2000. DOI: 10.1023/a:1004016809267

- BRAGA, M. F. *et al.* Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de *Passiflora*. **Revista brasileira de fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 284–288, 2006. DOI: 10.1590/S0100-29452006000200029
- BREUER, M. E.; PAVAN, C. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. **Chromosoma**, v. 7, n. 4, p. 341–386, 1955.
- BÜRGLIN, T. R.; AFFOLTER, M. Homeodomain proteins: an update. **Chromosoma**, v. 125, n. 3, p. 497–521, 2016. DOI: 10.1007/s00412-015-0543-8
- BURTON, J. N. *et al.* Chromosome-scale scaffolding of de novo genome assemblies based on chromatin interactions. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 1119–1125, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2727
- CARCUPINO, M.; LUCCHI, A. Eggshell fine structure of *Bradysia aprica* (Winnertz) (Diptera: Sciaridae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 24, p. 109–117, 1995. ISSN : 0020-7322
- CARROLL, S. B. *et al.* Temporal and spatial relationships between segmentation and homeotic gene expression in *Drosophila* embryos: distributions of the fushi tarazu, engrailed, Sex combs reduced, Antennapedia, and Ultrabithorax proteins. **Genes & development**, v. 2, n. 3, p. 350–360, 1988. DOI: 10.1101/gad.2.3.350
- CARVALHO, C.; CASARI e R, A. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. **Fapeam/Holos**. Ribeirão Preto.
- CARVALHO, J. C. *et al.* Specialized features of *Rhynchosciara americana* embryogenesis. **International journal of insect morphology and embryology**, v. 28, n. 4, p. 309–319, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0020-7322\(99\)00040-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7322(99)00040-9)
- CARVALHO, J. C. *et al.* Expression of dorsal-ventral genes during early development of *Rhynchosciara americana* embryos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 1, p. 27–31, 2005. DOI: 10.1590/s0100-879x2005000100005
- CELNIKER, S. E.; KEELAN, D. J.; LEWIS, E. B. The molecular genetics of the Bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the *Abdominal-B* domain. **Genes & development**, v. 3, n. 9, p. 1424–1436, 1989. DOI: 10.1101/gad.3.9.1424
- CHEN, C. *et al.* Detection of insecticide resistance in *Bradysia odoriphaga* Yang *et* Zhang (Diptera: Sciaridae) in China. **Ecotoxicology** (London, England), v. 26, n. 7, p. 868–875, 2017. DOI: 10.1007/s10646-017-1817-0
- CHEN, C. *et al.* Transcriptome analysis and identification of P450 genes relevant to imidaclopriddetoxification in *Bradysia odoriphaga*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 2564, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-20981-2
- COELHO, P. S. *et al.* DNA puff *C4* of *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae) contains genes unequally amplified and differentially expressed during development. **Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**, v. 1, n. 2, p. 121–126, 1993. DOI: 10.1007/BF00710035
- CRIDGE, A. G.; DEARDEN, P. K.; BROWNFIELD, L. R. The developmental hourglass in the evolution of embryogenesis. **Evolutionary Developmental Biology**, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1007/978-3-319-33038-9\_185-1



