

PADRÕES DE EXPRESSÃO DE DIFERENTES ISOFORMAS DO GENE
GRAINYHEAD EM OVOS DO BESOURO *Tribolium castaneum*

MATHEUS LESSA CARDOZO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MAIO - 2017

PADRÕES DE EXPRESSÃO DE DIFERENTES ISOFORMAS DO GENE
GRAINYHEAD EM OVOS DO BESOURO *Tribolium castaneum*

MATHEUS LESSA CARDOZO

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MAIO - 2017

Dedico a minha noiva Emily Pires, por ser essa pessoa incrível e por ter aceitado seguir essa longa jornada ao meu lado, me fazendo sentir a pessoa mais sortuda do mundo

O que repreende o escarnekedor, toma afronta para si; e o que censura o ímpio recebe a sua mancha. Não repreendas o escarnekedor, para que não te odeie; repreende o sábio, e ele te amará. Dá instrução ao sábio, e ele se fará mais sábio; ensina o justo e ele aumentará em entendimento.

Provérbios 9:7-9

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pois sem Ele nada do que venhamos a fazer tem nenhum sentido, e que tudo seja para Sua glória.

A minha noiva, Emily Pires, por seu apoio incondicional e interação total em quaisquer situações que eu venha a enfrentar, obrigado por estar sempre comigo, mesmo longe, me dando forças para continuar minhas jornadas.

A meus pais, Antonio Carlos Cardozo e Magda Cardozo, por estarem comigo desde sempre e para sempre, cuidando, orientando e guiando meus passos desde os primeiros, nunca me deixando sentir sozinho ou desamparado.

Ao meu orientador Dr. Gustavo Rezende, e demais professores da UENF pelo comprometimento com a verdade, com a ciência e a valorização do senso crítico, fazendo com que nós, alunos, sejamos verdadeiros questionadores.

Aos meus colegas de laboratório, em particular, Helena Vargas e Lucas Xavier, por estarem sempre dispostos a discutir, ensinar e ajudar, fazendo com que todos nós crescêssemos juntos.

Às minhas irmãs, Melissa Foli e Aline Rocha, pelo apoio e principalmente por acreditar em meu potencial, sendo sempre pessoas encorajadoras e amigas.

Aos meus “pais e mães científicos”, Dra. Alynne Barbosa, Dra. Claudia Uchoa e Dr. Otilio Bastos, por colocarem meus primeiros passos no caminho da ciência, ensinando sempre com carinho e paciência, fazendo com que eu pudesse entender a verdadeira beleza por trás da pesquisa e da ciência.

A UENF, ao LQFPP, e a CAPES por oferecer a excelente oportunidade de realizar esse projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS.....	XIVV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVV
RESUMO	XVIVI
ABSTRACT	XVIII
Introdução.....	1
O modelo de estudo: <i>Tribolium castaneum</i>	1
Embriogênese de <i>T. castaneum</i>	2
Membranas extraembrionárias	7
A cutícula serosa.....	7
Fatores de transcrição e Grainyhead.....	8
O gene <i>grainyhead</i> codifica diferentes isoformas de fatores de transcrição	9
Estrutura gênica de <i>grainyhead</i>	14
Grainyhead e a síntese da cutícula.....	15
Objetivos	16
Objetivos Gerais	16
Objetivos específicos	16
Materiais e métodos	17
Manutenção da colônia de <i>Tribolium castaneum</i>	17
Obtenção de dados e Bioinformática.....	17
Confecção dos <i>primers</i>	18
Reações de RT-PCR	18
Géis de agarose.....	19
Separação, purificação e quantificação das amostras	19
Ligação, transformação, clonagem e obtenção dos plasmídeos	19
Preparo das amostras para sequenciamento.....	20
Análise das sequências	21
Postura e fixação dos ovos.....	21
Hibridização <i>in situ</i>	21
Resultados	23
Levantamento de dados de Bioinformática	23
Definição da região dos <i>primers</i>	25
Expressão das diferentes regiões de <i>Tc-grh</i> ao longo da embriogênese.....	26

Purificação dos amplicons obtidos.	27
Transformação bacteriana.....	29
Análise do sequenciamento	30
Hibridização <i>in situ</i>	34
Discussão	Erro! Indicador não definido.
Conclusões.....	41
Referências bibliográficas.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento embrionário de insetos. A: Fertilização do ovócito. B: Divisão mitótica dos energídeos. C: Migração dos múltiplos energídeos para a região periférica do ovo, formando assim o blastoderma sincicial e formação das células polares. D: Formação do blastoderma celular e dos vitelófagos. Adaptado de Klowden, 2007..... 3

Figura 2: Células blastodermas diferenciadas. Durante o processo de diferenciação, o blastoderma celular se organiza periféricamente no ovo, adjacente à casca. As cores representam os diferentes tipos celulares, mostrados na legenda. Adaptado de Jacobs 2014.... 4

Figura 3: Esquema da diferenciação do blastoderma celular, definição de membranas extraembrionárias e início da gastrulação em embrião de *T. castaneum*. A1, B1, C1 e D1: Marcação nuclear com DAPI. A2, B2, C2 e D2: Esquema representativo dos diferentes tipos celulares presentes em A-D de acordo com as cores presentes na legenda. A1 e A2: Blastoderma celular indiferenciado. B1 e B2: Blastoderma celular diferenciado. C1 e C2: Células do âmnio e do embrião se internalizam e a serosa começa a circundá-los. As setas brancas indicam a formação das dobras amnióticas, e a seta vermelha indica o poço primitivo. D1 e D2: Serosa engloba âmnio e as células do embrião, as células do embrião começam então o processo de extensão. As células da serosa são poliploides e maiores que aquelas do âmnio e do embrião, que são diploides. As setas pretas indicam a direção da extensão da banda germinal. Imagem adaptada de Schroder *et al.*, 2008..... 5

Figura 4: Desenho esquemático comparando embriões de banda curta com embriões de banda longa. O desenho representado em tons de vermelho mostra os embriões dentro de seus respectivos ovos, onde o embrião de banda curta começa a se desenvolver da porção anterior (cor mais forte) para a porção posterior (cor mais fraca), enquanto as células do embrião de banda longa se desenvolvem de forma cronologicamente simultânea. Pode-se observar também que o embrião de banda longa ocupa um espaço consideravelmente maior do ovo, quando comparado ao embrião de banda curta. A barra apresentada em gradiente do vermelho ao branco, significa que quanto mais forte for a cor vermelha, mais cedo aquela porção do embrião começou a se diferenciar. 6

Figura 5: Exemplo de proteína β -Scaffold. Em amarelo as folhas beta (β -sheets), em azul as alfa hélices (α -helix) e em bege a dupla fita de DNA. (A) Visão frontal, (B) visão superior da estrutura protéica. 9

Figura 6: Representação gráfica dos diferentes splices de grainyhead de *Drosophila melanogaster*. Splices RM, RO, RN, RK, RI, RH, RJ, RL onde cada cor indica um *splice* diferente. Os blocos coloridos representam os exons, e as linhas que os ligam representam os introns. Retirada de Menezes, 2014. 11

Figura 7: Sequências de grainyhead de *D. melanogaster*. A sequência de aminoácidos do splice Dm-RJ é mostrada. Diferenças com as demais isoformas (Fig 6) são destacadas com cores, conforme legenda..... 12

Figura 8: Esquema representativo da estrutura primária das proteínas de Grainyhead. São apresentadas a forma canônica de Grh de *D. melanogaster*, Dm-grh_RI, e outras três outras variações: Dm-grh_RH, Dm-grh_RJ e Dm-grh_RL. Nota-se algumas diferenças entre

as formas, como a presença ou não dos éxons destacados. As quatro formas de Grh possuem os três sítios da proteína indicados acima, onde o sítio de ativação está situado na região amino-terminal e os sítios de ligação ao DNA e de dimerização estão localizados na região carboxi-terminal. As barras representam a estrutura proteica, e os números acima das mesmas representam as posições dos aminoácidos (Adaptada de Uv *et al.* 1997)..... **13**

Figura 9: Estrutura genômica à 5' de *Tc-grh*/TC004589 em *T. castaneum*. Parte de cima da imagem: representação gráfica da estrutura gênica próxima à *Tc-grh*/TC004589. Retângulos horizontais coloridos representam os éxons (exceto o retângulo laranja, que representa o GAP 169) e a linha diagonais entre eles, os introns. Os gráficos com barras azuis na vertical representam o perfil de expressão no *tiling array* das região entre TC004587 e *Tc-grh*/TC004589 em embriões com 6, 14 e 30 horas após a postura (HAP). *Tiling array* obtido na base de dados *Beetlebase*. (Adaptado de Menezes, 2014) **15**

Figura 10: Hipótese de trabalho do grupo. Os quadros mostram, de cima para baixo, a associação hierárquica entre os diferentes genes presentes no desenvolvimento da cutícula serosa de insetos. Quadros e setas vermelhos mostram funções já comprovadas enquanto quadros e setas azuis demonstram hipóteses. Mais à esquerda estão indicadas as horas prováveis em que cada evento está ocorrendo. **15**

Figura 11: Esquema representando o plasmídeo pGEM-t Easy. Os sítios para os *primers* utilizados no presente trabalho (M13) estão localizados juntamente com os sítios para RNA polimerase T7 e SP6 e também o gene da β -Lactamase, todos na região de cor laranja. Na região de cor roxa estão o gene que confere resistência ao antibiótico Ampicilina. (Informações obtidas no protocolo online promega: <https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>) **20**

Figura 12: BLASTx da região genômica TC004588 contra todos os bancos de dados não redundantes..... **24**

Figura 13: Alinhamento da sequência de aminoácidos traduzida de TC004588 contra a isoforma X2 da proteína grainyhead de *Anoplophora glabripennis*. **24**

Figura 14: Representação gráfica do gene *Tc-grainyhead*. (A) – Representação das regiões TC004587, TC004588 e TC004589 como encontradas no banco de dados, em vermelho se encontra a região chamada de Gap 169, não sequenciada no genoma, que foi sequenciada por Menezes (2014), e analisada no presente estudo. (B) – Representação do que se sabe ser a verdadeira extensão de *grh*. A região do Gap 169 foi sequenciada e incluída no gene. A região indicada como “Região conservada” apresenta níveis de expressão constantes ao longo da embriogênese, e por isso é uma boa região para síntese de *primers*. Os blocos amarelos representam os exons do gene, e as linhas pretas horizontais entre eles representam os introns. A presença de linhas verticais significa que grandes introns foram cortados para melhor visualização gráfica. A escala em pares de bases (pb) está indicado na régua no canto superior direito, e o tamanho dos “cortes” nas regiões intrônicas está indicado com as setas pretas, também em pares de bases (pb)..... **25**

Figura 15: Representação gráfica das regiões amplificadas por cada par de primers. As setas em vermelho representam a região de anelamento dos *primers*, onde as setas apontando para a direita são os *primers forward* e as setas apontando para a esquerda são os *primers*

reverse. A região a ser amplificada é a região que se localiza entre os *primers forward* e *reverse*. A abreviação “Cons” Significa que um dos *primers* está ancorado na região conservada mostrada na Figura 12. O *primer* 4589-F também se encontra ancorado na região conservada, porém não apresenta a mesma sequência do *primer* Cons-R. 26

Figura 16: Perfil de expressão da região TC004587-Cons nos períodos embrionários entre 02 e 48 horas após a oviposição. O peso molecular é mostrado em pares de bases no poço mais à esquerda. O último poço representa o controle negativo NTC (*Non-template control*), que é um poço onde não foi adicionado nenhum DNA. As bandas amplificadas possuem aproximadamente 1500 e 2000 pb e a caixa vermelha destaca as bandas selecionadas para avançar para as próximas etapas. 26

Figura 17: Perfil de expressão da região TC004588-Cons nos períodos embrionários entre 02 e 48 horas após a oviposição. Peso molecular é mostrado em pares de bases. O último poço representa o controle negativo NTC. As bandas amplificadas possuem aproximadamente 1000 e 1500 pb e a caixa vermelha destaca as bandas selecionadas para avançar para as próximas etapas. 27