- DAMEN, G. M W. Evolutionary conservation and divergence of the segmentation process in arthropods. **Anatomists**, v. 236, p. 1379–1391, 2007. DOI 10.1002/dvdy.21157
- DE-ALMEIDA, J. C. A 28-fold increase in secretory protein synthesis is associated with DNA puff activity in the salivary gland of *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 5, p. 605–614, 1997. DOI: 10.1590/s0100-879x1997000500006
- DE-ALMEIDA, J. C.; SAUAIA, H.; VIANA, J. C. 5-Bromo-2'-deoxyuridine induces visible morphological alteration in the DNA puffs of the anterior salivary gland region of *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 12, . 1143–1152, 2010. DOI: 10.1590/s0100-879x2010007500126
- PRZEPIURA, S. C. T *et al.* Mechanisms of programmed cell death in the midgut and salivary glands from *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae) during pupal-adult metamorphosis. **Cell Biology International**, v. 44, p. 1981–1990, 2020. DOI: 10.1002/cbin.11404
- FONTES, A. M. *et al.* The DNA puff BhB10-1 gene encodes a glycine-rich protein secreted by the late stage larval salivary glands of *Bradysia hygida*. **Gene**, v. 231, n. 1–2, p. 67–75, 1999. DOI: 10.1016/s0378-1119(99)00089-x
- FREY, R. Entwurf einer neuen Klassifikation der Mückenfamilie Sciaridae (Lycoriidae). II. Die nordeuropaischen Arten. **Notulae Entomologicae**, v. 27, p. 33–112, 1948.
- GARCIA, A. C. *et al.* Functional characterization of the sciarid *BhC4-1* core promoter in transgenic *Drosophila*. **BMC molecular biology**, v. 12, n. 1, p. 32, 2011. DOI: 10.1186/1471-2199-12-32
- GASPAR, V.; PINATTO, A. R.; BORGES, M. A. NOR sites detected by Ag-DAPI staining of an unusual autosome chromosome of *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae) colocalize with C-banded heterochromatic region. **Genetica**, v. 114, 2002. DOI: 10.1023/a:1014698401988
- GAUNT, S. J. Hox cluster genes and collinearities throughout the tree of animal life. **The International journal of developmental biology**, v. 62, n. 11–12, p. 673–683, 2018. DOI: 10.1387/ijdb.180162sg
- GEHRING, W. J. The homeobox in perspective. **Trends in biochemical sciences**, v. 17, n. 8, p. 277–280, 1992. DOI: 10.1016/0968-0004(92)90434-b
- GEHRING, W. J.; HIROMI, Y. Homeotic genes and the homeobox. **Annual review of genetics**, v. 20, n. 1, p. 147–173, 1986. DOI: 10.1146/annurev.ge.20.120186.001051
- GERBI, S. A. *et al.* DNA amplification in DNA puff *II/9A* of *Sciara coprophila*. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 58, n. 0, p. 487–494, 1993. DOI: 10.1101/sqb.1993.058.01.055
- GERBI, S. A. Non-random chromosome segregation and chromosome eliminations in the fly *Bradysia* (Sciara). **Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**, v. 30, n. 2–3, p. 273–288, 2022. DOI: 10.1007/s10577-022-09701-9
- GRAMATES, L. S. *et al.* FlyBase: a guided tour of highlighted features. **Genetics**, v. 220, n. 4, 2022. Disponível em: <https://flybase.org/>. Acesso em: 02 de Jan. de 2023

- HAJIRNIS, N.; MISHRA, R. K. Homeotic genes: Clustering, modularity, and diversity. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 718308, 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.718308
- HEFFER, A.; PICK, L. Conservation and variation in Hox genes: how insect models pioneered the evo-devo field. **Annual review of entomology**, v. 58, n. 1, p. 161–179, 2013. DOI: 10.1146/annurev-ento-120811-153601
- HUBERT, K. A.; WELLIK, D. M. *Hox* genes in development and beyond. **Development** (Cambridge, England), v. 150, n. 1, 2023. DOI: 10.1242/dev.192476
- HUGHES, C. L. T. C. Hox genes and the evolution of the arthropod body plan 1. **Evolution e development**, v. 4, p. 459–499, 2002. DOI: 10.1046/j.1525-142x.2002.02034.x
- INGHAM, P.; WHITTLE, R. *Trithorax*: A new homeotic mutation of *Drosophila melanogaster* causing transformations of abdominal and thoracic imaginal segments: I. Putative role during embryogenesis. **Molecular and general genetics: MGG**, v. 179, n. 3, p. 607–614, 1980. ISSN: 0026-8925
- KATUMANYANE, A.; FERREIRA e A, T. A review of *Bradysia* spp.(Diptera: Sciaridae) as pests in nursery and glasshouse crops, with special reference to biological control using entomopathogenic nematodes. **African Entomology**, v. 26, p. 1–13, 2018. DOI: 10.4001/003.026.0001
- KAUR, T.; KAPIL, S.; MOUDGIL, A. *Drosophila* embryo as experimental model: lessons learnt from genes in axis formation. **Em: Advances in Animal Experimentation and Modeling. Elsevier**, 2022. p. 205–212. DOI: 10.1016/B978-0-323-90583-1.00022-2
- KELSH, R. *et al.* Homeotic gene expression in the locust *Schistocerca*: an antibody that detects conserved epitopes in *Ultrabithorax* and *abdominal-A* proteins. **Developmental genetics**, v. 15, n. 1, p. 19–31, 1994. DOI: 10.1002/dvg.1020150104
- KOSCHNITZKE, C. *Bradysia* sp. (Diptera: Sciaridae), a pollinator that can die in flowers of *Ditassa banksii* Schult. (Apocynaceae, Asclepiadoideae). **Hoehnea**, v. 45, p. 126–128, 2018. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-61/2017>
- LAICINE, E. M. *et al.* Development of DNA puffs and patterns of polypeptide synthesis in the salivary glands of *Bradysia hygida*. **Chromosoma**, v. 89, n. 4, p. 280–284, 1984. DOI: 10.1007/BF00292475
- LARA, F. J.; STOCKER, A. J.; AMABIS, J. M. DNA sequence amplification in sciarid flies: results and perspectives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 3, p. 233–248, 1991.
- LEE, S.-H. *et al.* Biological characteristics of the ginseng stem fungus gnat (*Phytosciara procera*) and its environmental-friendly control using modified topping of ginseng peduncles. **Journal of ginseng research**, v. 34, n. 1, p. 23–29, 2010. DOI:10.5142/JGR.2010.34.1.023
- LEWIS, E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. **Nature**, v. 276, n. 5688, p. 565–570, 1978. DOI: 10.1038/276565a0
- LEWIS, E. B. Regulation of the genes of the bithorax complex in *Drosophila*. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 50, n. 0, p. 155–164, 1985. DOI: 10.1101/sqb.1985.050.01.021
- LI, M. *et al.* De novo genome assembly of *Bradysia cellarum* (Diptera: Sciaridae), a notorious pest in traditional special vegetables in China. **Insect molecular biology**, v. 31, n. 4, p. 508–518, 2022. DOI: 10.1111/imb.12776

- LINTNER, J. A. *Sciarra coprophila* n. sp. The Manure fly (Ord. Diptera: Fam. Mycetophilidae). **Annual Report of the New York State Museum**, v. 66, p. 391–397, 1894.
- LOEW, H. Dipterologische Beiträge, Vierter Theil. **JJ Heine**, 1850.
- LIU, P. Z.; KAUFMAN, T. C. Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. **Evolution and development**, v. 7, n. 6, p. 629–646, 2005. DOI: 10.1111/j.1525-142X.2005.05066.x
- MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz268
- MAEDA, R. K. et al. The bithorax complex of *Drosophila*: an exceptional *Hox* cluster. **Current topics in developmental biology**, v. 88, p. 1–33, 2009. DOI: 10.1016/S0070-2153(09)88001-0
- MANNING, L.; DOE, C. Q. Immunofluorescent antibody staining of intact *Drosophila* larvae. **Nature protocols**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2017. DOI: 10.1038/nprot.2016.162
- MATTHEWS, B. J. et al. Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. **Nature**, v. 563, n. 7732, p. 501–507, 2018. DOI: 10.1038/s41586-018-0692-z
- MENZEL, F., AND SMITH, J.E. *Sciaridae* (Black Fungus Gnats). In **Manual of Afrotropical Diptera**, A.H. Kirk-Spriggs, and B.J. Sinclair, eds. (South African National Biodiversity Institute), pp. 557-580, 2017. Disponível em: <https://www.nhm.ac.uk/our-science/our-work/biodiversity/manual-afrotropical-diptera.html>. Acesso em 02 de Jan. de 2023.
- MIAO, X. et al. Five mitochondrial genomes of black fungus gnats (Sciaridae) and their phylogenetic implications. **International journal of biological macromolecules**, v. 150, p. 200–205, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.271
- MONESI, N. et al. Immunocharacterization of the DNA puff BhC4-1 protein of *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 6, p. 531–542, 2004. DOI: 10.1016/j.ibmb.2004.02.010
- MONESI, N. et al. Regulation of sciarid DNA puffs by ecdysone: Mechanisms and perspectives. **Em: Ecdysone: Structures and Functions**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. p. 165–183. DOI: 10.1007/978-1-4020-9112-4\_6
- MORI, L.; DESSEN, E. M.; PERONDINI, A. L. A gene that modifies the sex ratio in a bisexual strain of *Sciarra ocellaris*. **Heredity**, v. 42, n. 3, p. 353–357, 1979. DOI: 10.1038/hdy.1979.38
- MORI, L.; PERONDINI, A. L. Errors in the elimination of X chromosomes in *SCIARA OCELLARIS*. **Genetics**, v. 94, n. 3, p. 663–673, 1980. DOI: 10.1093/genetics/94.3.663
- MOHRIG, W.; KAUSCHKE, E.; BROADLEY, A. Revision of black fungus gnat species (Diptera, Sciaridae) described from the Hawaiian Islands by DE Hardy and WA Steffan, and a contribution to the knowledge of the sciarid fauna of the Galápagos Islands. **Zootaxa**, v. 4590, p. 401–439, 2019. DOI: 10.11646/zootaxa.4590.4.1
- MOTT, R. EST\_GENOME: a program to align spliced DNA sequences to unspliced genomic DNA. **Bioinformatics**, 13(4), pp.477-478. 1997. DOI: 10.1093/bioinformatics/13.4.477