Figura 18: Perfil de expressão da região TC004589-Cons nos períodos embrionários de 02 e 48 horas após a oviposição. Peso molecular é mostrado em pares de bases. O último poço representa o controle negativo NTC. As bandas amplificadas possuem cerca de 1000 pb. 27

Figura 19: Gel dos amplicons a serem purificados. Relação de poços e conteúdo: 1 – padrão de peso, 2 a 6: produtos de RT-PCR, a saber: 2 – Controle Positivo (RPS6), 3 e 4: – amplicons da região TC004587-Cons com cDNA de embriões de 06 HAP (poço 3) e com cDNA de embriões de 10HAP (poço 4), 5 e 6: – amplicons da região TC004588-Cons com cDNA de embriões 06 HAP (poço 5) e com cDNA de embriões de 10HAP (poço 6). NTC: *non template control*. 28

Figura 20: Géis após a purificação dos amplicons selecionados. As bandas numeradas de 1 a 6 são referentes à amplicons da região TC004587-Cons (1 a 3 de 6 HAP; 4 a 6 de 10 HAP) e as bandas de 7 a 12 são referentes à amplicons da região TC004588-Cons (7 a 9 de 6 HAP; 10 a 12 de 10 HAP). As bandas 2, 5, 8 e 11 não apresentaram um resultado satisfatório, uma vez que se abriram em diversas bandas e por isso foram desconsideradas. O padrão de peso molecular é mostrado em pares de bases. Após a purificação então, obteve-se 8 amostras no total (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12) que seguiram para sequenciamento. 28

Figura 21: Géis dos PCRs de colônia. São mostradas todas as 24 colônias geradas a partir das 8 amostras purificadas anteriormente, juntamente com o controle positivo do PCR (Ctrl Pos., onde foi utilizado o gene constitutivo *Tc-Rps6*) e os controles negativos de cada gel (NTC). 29

Figura 22: Representação gráfica dos diferentes splices de Tc-grh (Spl 01 – 07). Nesse esquema são mostrados diferentes splices de *Tc-grh*, cada um com uma cor diferente. Os retângulos indicam os exons, linhas horizontais e verticais representam, respectivamente, regiões intrônicas e cortes nessas regiões. Em amarelo são representados os exons para a região "*Tc-grh* completo" descrita no Ensembl. Fw1, Fw2 e Rev representam, respectivamente, a região dos *primers* 4587-F, 4588-F e Cons-R (vide Tabela 1). Os clones que geraram cada sequência se encontram sinalizados à esquerda. Essa representação gráfica

foi feita com auxílio dos programas *GenePalette* e *Microsoft Powerpoint 2013* a partir dos alinhamentos obtidos com a extensão do *Clustal W* dentro do programa *Bioedit*. 30

Figura 23: Representação gráfica dos splices 03 – 07. Splices 01 e 02 foram removidos por se tratarem de formas repetidas (Spl 01 = Spl 04 / Spl 02 = Spl 06). A direita dos *splices* são mostrados em vermelho os percentuais de frequência dentre todos os clones analisados. No Spl 04 em caixa vermelha está destacado o “Exon novo” e a ausência do mesmo também está destacada, no Spl 06. A barra em amarelo representa a região genômica de *grainyhead* com os éxons deduzidos no Ensembl; parte do "exon novo" está contida na região Gap169, não sequenciada no genoma (vide texto principal e Figuras 9 e 14). 31

Figura 24: Sequência parcial de aminoácidos de Tc-grh, obtida experimentalmente. A sequência de aminoácidos do splice Spl 04 é mostrada como base, comparada com as demais isoformas presentes na Figura 21. Os resíduos de aminoácido com fundo cinza são a região do “exon novo” encontrada no Spl 04 e ausente do Spl 06. As letras em amarelo representam os aminoácidos ausentes no Spl 03. As letras em vermelho representam os resíduos presentes no Spl 07 e os resíduos sublinhados são os presentes no Spl 05. 32

Figura 25: Alinhamento entre as sequências das proteínas deduzidas de grainyhead de A. gambiae, D. melanogaster e T. castaneum. Foram utilizadas as maiores isoformas de Grh de *D. melanogaster* e *A. gambiae*. A sequência de Tc-Grh mostrada é a do Splice 01 adicionada das regiões mais extremas do gene *Tc-grh* que não foram amplificadas pelos primers que utilizamos. Essas regiões estão sublinhadas e foram retiradas da sequência anotada no *Ensembl*. Abaixo dos aminoácidos o ponto (.), os dois pontos (:) e o asterisco (*) significam, respectivamente, aminoácidos conservados, altamente conservados e idênticos. O Splice 01 de *Tc-grh* foi traduzido utilizando o software Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>) e as proteínas foram alinhadas com a ferramenta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). 33

Figura 26: Representação gráfica da região amplificada dentro de Spl 04. A região indicada pelo colchete foi amplificada por PCR incluindo boa parte do “Exon novo”. Os primers utilizados foram MC9-F e MC9-R indicados na metodologia. 34

Figura 27: Hibridizações in situ com embriões de T. castaneum entre 9 e 15 horas após a postura (HAP) para Tc-Zen-1. A, A', B, B': embrião marcado com sondas senso. C, C': embrião marcado com sonda anti-senso. A, B, C: microscopia DIC. A', B', C' microscopia de fluorescência com marcador de núcleos (DAPI). 35

Figura 28: Hibridizações in situ com embriões de T. castaneum entre 9 e 15 horas após a postura (HAP) para Spl 06. A, A', B, B': embrião marcado com sondas senso. C, C', D, D': embriões marcados com sonda anti-senso. A, B, C, D: microscopia DIC. A', B', C', D' microscopia de fluorescência com marcador de núcleos (DAPI). 36

Figura 29: Hibridizações in situ com embriões de T. castaneum entre 9 e 15 horas após a postura (HAP) para a porção de Spl 04. A, A', B, B': embrião marcado com sondas senso. C, C', D, D': embriões marcados com sonda anti-senso. A, B, C, D: microscopia DIC. A', B', C', D' microscopia de fluorescência com marcador de núcleos (DAPI). 37

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Tabela contendo os nomes e sequencias de nucleotídeos de cada um dos primers utilizados nos experimentos	19
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

μ L – Microlitros

μ m - Micrometro

BCIP - 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

cDNA – DNA complementar

cm - Centimetro

Dm – *Drosophila melanogaster*

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxiribonucleico)

dsRNA – dupla fita de RNA

ELF-1 – *Element I binding activity*

Elovl – Elongase (proteína)

g – Grama

HAP – Horas Após a Postura

Kb – Quilobase

LQFPP – Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos

M – Molar

mg – Miligramas

mL – Mililitros

mM – Milimolar

mRNA – RNA mensageiro

NTB - Nitro blue tetrazolium

NTC – Nom Template Control

NTF-1 – *neurogenic element-binding transcription factor 1*

Pb – Pares de bases

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

RNA – Ribonucleic Acid (Acido Ribonucleico)

RNAi – RNA de interferência

rpm – Rotações por minuto

TAF – *TATA-binding associated factors*

Tc – *Tribolium castaneum*

TFIID – Transcription Factor II D (Fator de transcrição II D)

UV – Ultravioleta

RESUMO

Existem diversos mecanismos que fazem com que os insetos se adaptem bem ao ambiente terrestre, dentre eles, os mecanismos para conservação da água dentro do organismo, principalmente durante a embriogênese, uma vez que o ovo é imóvel. Um destes mecanismos é a secreção de uma cutícula extracelular chamada de cutícula serosa, que diminui a saída de água de dentro dos ovos de alguns insetos. Sabe-se que essa estrutura possui quitina em sua composição e que ela é secretada pelas células da serosa, uma importante membrana extraembrionária presente na maioria dos insetos. No entanto o circuito genético envolvido na síntese dessa cutícula ainda não é bem entendida. No mosquito *Anopheles gambiae* já foram estudados diversos genes supostamente associados à secreção da cutícula serosa, entre eles genes responsáveis pela síntese de lipídios e quitina. Além destes, também foram vistos outros genes como *dopa descarboxilase (ddc)* e *grainyhead (grh)*. Ambos estão envolvidos nos processos de esclerotização e melanização e *grh* é conhecido por regular a expressão de *ddc*. Embora não existam evidências que liguem o gene *grh* à síntese da cutícula serosa, acreditamos essa ser uma hipótese razoável, uma vez que no mosquito *A. gambiae*, esse gene se encontra expresso na serosa, assim como uma série de genes sabidamente envolvidos na secreção dessa cutícula. Nosso estudo teve como objetivo o melhor entendimento do papel do gene *grh* nos embriões do besouro *T. castaneum*, e seu envolvimento na síntese da cutícula serosa. O besouro *Tribolium castaneum* é um excelente modelo experimental, já empregado pelo nosso grupo na definição genética da formação da cutícula serosa. Por bioinformática foi observado que a anotação do gene *grainyhead* de *T. castaneum* (*Tc-grh*) nos bancos de dados estava incorreta, uma vez que o mesmo mostrava somente uma fração do gene. Foi estabelecida a verdadeira extensão de *Tc-grh* e uma região pertencente ao gene, que anteriormente constava como ausente no genoma, foi adicionada ao mesmo. Foram feitos RT-PCRs para determinar como o gene era expresso ao longo da embriogênese inicial. O gene *Tc-grh*, além de ser expresso em diversos momentos, parece possuir diferentes formas de *splicing*. Amostras selecionadas foram clonadas e sequenciadas e a presença de diferentes *splice*s de *Tc-grh* foi confirmada. As duas isoformas mais representativas (Spl 06 e Spl 04) foram escolhidas para experimentos de hibridização *in situ*. A isoforma Spl 06 apresentou uma marcação curiosamente diferente do que se esperava, uma vez que a sonda anti-senso do mesmo marcou as células do embrião, mas não as células da serosa. Isso é diferente do que se conhece para *A. gambiae*, em que *grh* é expresso apenas na serosa. A sonda senso para a isoforma Spl 06 de *Tc-grh* não marcou nada especificamente, como esperado. Já a outra isoforma, Spl 04, apresentou um padrão inesperado, onde a sonda senso marcou fortemente as células do embrião, enquanto a sonda anti-senso apresentou marcação fraca e inespecífica. Acredita-se que no caso do Spl 06 o gene *Tc-grh* pode estar atuando como repressor da síntese da cutícula no embrião, deixando esse papel somente para as células onde o mesmo não é expresso, as células da serosa. Já para a marcação de Spl 04, duas hipóteses são as mais prováveis: um erro humano no momento da síntese da sonda, onde os moldes senso e anti-senso foram trocados, ou algum componente complementar à sonda senso de Spl 04 está presente nas células do embrião, que fizeram com que essa sonda fosse hibridizada e a marcação fosse evidente.

Palavras-Chave: *grainyhead*, *Tribolium castaneum*, cutícula serosa, serosa, embrião.