- MCKEON, J.; BROCK, H. W. Interactions of the Polycomb group of genes with homeotic loci of *Drosophila*. **Roux's archives of developmental biology: the official organ of the EDBO**, v. 199, n. 7, p. 387–396, 1991. DOI: 10.1007/BF01705848
- NEVES, C. M. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo: Caracterização molecular da região repressora proximal (-1293/-254) no promotor do gene de pufe de DNA *BhC4-1*, 2009.
- NEVES, J. H. et al. Molecular and morphological approach to study the innexin gap junctions in *Rhynchosciara americana*. *Open biology*, v. 11, n. 11, p. 210224, 2021. DOI: 10.1098/rsob.210224
- PACE, R. M.; GRBIĆ, M.; NAGY, L. M. Composition and genomic organization of arthropod *Hox* clusters. **EvoDevo**, v. 7, n. 1, p. 11, 2016. DOI: 10.1186/s13227-016-0048-4
- PAÇÓ-LARSON, M. L. et al. Cloning of a developmentally amplified gene sequence in the DNA puff *C4* of *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae) salivary glands. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 22, n. 5, p. 439–446, 1992. ISSN : 0965-1748
- PANFILIO, K. A. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. **Developmental biology**, v. 313, n. 2, p. 471–491, 2008. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.11.004
- PATEL, N. H. Chapter 24 imaging neuronal subsets and other cell types in whole-mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes. Em: **Methods in Cell Biology**. Elsevier, 1994. p. 445–487. DOI: 10.1016/s0091-679x(08)60927-9
- PEARSON, J. C.; LEMONS, D.; MCGINNIS, W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature reviews. Genetics*, v. 6, n. 12, p. 893–904, 2005. DOI: 10.1038/nrg1726
- PEEL, A. The evolution of arthropod segmentation mechanisms. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 26, n. 10, p. 1108–1116, 2004. DOI: 10.1002/bies.20097
- PERONDINI, A. L. P.; GUTZEIT, H. O.; SANDER, K. Double abdomen induction by UV in *Bradysia tritici* (syn. *Sciara ocellaris*, Sciaridae): sensitive stages and conditions for photoreversal. **Roux's archives of developmental biology: the official organ of the EDBO**, v. 196, n. 4, p. 268–272, 1987. DOI: 10.1007/BF00376352
- PERONDINI, A.; LUIZ PARANHOS, H. O.; GUTZEIT, L. Nuclear division and migration during early embryogenesis of *Bradysia tritici* Coquillet (syn. *Sciara ocellaris*)(Diptera: Sciaridae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 15, p. 155–163, 1986. ISSN : 0020-7322
- RADIN, B. et al. *Bradysia sp.* em morangueiro. **Ciencia rural**, v. 39, n. 2, p. 547–550, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000200036>
- REHM, E. J. et al. *In situ* hybridization of labeled RNA probes to fixed *Parhyale hawaiiensis* embryos. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2009, n. 1, p. db.prot5130, 2009. DOI: 10.1101/pdb.prot5130
- REZENDE-TEIXEIRA, P.; PALOMINO, N. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Rananos expression pattern during oogenesis and early embryonic development in *Rhynchosciara americana*. **Development genes and evolution**, v. 222, n. 3, p. 153–164, 2012. DOI: 10.1007/s00427-012-0398-4

- RIVERA-POMAR, R.; JÄCKLE, H. From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. **Trends in genetics: TIG**, v. 12, n. 11, p. 478–483, 1996. DOI: 10.1016/0168-9525(96)10044-5
- RIZZO, E. Descrição dos pufes cromossômicos da glândula salivar de *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1980.
- SÁNCHEZ-HIGUERAS, C. *et al.* In vivo Hox binding specificity revealed by systematic changes to a single cis regulatory module. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 3597, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-11416-1
- SAUAIA, H. Inibição do desenvolvimento dos Puffs de DNA pela Hidroxiluréia. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1971.
- SAUAIA, H.; M. A description of a new species of *Bradysia* (Diptera, Sciaridae). **Pap Avul Zool**, v. 22, p. 85–88, 1968.
- SEEBER, J. *et al.* Abundance and trophic structure of macro-decomposers on alpine pastureland (Central Alps, Tyrol): effects of abandonment of pasturing. **Pedobiologia**, v. 49, n. 3, p. 221–228, 2005. DOI 10.1016/j.pedobi.2004.10.003
- SHARMA, P. P. *et al.* Hox gene expression in the harvestman *Phalangium opilio* reveals divergent patterning of the chelicerate opisthosoma: *Hox* genes and the chelicerate opisthosoma. **Evolution and development**, v. 14, n. 5, p. 450–463, 2012. DOI: 10.1111/j.1525-142X.2012.00565.x
- SHARMA, P. P. *et al.* *Hox* gene duplications correlate with posterior heteronomy in scorpions. **Proceedings. Biological sciences**, v. 281, n. 1792, p. 20140661, 2014. DOI: 10.1098/rspb.2014.0661
- SHIN, S. *et al.* Molecular phylogeny of black fungus gnats (Diptera: Sciaroidea: Sciaridae) and the evolution of larval habitats. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 66, n. 3, p. 833–846, 2013. DOI: 10.1016/j.ympev.2012.11.008
- SILVA, J. L. DA C.; FERNANDEZ, M. A. Feulgen stain in heterogeneous egg samples from non-synchronized *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae) laboratory culture. **Cytologia**, v. 65, n. 2, p. 167–171, 2000.
- SIMON, C. R.; SIVIERO, F.; MONESI, N. Beyond DNA puffs: What can we learn from studying sciarids?: SCIARID BIOLOGY REVIEW. **Genesis** (New York, N.Y.: 2000), v. 54, n. 7, p. 361–378, 2016. DOI: 10.1002/dvg.22946
- SINIGAGLIA, C. *et al.* A safer, urea-based *in situ* hybridization method improves detection of gene expression in diverse animal species. **Developmental biology**, 434(1), 15-23. 2018. DOI: 10.1016/j.ydbio.2017.11.015
- SOARES, M. A. M. *et al.* Analysis of the amplification and transcription of the C3-22 gene of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae) in transgenic lines of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, v. 112, n. 3, p. 144–151, 2003. DOI: 10.1007/s00412-003-0254-4
- SRINIVASAN, A.; MISHRA, R. K. Lessons on gene regulation learnt from the *Drosophila melanogaster* bithorax complex. **The International journal of developmental biology**, v. 64, n. 1-2–3, p. 151–158, 2020. DOI: 10.1387/ijdb.190167rm
- STOCKER, A. J., *et al.* "DNA replication and amplification during the final cycle of polyteny in sciarid salivary gland chromosomes and their control by ecdysone." **Ciência e Cultura** 48 306-312, 1996.