ABSTRACT

Many mechanisms make the insects adapt well in the terrestrial environment, among them, the mechanisms responsible to keep water inside the organisms, mainly during the embryogenesis, once the eggs cannot move. One of those mechanisms is the secretion of an extracellular cuticle, the serosal cuticle, which lowers the water outlet in insect eggs. It is known that this structure has chitin in its composition, as well as its synthesized by the serosal membrane, an important extra-embryonic membrane, present in most insects. However, the genetic pathways involved in this cuticle synthesis is not well understood. Many different genes were already seen in the mosquito *Anopheles gambiae*, whose were supposedly associated with the secretion of the serosal cuticle, among them, genes associated with the synthesis of lipids and chitin. Besides these, *dopa decarboxylase* and *grainyhead* genes were also observed. Both these genes are involved in the processes of sclerotization and melanization, with *grainyhead* being known to regulate *ddc* expression. Although there are no proof that link the gene *grainyhead* to the synthesis of the serosal cuticle, we believe that this is a valid hypothesis, since in the mosquito *A. gambiae*, this gene is found expressed in the serosal membrane, as well as many other genes, known to be associated with the serosal cuticle secretion. Our study aimed to better understand the role of the *grainyhead* gene in the *Tribolium castaneum* beetle embryos, and its importance to the serosal cuticle synthesis. This beetle is an excellent experimental model, previously used by our group in a study defining genetically the formation of the serosal cuticle. Using bioinformatics, we observed that the annotation of the *T. castaneum* gene, *grainyhead*, in the databases was wrong, since it only showed a part of the gene. The full extension of the gene was established, and a portion of it, previously non-sequenced, was added to its sequence. Through the RT-PCR technique, we determined how the gene was expressed over the early embryogenesis. The *Tc-grh* gene, besides being expressed in many moments, appear to have different isoforms (*splicings*). Some selected samples were cloned and sequenced, and the presence of various splicing forms was confirmed. The two more representative forms (Spl 04 and Spl 06) were chosen to the *in situ* hybridization experiment. The Spl 06 isoform presented a marking pattern curiously different from what was expected, once the anti-sense probes marked the embryo cells, and not the serosal cells. This is different from what is known on *A. gambiae*, in which *grh* is expressed in the serosal cells. The sense probe to the Spl 06 isoform did not mark anything specific. The other isoform, Spl 04, presented an unexpected pattern, once the sense probe strongly marked the embryo cells, and the anti-sense probe presented weak and unspecific markings. We believe that, in the Spl 06 case, the *Tc-grh* gene might have been acting as a repressor to the cuticle in the embryo, leaving this role for the serosal cells, where it is not expressed. In the Spl 04, there are two likely hypothesis: a human mistake in the moment of the probe synthesis, when the molds for the sense and anti-sense probes were swapped, or the existence of a cellular component complementary to the sense probe, making it be hybridized, evidencing the markings.

keywords: *grainyhead*, *Tribolium castaneum*, serosal cuticle, serosa, embryo.

Introdução

O modelo de estudo: *Tribolium castaneum*

Quando se busca estudar algo em biologia de insetos, pensa-se como modelo o animal mais estudado de todos, a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830). Entretanto, essa espécie se adaptou ao longo do tempo a ter um ciclo de vida curto, além de ser caracterizado como um inseto de banda germinal longa, o que significa que grande parte do seu blastoderma irá formar o embrião propriamente dito e as regiões anterior e posterior serão definidas simultaneamente. Essas características fazem com que os estudos feitos em *D. melanogaster* não sejam aplicáveis a todos os insetos (Schroder *et al.*, 2008). Existe, porém, um outro inseto que apresenta em suas etapas de desenvolvimento características de caráter menos derivadas, podendo ser comparado com muitos outros insetos. Esse artrópode se chama *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), também conhecido como “besouro vermelho da farinha” por ter sua cor castanha e habitar estoques de grãos e farináceos (Schroder *et al.*, 2008), sendo, dentre os insetos que infestam farinhas e outros produtos estocados, os mais abundantes e destrutivos. Besouros do gênero *Tribolium* vem sendo há muito tempo utilizados em pesquisa, desde que foi descrito por Herbst em 1797, sendo alvo de estudos para diversos entomologistas (Brown *et al.*, 2009, Chapman, 1924, Ford, 1937).

Em 1966, o pesquisador Alexander Sokoloff, passou a utilizar o *T. castaneum* como organismo modelo em estudos de genética populacional (Benton e Pavlopoulos, 2014), visando entender melhor a distribuição e mudança na frequência de alelos sob influência de quatro forças evolutivas: seleção natural, deriva gênica, mutação e fluxo gênico (Gillespie, 1998). Além de possuir essas características de menos derivadas, esse inseto também pode ser facilmente cultivado somente em farinha, possui um ciclo de vida rápido, onde desde a eclosão do ovo até ser maduro sexualmente se passam apenas 4 semanas quando mantidos à 30 °C. *T. castaneum* pode viver até 3 anos, e possibilita a realização de uma série de técnicas para a pesquisa de regulação de genes associados ao seu desenvolvimento, além de possuir seu genoma sequenciado, possibilitando a identificação mais precisa e sistemática de seus genes. Além disso, também podem ser facilmente identificados diversos ortólogos de genes de *D. melanogaster* conhecidos, o que também facilita a pesquisa com este modelo. A utilização de silenciamento por RNAi (RNA de interferência) também já foi padronizada em *T. castaneum*, tanto na sua forma adulta quanto nos embriões. Todas estas vantagens tornam esse inseto um candidato promissor para servir como modelo em estudos de genética. (Lorini 2002, Bucher 2002, Tomoyasu 2004).

Encontra-se disponível também atualmente, nos bancos de dados, a sequência genômica de outro besouro: *Dendroctonus ponderosae*. No entanto, o besouro *T. castaneum* foi escolhido como modelo, tanto por possuir todas as características supracitadas quanto por também já ser objeto de estudo de nosso grupo. Estudos feitos por nosso grupo utilizando esse inseto já evidenciaram: a existência de uma cutícula serosa, e também a presença de alguns genes na serosa desse inseto (Rezende, 2008), a resistência à dessecação conferida pela cutícula serosa (Jacobs *et al.* 2013), análise temporal da formação da cutícula serosa e algumas considerações sobre a estrutura gênica de *grainyhead* (Menezes, 2014), e também a presença de lipídeos na cutícula serosa (Vargas, 2015).

Embriogênese de *T. castaneum*

A embriogênese do besouro *T. castaneum*, acontece da seguinte forma: o núcleo do ovócito (haploide) após a fecundação pelo espermatozoide (haploide) (Figura 1A) forma o núcleo do zigoto (diploide) e o mesmo passa a se dividir e formar vários núcleos, porém, esses núcleos ainda estão dentro de uma única célula, e passam a ser chamados de energídeos (Figura 1B). Após essa divisão rápida e sincronizada esses energídeos migram do interior do vitelo para a periferia do ovo, por dentro da casca, onde formam o que é chamado de blastoderma sincicial (Figura 1C). Posteriormente, há um crescimento da membrana celular do ovo, que passa a envolver cada núcleo individualmente, formando o que se chama blastoderma celular, uma monocamada de células localizadas também perifericamente no ovo. (Figura 1D).

O embrião do besouro *T. castaneum* apresenta diversas características de embriogênese menos derivadas, como a formação de duas membranas extraembrionárias, âmnio e serosa, ser um inseto considerado de banda curta e também por possuir diversos genes ancestrais, que evoluíram a uma taxa moderada, podendo ser utilizados como referência para estudos de seus ortólogos em vertebrados. Já a mosca *D. melanogaster*, que geralmente é escolhido como modelo para esse tipo de estudo, apresenta uma formação diferente de membrana extraembrionária, possuindo uma única membrana denominada amnioserosa. Além disso, *D. melanogaster* é considerado um inseto de banda longa. A diferença entre banda curta e banda longa será melhor explicada abaixo. (Rafiqi *et al.* 2000, Klowden, 2007, Ezzat *et al.*, 2012, Jacobs *et al.*, 2013, Benton e Pavlopoulos, 2014, Richards *et al.*, 2008)

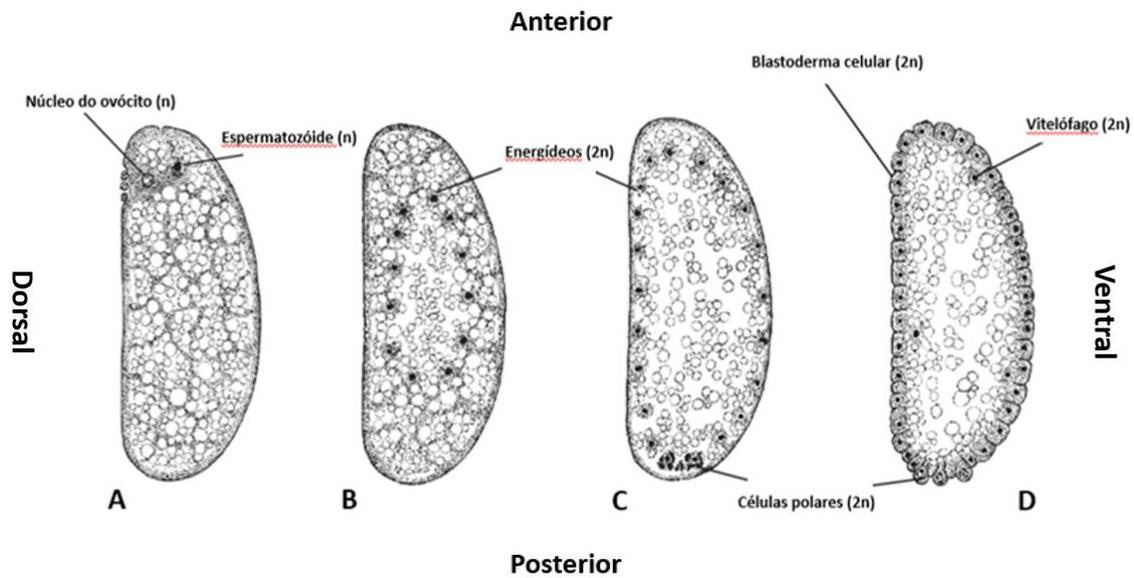


Figura 1: Desenvolvimento embrionário de insetos. A: Fertilização do ovócito. B: Divisão mitótica dos energídeos. C: Migração dos múltiplos energídeos para a região periférica do ovo, formando assim o blastoderma sincicial e formação das células polares. D: Formação do blastoderma celular e dos vitelófagos. Adaptado de Klowden, 2007.

No momento em que a maioria dos núcleos se organiza de forma periférica no ovo, cerca de dois ou três energídeos migram de forma diferenciada, indo para a parte posterior do ovo para subsequente formação das células polares, que originarão, nos adultos, as células germinativas (Figura 1C, D). E outros 20 núcleos não realizam a migração, permanecendo no interior do vitelo, esses núcleos irão formar futuramente, células denominadas vitelófagos, que auxiliarão na digestão da reserva energética do ovo (Figura 1D). Juntamente com a diferenciação das células polares e dos vitelófagos, a membrana plasmática começa a envolver os núcleos periféricos do blastoderma sincicial, fazendo com que cada núcleo dê origem à uma célula diploide. Essas células diploides formam então uma monocamada conhecida como blastoderma celular indiferenciado (Figura 1D) (Klowden 2007, Chapman 2013). Em seguida ocorre um processo, comum em diversos insetos, onde as células do blastoderma se diferenciam em três tipos: células que darão origem ao embrião (essas células também podem ser chamadas de banda germinal), células que originarão a serosa e células que darão origem ao âmnio, sendo as duas últimas, membranas extraembrionárias (Figura 2). Essas membranas são formadas para auxiliar o desenvolvimento do embrião, uma vez que o ovo ao sair do corpo da mãe se torna uma estrutura completamente independente. O papel dessas estruturas será tratado em um próximo tópico.

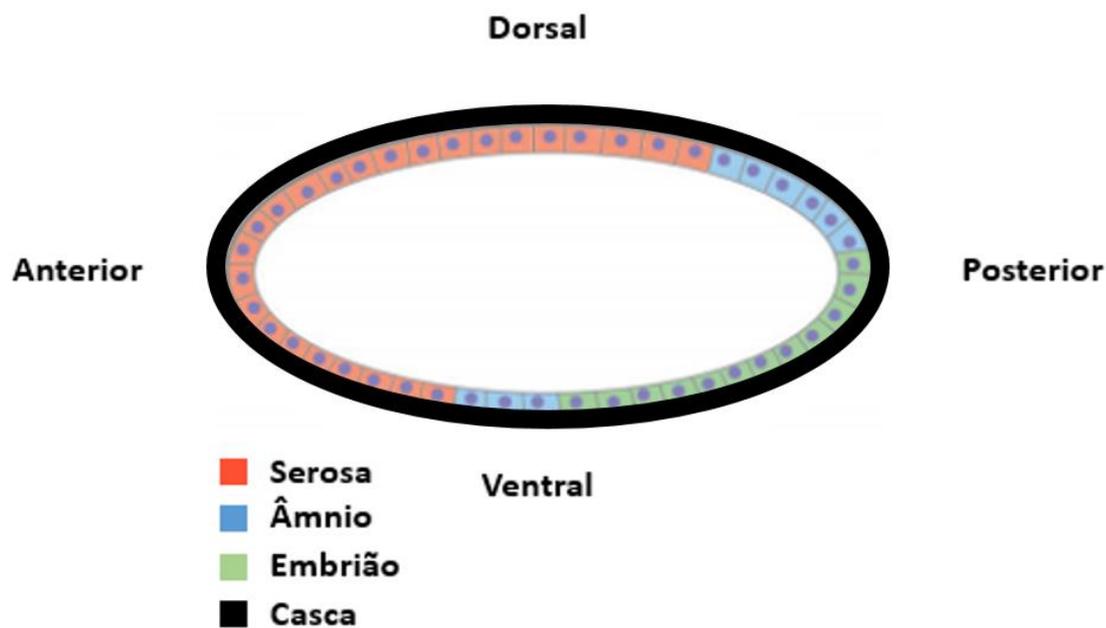


Figura 2: Células blastodermas diferenciadas. Durante o processo de diferenciação, o blastoderma celular se organiza periféricamente no ovo, adjacente à casca. As cores representam os diferentes tipos celulares, mostrados na legenda. Adaptado de Jacobs 2014.