- TAUTZ, D.; PFEIFLE, C. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. **Chromosoma**, v. 98, n. 2, p. 81–85, 1989. DOI: 10.1007/BF00291041
- TAUTZ, D.; SOMMER, R. J. Evolution of segmentation genes in insects. **Trends in genetics: TIG**, v. 11, n. 1, p. 23–27, 1995. DOI: 10.1016/s0168-9525(00)88982-9
- TAVARES, F. M. *et al.* Avaliação de Isolados de Nematóides Entomopatogênicos, contra a Mosca-dos-Fungos, *Bradysia mabiusi* (Diptera: Sciaridae), Praga em Casa-de-Vegetação. **BioAssay**, v. 7, n. 0, 2013.
- TRINCA, V. *et al.* Characterization of the mitochondrial genomes of *Bradysia hygida*, *Phytosciara flavipes* and *Trichosia splendens* (Diptera: Sciaridae) and novel insights on the control region of sciarid mitogenomes. **Insect molecular biology**, v. 31, n. 4, p. 482–496, 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/105442>. Acesso em 02 Jan. de 2023.
- TRINCA, V. *et al.* Biocatalytic potential of *Pseudolycorella* CAZymes (Sciaroidea, Diptera) in degrading plant and fungal cell wall polysaccharides. **iScience**, 2023.
- TURING, A. The chemical basis of morphogenesis. **Bulletin of mathematical biology**, v. 52, p. 153–197, 1990
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673
- ULIANA, J. V. C. *et al.* Characterizing the embryonic development of *B. hygida* (Diptera: Sciaridae) following enzymatic treatment to permeabilize the serosal cuticle. **Mechanisms of development**, v. 154, p. 270–276, 2018. DOI: 10.1016/j.mod.2018.08.002
- URBAN, J. M. *et al.* High contiguity de novo genome assembly and DNA modification analyses for the fungus fly, *Sciara coprophila*, using single-molecule sequencing. **BMC genomics**, v. 22, n. 1, p. 643, 2021. doi: 10.1186/s12864-021-07926-2.
- VANARIO-ALONSO, C. E. *et al.* Embryonic expression of the engrailed homologue of *Rhynchosciara americana*. **Roux's archives of developmental biology: the official organ of the EDBO**, v. 205, n. 7–8, p. 432–436, 1996. doi: 10.1007/BF00377223.
- VILKAMAA, P.; BURDÍKOVÁ, N.; ŠEVČÍK, J. The Genus *Spinopygina* gen. nov. (Diptera, Sciaridae) from Western North America: Preliminary Molecular Phylogeny and Description of Seven New Species. **Insects**, v. 14, 2023. DOI: 10.3390/insects14020173
- WESTER, J. V. W. C. *et al.* Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* cis-regulatory module that drives gene expression to the larval tracheal system and adult thoracic musculature. **Genesis** (New York, N.Y.: 2000), v. 56, n. 8, p. e23222, 2018. Doi: 10.1002/dvg.23222
- WIEGMANN, B. M. *et al.* Episodic radiations in the fly tree of life. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 14, p. 5690–5695, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1012675108

- WIEGMANN, B. M.; YEATES D.K..**Phylogeny of Diptera**. In **Manual of Afrotropical Diptera**, A.H. Kirk-Spriggs, and B.J. Sinclair, eds. (South African National Biodiversity Institute), pp. 253-265, 2017. Disponível em: <https://www.nhm.ac.uk/our-science/our-work/biodiversity/manual-afrotropical-diptera.html>. Acesso em 02 de Jan. de 2023.
- WIEGMANN, B. M.; RICHARDS, S. Genomes of Diptera. **Current opinion in insect science**, v. 25, p. 116–124, 2018. DOI: 10.1016/j.cois.2018.01.007
- WINTER, C. E. *et al.* The giant DNA puffs of *Rhynchosciara americana* code for polypeptides of the salivary gland secretion. **Journal of insect physiology**, v. 23, n. 11–12, p. 1455–1459, 1977a.
- WINTER, C. E. *et al.* Relationships between newly synthesized proteins and DNA puff patterns in salivary glands of *Rhynchosciara americana*. **Chromosoma**, v. 61, n. 3, p. 193–206, 1977b.
- WINTER, C. E. *et al.* Protein synthesis in the salivary glands of *Rhynchosciara americana*. **Developmental biology**, v. 75, n. 1, p. 1–12, 1980.
- WIRZ, J.; FESSLER, L. I.; GEHRING, W. J. Localization of the Antennapedia protein in *Drosophila* embryos and imaginal discs. **The EMBO journal**, v. 5, n. 12, p. 3327–3334, 1986. Doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04647.x
- YANG, J. K.; ZHANG, X. M. Notes on the fragrant onion gnats with descriptions of two new species of *Bradysia* (Diptera: Sciaridae). *Acta Agric. Univ. Pekin*, v. 11, p. 153–156, 1985.
- YOUNG, A. P.; JACKSON, D. J.; WYETH, R. C. A technical review and guide to RNA fluorescence *in situ* hybridization. **PeerJ**, v. 8, 2020. DOI: 10.7717/peerj.8806

## 9. ANEXOS

### Anexo I: Descrição das sequências utilizadas na busca por ortólogos de *Hox* no transcriptoma de *Pseudolycorella hygida*

Gene	Transcrito	Organismo	ID NCBI
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant D	<i>D. melanogaster</i>	NM_206452.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant E	<i>D. melanogaster</i>	NM_206450.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant F	<i>D. melanogaster</i>	NM_206447.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant G	<i>D. melanogaster</i>	NM_206451.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant H	<i>D. melanogaster</i>	NM_206454.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant I	<i>D. melanogaster</i>	NM_206446.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant J	<i>D. melanogaster</i>	NM_206445.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant K	<i>D. melanogaster</i>	NM_206444.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant L	<i>D. melanogaster</i>	NM_206448.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant M	<i>D. melanogaster</i>	NM_206453.1
<i>Antp</i>	antennapedia, transcript variant N	<i>D. melanogaster</i>	NM_206449.1
<i>Antp</i>	Homeotic protein antennapedia mRNA	<i>A. aegypti</i>	NM_001359030.1
<i>Dfd</i>	deformed (Dfd), mRNA	<i>D. melanogaster</i>	NM_057853.3
<i>Dfd</i>	homeotic protein deformed (Dfd), mRNA	<i>A. aegypti</i>	NM_001359026.1
<i>lab</i>	labial (lab), transcript variant A	<i>D. melanogaster</i>	NM_057265.4
<i>lab</i>	labial (lab), transcript variant B	<i>D. melanogaster</i>	NM_001260024.1
<i>pb</i>	proboscipedia (pb), transcript variant A	<i>D. melanogaster</i>	NM_057321.5
<i>pb</i>	proboscipedia (pb), transcript variant B	<i>D. melanogaster</i>	NM_206441.2



<i>pb</i>	proboscipedia ( <i>pb</i> ), transcript variant C	<i>D. melanogaster</i>	NM_206440.2
<i>pb</i>	proboscipedia ( <i>pb</i> ), transcript variant D	<i>D. melanogaster</i>	NM_206439.2
<i>Scr</i>	sex combs reduced ( <i>Scr</i> ), transcript variant A	<i>D. melanogaster</i>	NM_079524.4
<i>Scr</i>	sex combs reduced ( <i>Scr</i> ), transcript variant B	<i>D. melanogaster</i>	NM_206443.2
<i>abdA</i>	abdominal A ( <i>abdA</i> ), transcript variant A	<i>D. melanogaster</i>	NM_057345.5
<i>abdA</i>	abdominal A ( <i>abdA</i> ), transcript variant B	<i>D. melanogaster</i>	NM_169733.5
<i>abdA</i>	abdominal A ( <i>abdA</i> ), transcript variant C	<i>D. melanogaster</i>	NM_001170161.2
<i>abdA</i>	abdominal A ( <i>abdA</i> ), transcript variant D	<i>D. melanogaster</i>	NM_001260216.2
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant A ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_142320.2
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant B ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_080157.3
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant C ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_169735.2
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant D ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_169736.2
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant E ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_206498.2
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant F ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_001275719.2
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant G ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_001316544.1
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant H ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_001316543.1
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant I ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_001316545.1
<i>abdB</i>	abdominal B, transcript variant J ( <i>AbdB</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_001316542.1
<i>Ubx</i>	ultrabithorax, transcript variant A ( <i>Ubx</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_080504.4
<i>Ubx</i>	ultrabithorax, transcript variant B ( <i>Ubx</i> )	<i>D. melanogaster</i>	NM_080500.4

<i>Ubx</i>	ultrabithorax, transcript variant C (Ubx)	<i>D. melanogaster</i>	NM_169730.3
<i>Ubx</i>	ultrabithorax, transcript variant D (Ubx)	<i>D. melanogaster</i>	NM_169728.3
<i>Ubx</i>	ultrabithorax, transcript variant E (Ubx)	<i>D. melanogaster</i>	NM_169729.3
<i>Ubx</i>	ultrabithorax, transcript variant F (Ubx)	<i>D. melanogaster</i>	NM_206497.3D

A coluna "Gene" descreve o nome do gene, a coluna "Transcrito" descreve o nome do transcrito, a coluna "organismo" descreve o organismo ao qual a sequência pertence e a coluna "ID NCBI" mostra o número de acesso da sequência no NCBI.