Descrevendo esse processo com mais detalhes: as células do blastoderma celular que ainda não se encontravam diferenciadas (Figura 3 A1 e A2) começam a se diferenciar, assim como foi mostrado na figura 2 (Figura 3 B1 e B2). A região posterior do blastoderma inicia uma pequena invaginação, conhecida como poço primitivo, marcando o início da gastrulação. As células localizadas mais antero-dorsalmente formam a serosa, que começam a se estender e envolver todo o conteúdo do ovo gradativamente (todas as estruturas interiores à casca: a banda germinal, o âmnio e o vitelo) e as células do embrião são internalizadas. As células do âmnio cobrem o embrião ventralmente, e no espaço entre as células amnióticas e o embrião é formada a cavidade amniótica, e essas células do âmnio formam posteriormente as dobras amnióticas anterior e posterior (Figura 3 C1 e C2). Por fim, a serosa envolve completamente o embrião e se fecha ao redor das estruturas internas do ovo se separando do âmnio. Depois que as células da serosa envolvem tanto o embrião quanto às células amnióticas e o vitelo, a banda germinal começa a se estender (Figura 3 D1 e D2) (Brown *et al.* 1994, Handel *et al.* 2000, Schroder *et al.*, 2008, Jacobs *et al.*, 2014).

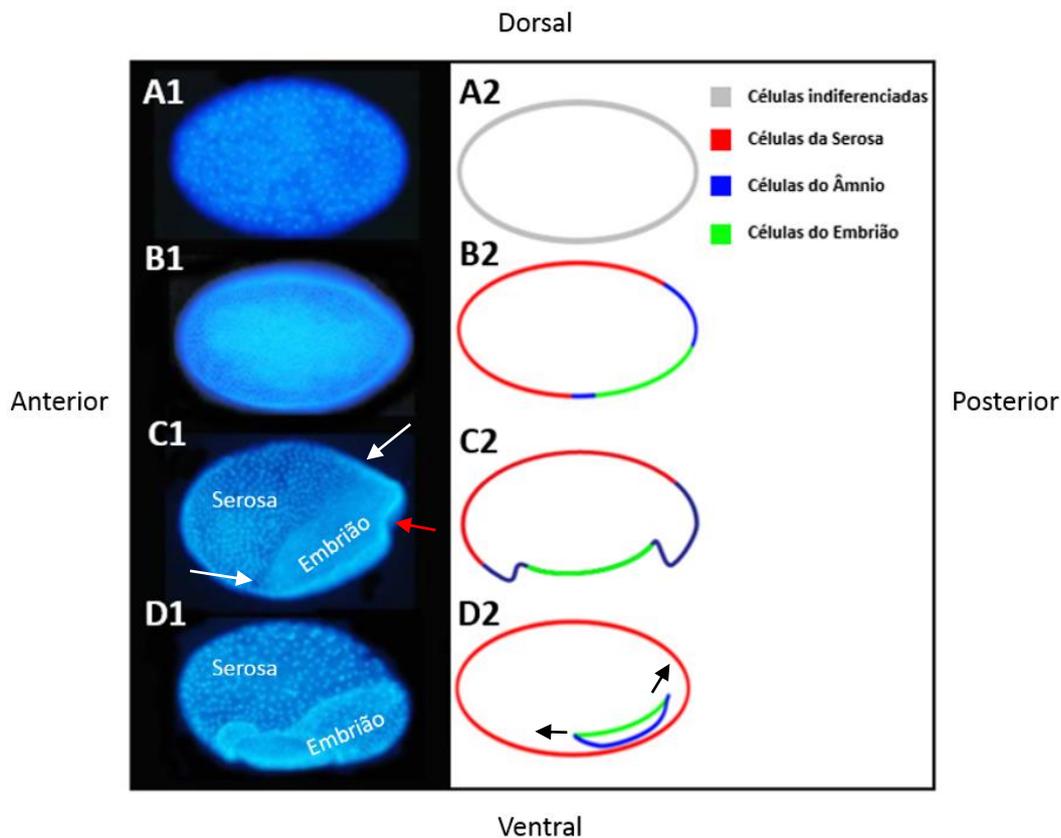


Figura 3: Esquema da diferenciação do blastoderma celular, definição de membranas extraembrionárias e início da gastrulação em embrião de *T. castaneum*. A1, B1, C1 e D1: Marcação nuclear com DAPI. A2, B2, C2 e D2: Esquema representativo dos diferentes tipos celulares presentes em A-D de acordo com as cores presentes na legenda. A1 e A2: Blastoderma celular indiferenciado. B1 e B2: Blastoderma celular diferenciado. C1 e C2: Células do âmnio e do embrião se internalizam e a serosa começa a circundá-los. As setas brancas indicam a formação das dobras amnióticas, e a seta vermelha indica o poço primitivo. D1 e D2: Serosa engloba âmnio e as células do embrião, as células do embrião começam então o processo de extensão. As células da serosa são poliploides e maiores que aquelas do âmnio e do embrião, que são diploides. As setas pretas indicam a direção da extensão da banda germinal. Imagem adaptada de Schroder *et al.*, 2008.

O embrião de banda curta é definido quando apenas uma pequena parte do blastoderma celular diferencia-se no embrião propriamente dito, com o mesmo ocupando um espaço pequeno dentro do ovo quando o processo de gastrulação se inicia (formação da primeira invaginação do blastoderma) e a maior parte das células blastodermais se diferenciam em membranas extraembrionárias. Em contrapartida, nos embriões de banda longa a maior parte das células blastodermais se diferenciam em células embrionárias, ocupando uma maior porcentagem do ovo. Outro ponto que os difere é que as células do embrião de banda curta começam a se diferenciar da região anterior para a região posterior enquanto as células do embrião de banda longa, as células tanto da região anterior quanto da posterior se diferenciam simultaneamente (Figura 4). Os tipos de membranas

extraembrionárias também variam de insetos de banda curta para insetos de banda longa. (Davis e Patel 2002, Kimelman e Martin 2012, Sarrazin *et al.*, 2012).

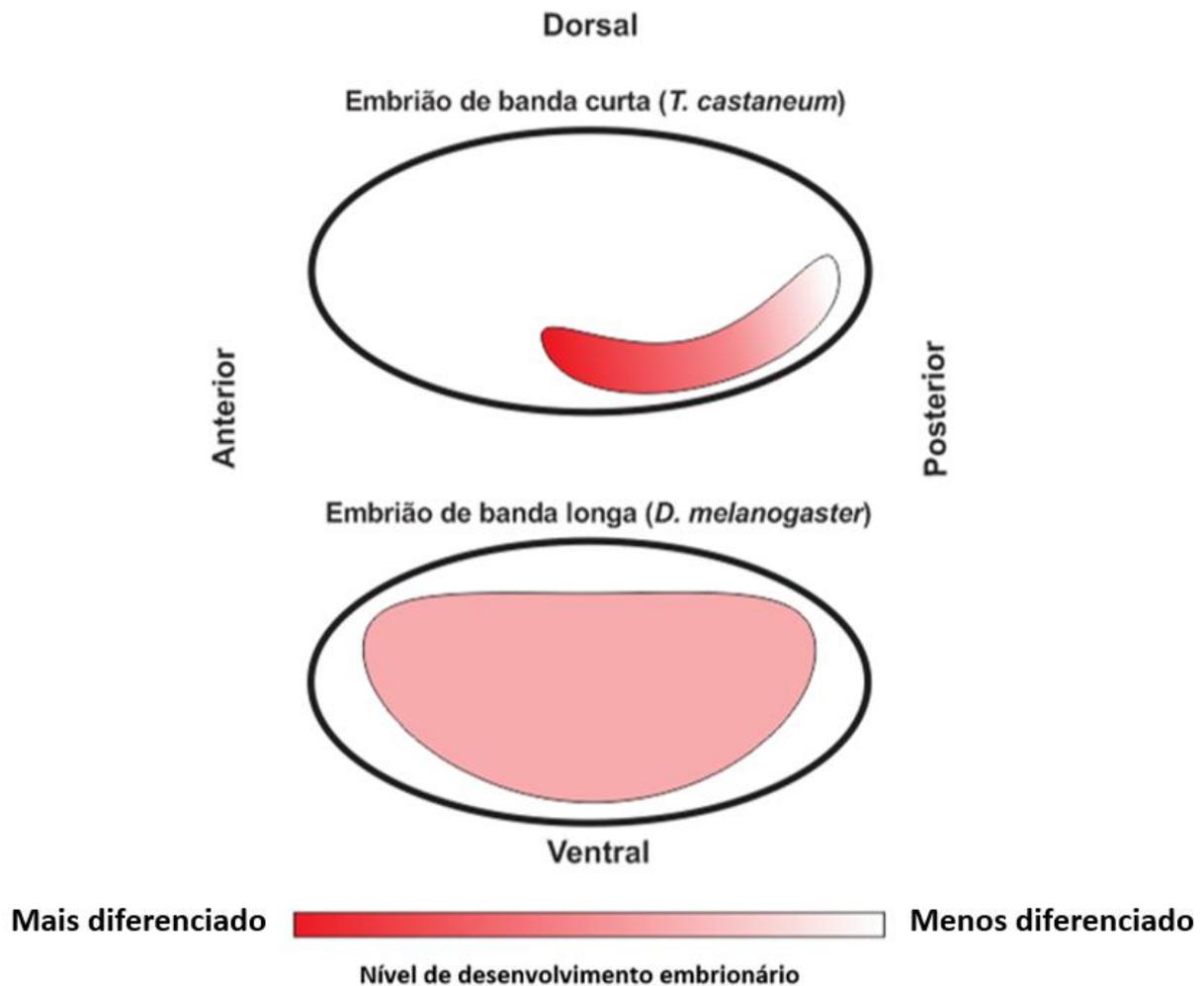


Figura 4: Desenho esquemático comparando embriões de banda curta com embriões de banda longa. O desenho representado em tons de vermelho mostra os embriões dentro de seus respectivos ovos, onde o embrião de banda curta começa a se desenvolver da porção anterior (cor mais forte) para a porção posterior (cor mais fraca), enquanto as células do embrião de banda longa se desenvolvem de forma cronologicamente simultânea. Pode-se observar também que o embrião de banda longa ocupa um espaço consideravelmente maior do ovo, quando comparado ao embrião de banda curta. A barra apresentada em gradiente do vermelho ao branco, significa que quanto mais forte for a cor vermelha, mais cedo aquela porção do embrião começou a se diferenciar.

O embrião continua então a se desenvolver até que se complete o processo de fechamento dorsal, quando as porções laterais do embrião se juntam, “fechando” o mesmo e internalizando o aparato digestório. Após o fechamento dorsal, o embrião continua se desenvolvendo até que esteja pronto para eclodir (Panfilio *et al.*, 2008). O tempo de incubação do ovo de *T. castaneum* é de cerca de 86 horas, e após eclodir, demora apenas 21 dias para se tornar sexualmente maduro e começar a ovipor. (Brown *et al.* 2009)

Membranas extraembrionárias

As membranas extraembrionárias começam a ser especificadas após a formação do blastoderma celular, ou seja, algumas dessas células se diferenciam em células embrionárias, enquanto as demais células formam essas membranas (Handel *et al.*, 2000). A presença dessas duas membranas extraembrionárias nos ovos de insetos (i.e. âmnio e serosa), foi apontada como um fator importante para a adaptação do ovo em diferentes ambientes, o que teria relação com o sucesso evolutivo dos insetos. Devido às características conferidas por essas membranas, como impermeabilização do ovo e proteção física, os mesmos puderam ocupar regiões com temperaturas e condições de umidade mais variadas, e também puderam diminuir a necessidade de cuidado parental, o que faz com que o sucesso reprodutivo desses animais aumente ainda mais em comparação com outros artrópodes. (Zeh *et al.*, 1989).

A cutícula serosa

O nosso grupo previamente descreveu em *T. castaneum*, uma matriz extracelular chamada de cutícula serosa, que se localiza imediatamente abaixo da casca do ovo e é sintetizada durante a embriogênese, logo após a serosa envolver por completo o âmnio e o embrião (Fig. 3, painel D2). Até agora, sabe-se que o fator de transcrição codificado pelo gene *zerknüllt 1 (zen1)* atua na especificação das células da serosa (van der Zee *et al.*, 2005), e sabe-se também que o gene *chitin synthase 1 (chs1)* é fundamental, uma vez que codifica uma enzima responsável pela síntese de quitina para a cutícula serosa (Rezende, 2008, Jacobs *et al.*, 2013). Menezes (2014) descreveu de forma mais detalhada o momento de formação dessa cutícula em *T. castaneum*. A serosa confere ao ovo resistência ao cloro, mesmo quando a casca do ovo é degradada por essa solução. A autora submeteu cinco grupos de ovos de diferentes idades, de 0 a 24 horas após a postura (HAP) a uma solução de cloro (hipoclorito de sódio 5%), onde ovos que não tivessem sintetizado a cutícula seriam digeridos, e os que já tivessem, se manteriam intactos. Viu-se então que ovos com mais de 17 HAP mostraram resistência, uma vez que mais de 80% desses foram observados intactos em lupa, enquanto que em ovos com 13 HAP ou idades menores foram observados menos de 10% de resistentes. Dessa forma foi mostrado que a síntese da cutícula serosa ocorre entre 13 e 17 HAP. Não se sabe a composição exata da cutícula serosa, mas a presença de quitina, um polissacarídeo estrutural de insetos, já foi confirmada em sua estrutura (Rezende, 2008, Jacobs *et al.*, 2013) e cogita-se também a presença de lipídios (Vargas, 2015).

Jacobs *et al.* (2013) demonstrou em *T. castaneum* que uma das funções dessa cutícula é impermeabilizar o embrião em desenvolvimento, protegendo-o contra dessecação. Tal fato pôde ser observado através do bloqueio da expressão do mRNA do gene *zerknüllt 1 (Tc-zen1)* através de RNAi. *Tc-zen1* codifica um fator de transcrição essencial para a diferenciação das células secretoras da cutícula: as células da serosa (van der Zee *et al.*, 2005). O efeito observado em tal silenciamento foi a diminuição da taxa de eclosão de embriões submetidos à estresse de baixa umidade relativa, quando comparada com ovos controles. Ou seja, embriões sem as células da serosa e sem a cutícula serosa são mais sensíveis à perda de água. Outro resultado interessante obtido pelos mesmos autores, foi através do silenciamento do gene quitina sintase 1 (*chs1*), um gene essencial para a síntese de cutículas, que foi visto ser importante para a síntese da cutícula serosa. Esse gene, quando silenciado, afeta a taxa de eclosão dos insetos em situações de umidade muito baixa (abaixo de 50%) enquanto que insetos silenciados para *Zen1* sofrem redução na taxa de eclosão em todas as condições de umidade, quando comparado ao inseto selvagem. Conclui-se então que ovos em que houve o silenciamento do gene *chs1* produz uma cutícula, porém defeituosa, ineficiente, incapaz de garantir a sobrevivência do embrião em condições onde a umidade é muito baixa. (Jacobs *et al.*, 2013)

Fatores de transcrição e Grainyhead

Fatores de transcrição são proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA e regulam a transcrição de determinados genes alvo (Alberts *et al.*, 2008). A transcrição é iniciada com a ligação de um complexo proteico denominado TFIID à região denominada TATA BOX. A região TATA BOX é uma região específica no DNA, rica em adeninas e timinas, na qual a porção do complexo TFIID chamada TATA-binding protein irá se ligar. Outras porções do complexo TFIID, denominadas TAFs (*TATA-binding associated factors*), irão recrutar diversos fatores de transcrição basais, que são proteínas que, juntamente com a RNA polimerase, irão atuar diretamente na transcrição do DNA. Após esse recrutamento, a enzima RNA polimerase se ligará em seu sítio específico no DNA, e depois de recrutar mais alguns fatores basais, formará juntamente com eles e com o complexo TFIID, o aparato basal. Existem outros fatores de transcrição denominados ativadores e repressores. Esses fatores de transcrição podem ou não ser essenciais para que se promova ou reprima a transcrição, no caso dos ativadores ou repressores, respectivamente (Lewin, 2007). Uma mesma molécula pode atuar, tanto como ativador, quanto como repressor em diferentes contextos, como é o caso da proteína Grainyhead (Grh), como será descrito mais abaixo.

A proteína Grh é um fator de transcrição classificada como “*β-Scaffold with minor groove contact*”, esse tipo de fator de transcrição distorce o DNA em seu sítio de ligação inserindo suas cadeias laterais de aminoácidos entre os pares de bases do material genético, distorcendo parcialmente a hélice de DNA. Essa torção reversa resulta em uma grande quantidade de superfície de contato entre a proteína e o DNA, fazendo com que a carga negativa do DNA seja atraída pelos resíduos de lisina e arginina carregados positivamente, presentes na proteína (Carlberg e Molnár, 2014). Abaixo se encontra uma representação resumida da classe de proteínas à qual Grh pertence (Figura 5).

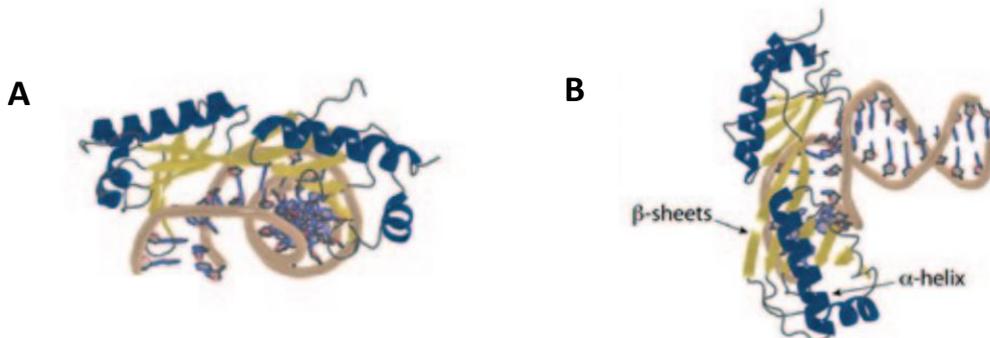


Figura 5: Exemplo de proteína β -Scaffold. Em amarelo as folhas beta (β -sheets), em azul as alfa hélices (α -helix) e em bege a dupla fita de DNA. (A) Visão frontal, (B) visão superior da estrutura protéica.

O gene *grainyhead* codifica diferentes isoformas de fatores de transcrição

O gene *grainyhead* (*grh*), também conhecido como NTF-1 (*neurogenic element-binding transcription factor 1*) (Dymlacht *et al.*, 1989) ou ELF-1 (*Element 1 binding activity*) (Bray, *et al.*, 1989), foi descrito inicialmente em *D. melanogaster* como um mutante letal embrionário por Nüsslein-Volhard *et al.* (1984) com o nome de L(2)IM45. Embriões mutantes para *grh* morrem ao final da embriogênese e, quando removidos da casca do ovo, sua cutícula é mais flexível do que a de embriões selvagens. Esses embriões mutantes apresentam uma cabeça granulosa, irregular, justificando o nome *grainyhead* (“cabeça granulosa” em inglês). Em *D. melanogaster* mutações em outros genes mostram fenótipos parecidos com o mutante para *grainyhead*, como os genes *krotzkopf verkehrt* (*kkv*), que codifica uma quitina sintase, *knickkopf* (*knk*), que codifica uma proteína responsável pela proteção da quitina contra degradação, e estruturação laminar da mesma na procutícula, e *zeppelin* (*zep*) (Sujata *et al.*, 2014). Posteriormente o gene *grh* foi encontrado em diversos animais, desde nematódeos até mamíferos, estando presente em tecidos derivados do ectoderma, como traqueia, epiderme (cutícula) embrionária, intestinos anterior e posterior e sistema nervoso central (Jane *et al.*, 2005, Mace *et al.*, 2005, Wang e Samakovlis, 2012). O gene *grh* também se encontra expresso na serosa do mosquito *A. gambiae*, onde se viu que a

produção da cutícula por parte da serosa está associada com a resistência do embrião à dessecação (Goltsev *et al.*, 2009).

O principal gene descrito a ser regulado por *grh* é *dopa descarboxilase (ddc)*, que codifica uma enzima essencial na estruturação cuticular da larva de *D. melanogaster* e também da cutícula de outros insetos. Essa enzima realiza a descarboxilação de dopa, gerando dopamina, que seguirá uma cascata de reações enzimáticas para produção de quinonas. Essas quinonas formam ligações covalentes com resíduos de histidina presentes nas proteínas da cutícula, levando ao processo de enrijecimento e melanização da mesma. Assim, a perda de *grh* acaba prejudicando a síntese de Ddc, levando ao enfraquecimento da cutícula da larva. Mutantes para *ddc* apresentam defeitos menos drásticos que insetos mutantes para *grh* o que sugere que Grh é importante para regular também outros genes envolvidos na formação da cutícula do inseto, como os descritos mais acima (Wang e Samakovlis, 2012).

Um exemplo em que Grh é um ativador da transcrição gênica é mostrada no trabalho de Mace *et al.* (2005), onde é avaliado seu papel na resposta à injúria física, por meio de testes feitos em embriões de *D. melanogaster*. Pequenas feridas foram feitas utilizando micropipeta em embriões mutados para *grainyhead*, e com o passar do tempo foi visto que, quando comparado com embriões selvagens, a ferida apresentava uma regeneração cuticular anormal, assim como a ausência de um ponto de melanização que se forma imediatamente após a ferida. Tal deficiência na resposta a ferimento também é observada em embriões de camundongos *knock out* para um homólogo de *grh* de *D. melanogaster* chamado *grainyhead-like 3 (grh-l 3)*, descrito no trabalho de Ting *et al.* (2005). Quando os pequenos brotos dos membros superiores desses embriões são amputados, e após algum tempo a recuperação da ferida é observada em microscopia eletrônica de varredura, pode-se ver que o fechamento da mesma em embriões mutados para *grh-l 3* é incompleto, em relação à embriões controle. Este trabalho também observa que o gene transglutaminase 1 (*tgase 1*) é ativado por *grh-l 3*, que assim como *ddc*, codifica uma enzima responsável pelo estabelecimento de ligações cruzadas entre os componentes da barreira epidérmica de camundongos. Tais animais, quando o gene *grh-l 3* não é expresso, apresentam, além de defeitos na resposta a ferimentos, um aumento de permeabilidade a corantes, devido à perda desse tipo de ligação na epiderme (Ting *et al.* 2005).

A atuação de Grh como repressor da transcrição pode ser vista no trabalho de Harrison *et al.* (2010), onde Grainyhead compete *in vitro* pelo sítio de ligação ao DNA do fator de transcrição ativador Zelda (Zld). Além disso, embriões que super expressam Grh apresentam defeitos na divisão celular, o que é similar ao observado em embriões deletados para *zld*.

(Harrison *et al.*, 2010). Em *D. melanogaster* a mãe insere no ovo uma certa quantidade de mRNA e o genoma zigótico se encontra quiescente no início do desenvolvimento. É o material genético materno que regula os processos de desenvolvimento mais iniciais. Conforme o genoma do zigoto se multiplica e aumenta em número, o material genético da mãe passa a fazer cada vez menos parte da regulação da estrutura zigótica, e os genes do próprio zigoto começam a assumir controle da regulação gênica. Esse período é denominado de transição materno-zigótica (TMZ), e um dos genes de grande importância para que o material genético zigótico comece a ser expresso é o gene *zld*. A proteína Grh também citada acima como repressor da transcrição dos genes alvo de Zelda, é proveniente desse material genético materno (Harrison *et al.*, 2010).