**Anexo II: Descrição das sequências utilizadas na busca por ortólogos de *Hox* no genoma de *Bradysia tilicola***

<b>Gene</b>	<b>Polipeptideo</b>	<b>Organismo</b>	<b>ID NCBI</b>
<i>lab</i>	labial, isoform A	<i>D. melanogaster</i>	AAF54098
<i>pb</i>	proboscipedia, isoform A	<i>D. melanogaster</i>	AAF54089
<i>zen</i>	zerknull	<i>D. melanogaster</i>	AAF54087
<i>Dfd</i>	deformed	<i>D. melanogaster</i>	AAF54083
<i>scr</i>	Sex combs reduced, isoform A	<i>D. melanogaster</i>	AAF54082
<i>Antp</i>	antennapedia, isoform D	<i>D. melanogaster</i>	AAS65109.1
<i>Ubx</i>	ultrabithorax, isoform A	<i>D. melanogaster</i>	AAF55355
<i>AbdA</i>	abdominal A, isoform A	<i>D. melanogaster</i>	AAF55359
<i>AbdB</i>	abdominal B, isoform A	<i>D. melanogaster</i>	AAF55363

A coluna "Gene" descreve o nome do gene, a coluna "Polipeptideo" e a coluna "ID NCBI" mostra o número de acesso da sequência no NCBI.

**Anexo III: Principais reagentes e Kits empregados nos experimentos descritos neste trabalho**

<b>Principais Reagentes e Kits Empregados</b>	<b>Fabricante e Código de referência</b>
pGEM-T Vector Systems(Promega)	Promega - A3600
anti- antennapedia	DSHB – 4C3
anti-Ubx/abdA	DSHB - FP6.87
anti-engrailed	DSHB - Mab4D9
anti-AbdB	DSHB – 1A2E9
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed, Alexa Fluor® 488	Abcam – ab150117
goat anti-mouse IgG HRP linked	Cell Signaling Technology – 7076S
Anti- Digoxigenin-Ap Fab Fragments	Roche - 11093274910
<i>Pst</i> I	New England BioLabs - RO140S
<i>Apa</i> I	New England BioLabs - RO114S
<i>Sph</i> I	New England BioLabs – RO182S
<i>Sac</i> I	New England BioLabs - RO156S
T3 RNA polimerase	Roche - RPOLT3-RO
SP6 RNA polimerase	Roche - RPOLSP6-RO
T7 RNA polimerase	Roche - RPOLT7-RO
DIG RNA LABELING MIX 10 X	Roche - 11277073910
Gotaq® G2 Hot Start Polymerase	Promega – M7408
<i>Big dye</i> ® terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems - 4337458
MinElute® Gel Extraction Kit	QIAGEN- 28604
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN - 27104
RNeasy® Plus Micro Kit	QIAGEN - 74034
Protease Inhibitor Cocktail fo use with mammalian cell and tissue extracts, DMSO solution	Sigma – P8340-1
Solução de Luminol A	Cytiva- RPN2232V1
Solução de Peroxidase	Cytiva – RPN2232V2

A coluna “Principais reagentes e Kits Empregados” descreve o nome do reagente ou Kit, a coluna “Fabricante e Código de referência” descreve o nome do fabricante do reagente ou kit e o código de referência do produto.

## Anexo IV: Representação gráfica de uma região do Cromossomo X de *Pseudolycoreiella hygida*

A)



B)



Representação gráfica do compreendido entre as coordenadas 77139073 nt – 90279789 nt do Cromossomo X de *Psi. hygida*. A) visão geral do locus *Hox* de *Psi. hygida*. B) região compreendida entre 80400000 nt – 81000000 nt do Cromossomo X, note a grande quantidade de genes presentes no segmento cromossômico representado.