Apesar de *D. melanogaster* possuir apenas uma única cópia de *grh* em seu genoma, há 8 tipos diferentes de *splices* para esse gene. Isso também acontece em outros dípteros, como por exemplo, o *A. gambiae*, que também possui somente uma cópia de *grh* e quatro isoformas de *splicing* conhecidas. Uma vez que existem *splices* de *grh* maternos atuando nas fases iniciais da embriogênese, e *splices* pós-zigóticos atuando em diversos processos ao longo do desenvolvimento do mesmo, é importante saber quais formas de *splicing* são responsáveis por quais processos. Um esquema dos *splices* de *grh* de *D. melanogaster* é mostrado na Figura 6, e as sequências de aminoácidos são mostradas na Figura 7.

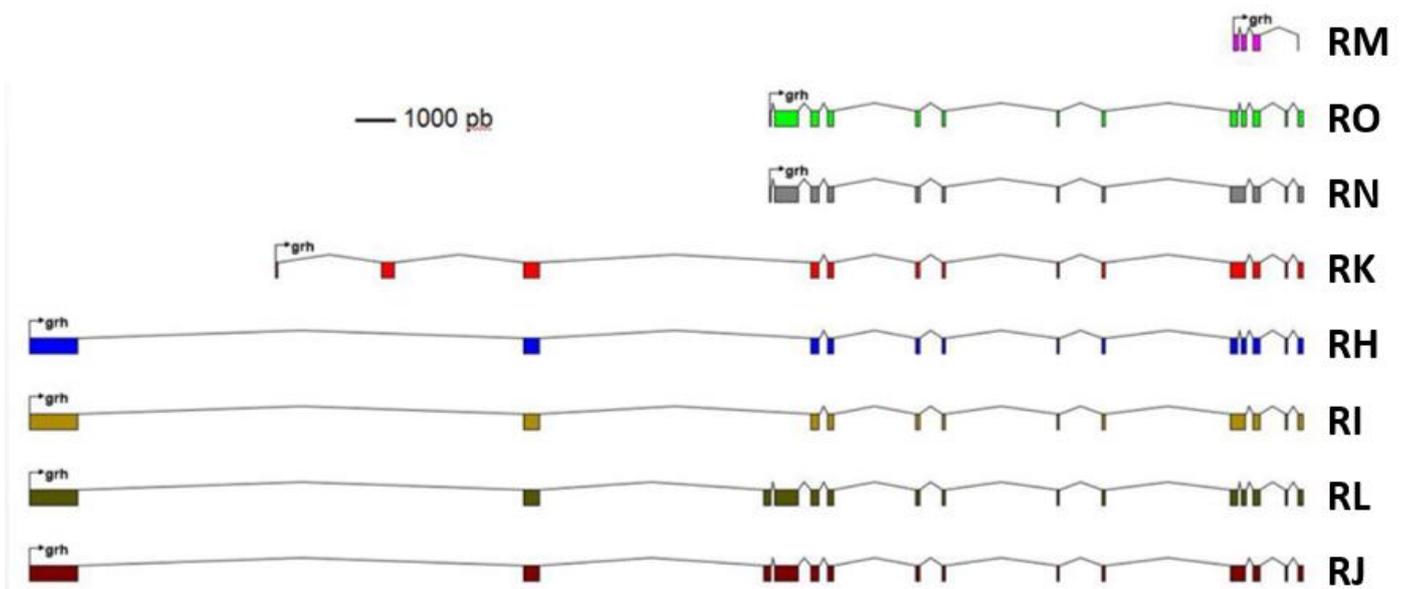


Figura 6: Representação gráfica dos diferentes splices de grainyhead de *Drosophila melanogaster*. Splices RM, RO, RN, RK, RI, RH, RJ, RL onde cada cor indica um *splice* diferente. Os blocos coloridos representam os exons, e as linhas que os ligam representam os introns. Retirada de Menezes, 2014.

Algumas informações sobre a estrutura proteica de Grh de *D. melanogaster* já foram levantadas, como por exemplo, a existência de três sítios fundamentais para seu funcionamento. Um desses sítios é o de ativação, rico em isoleucina e extremamente importante para a atividade transcricional da proteína (Attardi e Tijan, 1993). Os outros dois sítios foram descritos por Uv *et al.* (1994), onde os autores testam diversas formas truncadas de Grh e avaliam a sua atividade de ligação ao DNA, além da sua capacidade de realizar tal ligação estando ou não dimerizado. Em conclusão, os autores determinaram então o sítio de ligação ao DNA do fator de transcrição e seu sítio de dimerização, após ter sido averiguado que tal fator só exerce sua função estando em forma dimérica (Uv *et al.* 1994). Alguns anos depois, o mesmo grupo publicou um outro estudo sobre *Grh* em *D. melanogaster*, onde os autores mostram uma comparação entre a forma canônica de Grh (RI), e outros 3 diferentes *splices* encontrados (RH, RJ e RL) (Figura 8), sendo os *splices* RI e RH expressos exclusivamente nas células epidermais, enquanto que RJ e RL são expressos somente em células do sistema nervoso (Uv *et al.*, 1997). Nas diferentes formas de Grainyhead mostradas na figura, pode-se perceber que apesar das mudanças nos transcritos, os sítios citados acima permanecem em todas as isoformas, sugerindo grande importância para o correto funcionamento do fator de transcrição.

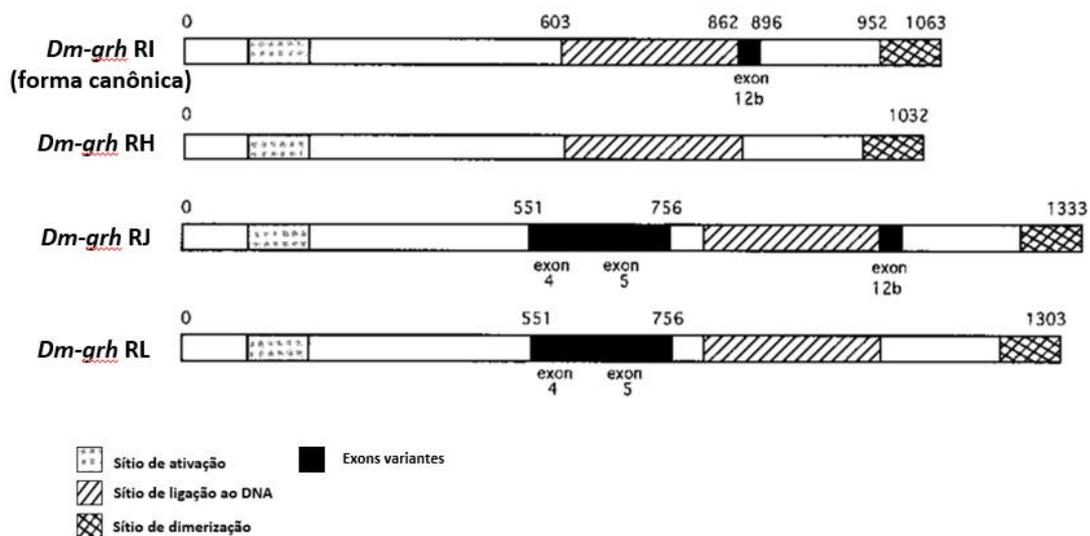


Figura 8: Esquema representativo da estrutura primária das proteínas de Grainyhead. São apresentadas a forma canônica de Grh de *D. melanogaster*, Dm-grh_RI, e outras três outras variações: Dm-grh_RH, Dm-grh_RJ e Dm-grh_RL. Nota-se algumas diferenças entre as formas, como a presença ou não dos éxons destacados. As quatro formas de Grh possuem os três sítios da proteína indicados acima, onde o sítio de ativação está situado na região amino-terminal e os sítios de ligação ao DNA e de dimerização estão localizados na região carboxi-terminal. As barras representam a estrutura proteica, e os números acima das mesmas representam as posições dos aminoácidos (Adaptada de Uv *et al.* 1997).

Estrutura gênica de *grainyhead*

Não existe nenhuma evidência que mostre a relação de *Grh* com a formação da cutícula serosa. No entanto, algumas evidências circunstanciais apontam para isso, uma vez que *Grh* se encontra expresso na serosa de *A. gambiae*, onde também se encontra expresso o gene *ddc* (Goltsev *et al.*, 2009). Além disso, as células da serosa de *T. castaneum* expressam outros genes relacionados com a formação da cutícula serosa, que são semelhantes aos descritos na serosa de *A. gambiae*, como por exemplo os fatores de transcrição *tramtrack* e *tailup* e os genes *chs1* e *Elov11*, envolvidos na síntese de quitina e lipídeos, respectivamente. Isso sugere similaridade entre as estruturas desses diferentes insetos (Rezende, 2008).

Foi visto anteriormente por Menezes (2014) que o *Tc-grh* está anotado nas bases de dados do *BeetleBase* e *Ensembl Metazoa* como TC004589 (denominado daqui em diante como *Tc-grh*/TC004589). A mesma autora descobriu, via BLAST (Altschul *et al.*, 1997), que o gene próximo, TC004587, anotado nas mesmas bases de dados, apresenta alta similaridade com genes *grh* de outros animais. Tal análise foi feita em função da visualização do perfil de expressão da região genômica ao redor de *Tc-grh*/TC004589, em diferentes momentos da embriogênese utilizando a técnica denominada *tiling array*, que é uma variante da técnica de microarranjo (*microarray*), que hibridiza DNA ou RNA marcado às sondas presas à um chip, porém o *tiling array* utiliza sondas que medem a expressão gênica ao longo de todo o genoma do organismo. No *tiling array* realizado para *T. castaneum* foi visto que os níveis de expressão dos exons da região TC004587 se mostravam similares aos da região de *Tc-grh*/TC004589. A mesma autora, viu ainda, que entre as regiões TC004588 e *Tc-grh*/TC004589 havia uma região definida como "Gap 169", ou seja, uma pequena região de genoma não sequenciado. A autora sequenciou o fragmento correspondente ao Gap 169, porém não chegou a analisar a sequência e nem a inserir na estrutura do gene (Menezes 2014) (Figura 9).

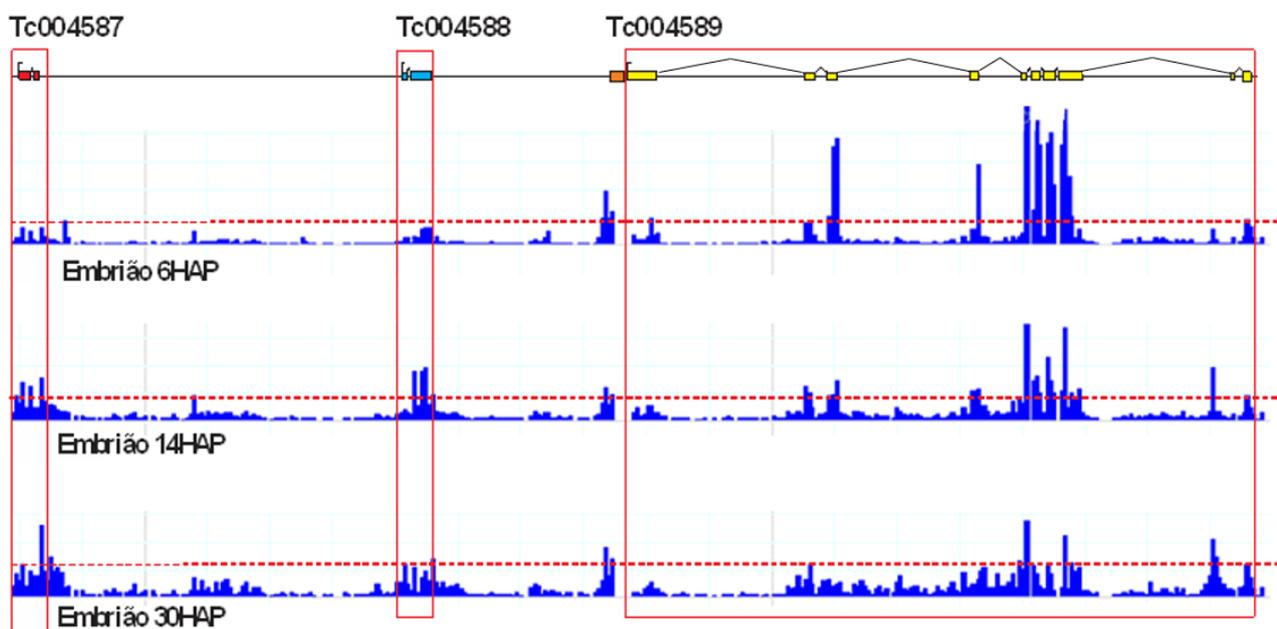


Figura 9: Estrutura genômica à 5' de *Tc-grh*/TC004589 em *T. castaneum*. Parte de cima da imagem: representação gráfica da estrutura gênica próxima à *Tc-grh*/TC004589. Retângulos horizontais coloridos representam os éxons (exceto o retângulo laranja, que representa o GAP 169) e a linha diagonais entre eles, os introns. Os gráficos com barras azuis na vertical representam o perfil de expressão no *tiling array* das região entre TC004587 e *Tc-grh*/TC004589 em embriões com 6, 14 e 30 horas após a postura (HAP). *Tiling array* obtido na base de dados *Beetlebase*. (Adaptado de Menezes, 2014)

Grainyhead e a síntese da cutícula

Colhendo informações sobre o funcionamento do gene *grh* de *T. castaneum*, pode-se ampliar o conhecimento em relação aos processos genéticos relacionados à formação da cutícula serosa, uma vez que ainda se sabe muito pouco sobre a síntese da mesma. O nosso grupo de pesquisa tem como proposta de trabalho determinar diferentes fatores que possam atuar na síntese dessa cutícula. A nossa hipótese (Figura 10) é que após a expressão do gene *zen1* algo leve à expressão do gene *grh*, que por sua vez estaria atuando na regulação da expressão de *ddc* e *chs1*. Porém, entre a diferenciação das células da serosa e a síntese da cutícula, outros genes podem estar envolvidos. Além de *grh*, o nosso grupo também estuda a presença de lipídeos na cutícula serosa, assim como o papel do gene *ddc* em sua síntese.

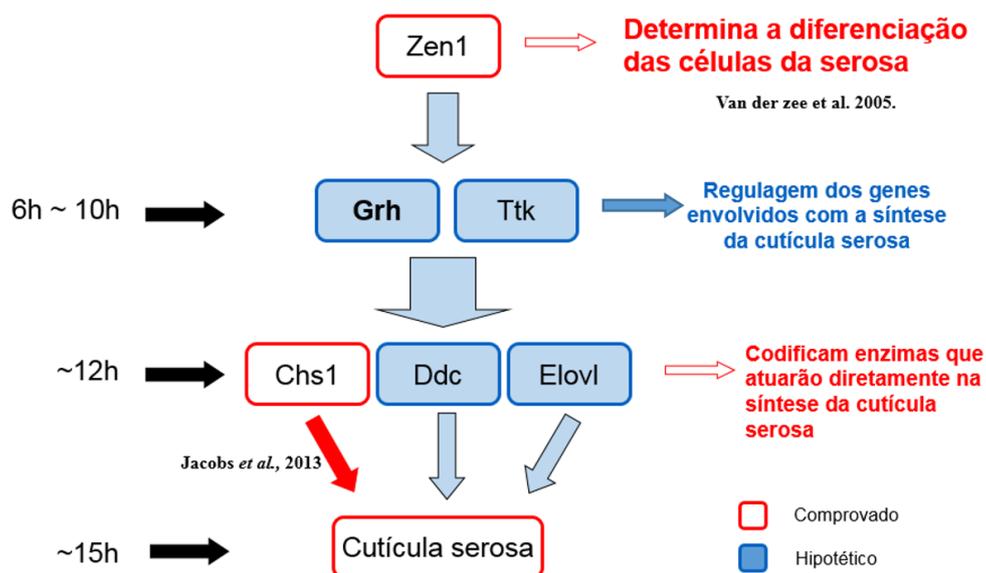


Figura 10: Hipótese de trabalho do grupo. Os quadros mostram, de cima para baixo, a associação hierárquica entre os diferentes genes presentes no desenvolvimento da cutícula serosa de insetos. Quadros e setas vermelhos mostram funções já comprovadas enquanto quadros e setas azuis demonstram hipóteses. Mais à esquerda estão indicadas as horas prováveis em que cada evento está ocorrendo.

Conforme são descobertas maiores informações sobre os genes que regulam diferentes processos biológicos nos insetos, o conhecimento em relação ao desenvolvimento dos mesmos de forma geral também é incrementado, uma vez que se torna possível a comparação de fatores genéticos em diferentes espécies, e a associação dos mesmos às características de cada uma.

Objetivos

Objetivos Gerais

Avaliar o papel de *Grh* na síntese da cutícula serosa durante a embriogênese de *T. castaneum*.

Objetivos específicos

- Analisar a expressão de *grh* em diferentes momentos da embriogênese e verificar a existência de *splices* alternativos para esse gene via RT-PCR;
- Confirmar a existência de *splices* alternativos de *grh* por meio de clonagem e sequenciamento;
- Verificar a expressão espacial de *grh* nas células do ovo através de hibridização *in situ*.

Materiais e métodos

Manutenção da criação de *T. castaneum*

A colônia de besouros *T. castaneum* da cepa americana Georgia foi mantida em nosso próprio laboratório (LQFPP), em estufa seca a 30 °C e cerca de 70% de umidade relativa. Temperatura e umidade foram verificadas semanalmente. Os insetos em os seus estágios de vida (ovos, larvas, pupas e adultos) foram mantidos em potes plásticos (20 x 14,5 cm), onde foram separados por idade (meses de vida). Os imaturos foram separados dos adultos a cada 2 semanas. Os potes continham farinha de trigo (marca Útil, moinhos Vera Crus AS, Juiz de Fora, MG, Brasil) obtida em mercados locais. Antes de ser utilizada, a farinha foi esterilizada *overnight* à -70 °C, seguido de um período de 24 horas em estufa a 60 °C. Após esse período, a farinha era guardada a 4 °C, para que pudesse ser utilizada dentro do prazo de validade. Adultos foram separados dos imaturos e dos ovos produzidos através de peneiração, utilizando peneiras de solo com malha de 710 µm e 300 µm (Betel ISSO 3310/1), sendo a malha de 710 µm empregada para separar os adultos, pupas e larvas maiores, e a de 300 µm para coletar ovos e larvas menores, liberando somente os grãos de farinha.

Obtenção de dados e Bioinformática

Foram utilizadas as bases de dados *Beetlebase* (<http://beetlebase.org>) e *Ensembl metazoa* (<http://metazoa.ensembl.org>). O perfil de expressão dos exons de *grainyhead* durante a embriogênese foi observado através dos dados de *tiling array* disponíveis no *Beetlebase*. O *tiling array* (Mockler *et al.*, 2005) consiste no desenho de sondas que cobrem todo o genoma do organismo, possibilitando a detecção dos níveis de expressão de quaisquer regiões do DNA, mesmo aquelas que apresentam transcritos não anotados.

Como a extensão do gene *Grh* ainda não estava bem estabelecida, uma vez que os bancos de dados apontavam tal gene como sendo a região TC004589, e já foi visto que uma região próxima (TC004587) apresentava similaridade com *grainyhead* de outros animais (Menezes, 2014) (vide Figura 9), foi então utilizada a ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1997) do banco de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), para comparar as regiões genômicas adjacentes à região TC004589 (ou seja, a região ao redor de TC004586, TC004588 e TC004590) para que pudesse se estabelecer a real extensão do gene. O programa utilizado para gerar representações gráficas, comparações e desenho de *primers* foi o *GenePalette*. (<http://www.genepalette.org>).

Confecção dos primers

Foram confeccionados *primers* para diferentes regiões, a fim de observar diferentes padrões de expressão que pudessem apontar para a existência de *splicing* alternativo visto que diferentes exons podiam ou não estar presentes em determinados momentos da embriogênese. A confecção dos *primers* foi feita visando detectar mais de um tipo de *splice*, uma vez que já se sabe da existência de diferentes formas de *grh*, tanto de origem materna quanto zigótica. Além disso, já se sabe também que em *D. melanogaster* diferentes formas de *splicing* de *grh* possuem diferentes funções. Logo, faz-se importante identificar as diferentes formas de *splicing* e seus níveis de expressão em diferentes sítios e etapas do desenvolvimento. Os *primers* foram desenhados utilizando a ferramenta online *Primer3web* versão 4.0.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3>) de forma a obtê-los com tamanhos entre 18-24 pb, com frequência média de CG em torno de 50% , e suas sequências se encontram na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 – Tabela contendo os nomes e sequencias de nucleotídeos de cada um dos primers utilizados nos experimentos.

Nome do Primer	Sequencia de nucleotídeos
4587-F	GTTGAACATCAGCGGCGG
4588-F	CAACTGAAGGCGACCAATGG
Cons-R	TGCGGGACTTTCTAACGGAT
4589-F	CGTGGGTTTAGTCGGCTGTA
4589-R	CGTTGCAATAATACGCCACC
MC9-F	CAACTGAAGGCGACCAATGG
MC9-R	GTAGTACGGGTCGGAGACGA

Reações de RT-PCR

O perfil de expressão do gene *grainyhead* foi avaliado por RT-PCR (*Reverse transcriptase polimerase chain reaction*, do inglês, que significa a Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) onde, a partir de um RNAm é sintetizado um DNA complementar (cDNA) utilizando a enzima transcriptase reversa, e posteriormente realizado um PCR convencional a partir desse molde (cDNA). Foram utilizados cDNAs previamente sintetizados pelo grupo, obtidos em diferentes momentos da embriogênese, a saber: 2 HAP, quando ainda há mRNA materno atuando, 6 HAP, após a transição materno-zigótica (Ribeiro, comunicação pessoal), 10 HAP, quando, supostamente, os genes responsáveis pela secreção da cutícula serosa estão sendo expressos, 14 HAP, momento em

que a cutícula serosa está sendo secretada (Menezes, 2014), 28 HAP, no início da retração da banda germinal e 48 HAP, no início do fechamento dorsal. As amostras utilizadas foram sintetizadas previamente pelo grupo. As condições de ciclagem da reação de PCR são descritas abaixo:

- 95 °C por 3 minutos e 20 segundos

- Ciclagem (34 ciclos)

- 95 °C por 30 segundos

- 60 °C por 40 segundos

- 72 °C (o tempo desta etapa pode variar de 1 a 3 minutos e 20 segundos, de acordo com o tamanho do fragmento a ser amplificado)

- 72 °C por 5 minutos

- 4 °C por 5 minutos

- 14 °C até que as amostras sejam retiradas da máquina

Géis de agarose

Alíquotas dos produtos dos RT-PCRs foram aplicadas em gel de agarose 1% feito com tampão TAE 1x (Tris-HCl 40mM, pH 8,0, ácido acético 20mM, e EDTA 1mM) marcado com o corante [GelRed™](#) (Biotium - 41003). O padrão de peso utilizado foi o O'generuller ladder plus 1kb (Fermentas - SM1343) e os resultados foram registrados em sistema digital de aquisição de imagem após exposição à luz UV.

Separação, purificação e quantificação das amostras

Após a visualização dos resultados dos RT-PCRs, as “bandas” contendo os amplicons de interesse foram cortadas do gel com auxílio de um bisturi, e postas em tubos tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, para que seja feita a purificação deste material com o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare 28-9034-70)

A quantificação do material purificado foi feita no *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific).

Ligação, transformação, clonagem e obtenção dos plasmídeos

Após a purificação, cada amplicon foi clonado em um plasmídeo pGEM-T Easy vector (Promega). Em seguida células competentes de *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas com os plasmídeos através de choque térmico, e estas foram cultivadas em placas contendo meio LB sólido e ampicilina 0,1mg/mL, IPTG (Isopropil β -D-1-

tiogalactopiranosida) 0,5mM e X-gal 0,4mM. Bactérias portadoras de plasmídeos fechados sem inserto utilizam o IPTG como substrato para a produção de uma enzima que quebra a molécula X-gal. O X-gal é um composto que, quando quebrado, apresenta cor azul. Portanto, colônias azuis não possuem inserto em seus plasmídeos. Tal plasmídeo também confere às bactérias resistência à ampicilina, ou seja, bactérias que não tenham internalizado o plasmídeo não são capazes de crescer nas placas contendo meio seletivo. Sendo assim, o próprio crescimento ou não de bactérias na placa já é sinal de que as mesmas possuem o plasmídeo e, dentre estas, há colônias azuis (negativas, sem inserto) e colônias brancas (positivas, com inserto). As colônias positivas foram então coletadas para a realização de PCR de colônia, assim como para crescimento *overnight* a 37 °C em shaker a 220 rpm em meio LB líquido contendo ampicilina (0,1 mg/mL). As bactérias competentes utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro.

Após o crescimento bacteriano, os plasmídeos foram extraídos através de Miniprep, utilizando o kit *GeneJET Plasmid miniprep* (Fermentas K0503).

Preparo das amostras para sequenciamento

Depois de extraídos, os plasmídeos são preparados para o sequenciamento, que é feito na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PDTIS, RPT01A), IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, utilizando *primers*:

M13 *forward* (5' TGTAACGACGGCCAGT 3')

M13 *reverse* (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3')

Tais *primers* encontram-se localizados de forma que o sequenciamento possa iniciar-se no *primer*, e passar pelo fragmento de interesse, obtendo assim a sequência desejada (Figura 11).

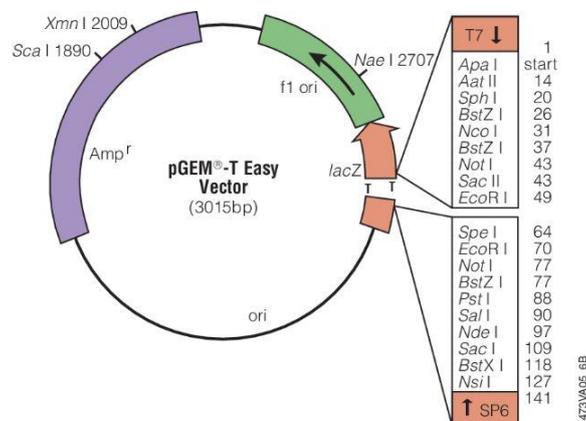


Figura 11: Esquema representando o plasmídeo pGEM-t Easy. Os sítios para os *primers* utilizados no presente trabalho (M13) estão localizados juntamente com os sítios para RNA polimerase T7 e SP6 e também o gene da β -Lactamase, todos na região de cor laranja. Na região de cor roxa estão o gene que confere resistência ao antibiótico Ampicilina. (Informações obtidas no protocolo online promega: <https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>)

Análise das sequências

A análise das sequências será feita utilizando o software *BioEdit Sequence Alignment Editor*, e as representações gráficas das sequências foram confeccionadas no software *GenePalette*. As sequências serão também traduzidas em aminoácidos através do software online *Expasy* (<http://web.expasy.org/translate>).

Postura e fixação dos ovos

Para que fosse realizada a etapa de hibridização *in situ*, foram necessários ovos fixados do inseto, que puderam ser obtidos transferindo até 6g de adultos para potes plásticos (20cm x 14,5cm) com 300 g de farinha de trigo esterilizada, onde os mesmos foram mantidos por duas horas em estufa seca a 30 °C (Incubadora 411D, ethik technology) e aproximadamente 70% umidade relativa. Após este período, os adultos eram retirados utilizando a peneira de 710 µm citada anteriormente e retornavam à colônia. Os ovos eram mantidos em farinha na estufa a 30 °C até que atingissem a idade entre 6 a 10 horas após a postura, quando eram então conduzidos ao processo de fixação, em que o embrião é sacrificado, preservando-se sua estrutura morfológica. O procedimento de fixação dos ovos foi realizado de acordo com van der Zee *et al.* (2005). Os ovos foram lavados em hipoclorito de sódio durante 3 minutos, em 3 placas de petri diferentes (1 minuto por placa), para que fosse retirado o excesso de farinha e a camada mais externa da casca, o exocócion. Os ovos eram então fixados em uma mistura de PBS (solução salina tamponada com fosfato, do inglês *Phosphate-buffered Saline*: NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10mM e KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4), com formaldeído 8% e heptano por uma hora. Em seguida era feita a retirada da fase aquosa (PBS + Formaldeído) e posterior choque térmico com a adição de metanol a -70 °C seguido de agitação do recipiente, que após se assentar, formava novamente uma mistura bifásica. Os ovos que ficassem no fundo do recipiente estariam sem casca, enquanto que os ovos que ficassem entre as duas fases líquidas estariam ainda com suas cascas. Os ovos do fundo do recipiente eram então lavados em metanol e estocados no mesmo a -20 °C.

Hibridização *in situ*

Protocolo adaptado de Kosman *et al.* (2004). Em síntese, o fragmento de DNA de interesse foi amplificado via PCR, utilizando como matéria prima o plasmídeo contendo esse fragmento. Após diversas ciclagens, o material mais abundante era o fragmento de DNA de interesse, restando apenas resquícios do material plasmidial. Depois de amplificado, o fragmento foi purificado e utilizado para a síntese de sondas de RNA, que foram feitas

utilizando enzimas RNA polimerase de vírus (T7 ou Sp6), e como substrato foram utilizados nucleotídeos onde a uracila (U) era marcada com DIG (digoxigenina), que é uma pequena molécula esteroide com alta antigenicidade (capacidade de ser reconhecida por anticorpos), originária das folhas e flores de algumas plantas do gênero *Digitalis*, sendo comumente utilizado como marcador imuno-histoquímico. Foram produzidas sondas senso e anti-senso marcadas com DIG que foram então incubadas com anticorpos anti-DIG associados à fosfatase alcalina, e posteriormente foi feita uma incubação com NBT e BCIP. O BCIP (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*) é um substrato artificial que, quando desfosforilado pela fosfatase alcalina, forma o composto *5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl*, que pode ser oxidado pelo oxigênio atmosférico, e também pelo NBT (*Nitro blue tetrazolium*), formando assim o composto *5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo*, um corante azul escuro) possibilitando a visualização da região onde o RNA mensageiro de interesse está sendo expresso. A sonda anti-senso é um fragmento de RNA cuja sequência é complementar ao mRNA de interesse, sendo assim, a sonda se ligaria ao mRNA e onde este estiver sendo expresso haverá a produção de cor, que poderá ser vista no microscópio. A sonda senso possui a mesma sequência do RNAm, e funcionará como controle negativo, uma vez que a sonda não é complementar àquele RNAm específico, portanto não se hibridizará com o mesmo.

Os embriões previamente fixados foram lavados com etanol por 3 minutos, 4 vezes para a retirada da maior parte do metanol, e então foram incubados em etanol e xileno (1:9) por 1 hora, após esse tempo, serão lavados 2 vezes com etanol e incubados no mesmo por 5 minutos. Posteriormente segue-se com outras duas lavagens, desta vez com metanol, incubação em metanol, e incubação em mistura de metanol e PBTF (Tween-20 0,1% e formaldeído 5% em PBS). Depois de quatro incubações em PBT (PBS com Tween-20 0,1%) seguido de incubação em solução de hibridização (DNA de esperma de salmão 0,1mg/mL, Heparina 0,05mg/mL, Tween 0,1%, Formamida 50%, SSC 5%) e PBT (1:1) por 10 minutos, os embriões foram incubados na mistura de hibridização a 55 °C por 1h, com duas trocas neste intervalo. Ao final deste período, a mistura foi substituída por 100 µL da mesma solução, acrescida de 2 µL da sonda (previamente aquecida a 85 °C por 3 minutos e resfriada no gelo). Foi feita incubação com sonda a 55 °C por 35 horas e após essa incubação remove-se o máximo possível do líquido (solução de hibridização + sonda) e adiciona-se 1 mL de solução de hibridização pré-aquecida a 55 °C sem a sonda e os tubos são mantidos por mais 5 minutos a 55 °C. Feito esse procedimento, os embriões foram incubados por 1 hora em PBT e WBR (Western Blocking Reagent, Roche) (4:1) e em seguida incubados novamente com PBT e WBR (1:1) acrescido de anticorpo anti-DIG *overnight* a 4 °C. No outro dia os embriões

seriam lavados por 10 minutos em PBT, 3 vezes. Posteriormente são feitas 4 lavagens com PBT por 15 minutos cada, e depois mais 3 lavagens em tampão de coloração (MgCl₂ 0,05 M, NaCl 0,1 M, TRIS-HCl 0,1 M e Tween-20 a 0,1%, pH 9,5). Em seguida os ovos foram incubados com solução de coloração contendo BCIP e NTB, a incubação pode demorar de alguns minutos até 4 horas. Feita a coloração, foram feitas 2 lavagens rápidas com PBT, seguido de uma lavagem de 5 minutos com o mesmo, depois mais 5 minutos em etanol, seguido de 8 lavagens com etanol de 7 minutos cada. Após o término das lavagens, é feito o protocolo de marcação nuclear com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e em seguida são montadas as lâminas de microscopia.

A visualização da marcação da hibridização *in situ* será feita em microscopia óptica de campo claro, contraste de fase ou DIC, e para visualização dos núcleos marcados com DAPI foi utilizada a microscopia de fluorescência.

Resultados

Levantamento de dados de Bioinformática

Foi feito um levantamento de dados sobre o gene *grh* de *T. castaneum*, e decidiu-se utilizar a anotação presente na base de dados Ensembl (<https://metazoa.ensembl.org>), identificado como TC004589. Porém, como visto anteriormente por nosso grupo, a anotação gênica adjacente TC004587 também faz parte do gene *grh* (Menezes, 2014). A região correspondente ao Gap 169 que foi sequenciada pela autora, conforme descrito na Introdução, foi analisada e inserida no genoma no presente trabalho. No presente estudo foi então feita uma análise do perfil de expressão gênica do besouro, utilizando os dados de *tiling array* do BeetleBase, a fim de averiguar quais regiões adjacentes à TC004587 e TC004589 tinham um perfil de expressão parecido com as mesmas, a fim de descobrir a verdadeira extensão de *grh*. Foram feitas então comparações entre as regiões próximas, TC004586, TC004588 e TC004590 com sequências de outros animais, por meio da ferramenta BLAST do NCBI para que pudesse ser visto a semelhança das mesmas com genes *grh* desses animais. Foi então realizado um Blastx não redundante para a região anteriormente conhecida como TC004588 contra todo o banco de dados do NCBI. (Figuras 12 e 13). A primeira proteína de outro animal a ser identificada foi uma das isoformas de Ghr do inseto *Anoplophora glabripennis*, também conhecido como besouro asiático, possuindo 82% de identidade e 83% de

similaridade com a proteína de TC004588 (Fig. 13). Concluiu-se então que essa região fazia parte do corpo do gene *grh*.

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: protein grainyhead isoform X2 [Anoplophora glabripennis]	59	159	72%	1e-42	82%	XP_018569598.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: protein grainyhead isoform X1 [Anoplophora glabripennis]	59	159	72%	1e-42	82%	XP_018569588.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: protein grainyhead-like isoform X1 [Aethina tumida]	59	159	72%	2e-42	79%	XP_019881683.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: protein grainyhead-like isoform X2 [Aethina tumida]	59	159	72%	2e-42	79%	XP_019881685.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: protein grainyhead isoform X3 [Anoplophora glabripennis]	59	159	72%	2e-42	82%	XP_018569602.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: protein grainyhead-like isoform X3 [Aethina tumida]	58	158	72%	2e-42	79%	XP_019881686.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: protein grainyhead isoform X1 [Dendroctonus ponderosae]	52	152	72%	3e-40	77%	XP_019765335.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: protein grainyhead isoform X2 [Dendroctonus ponderosae]	52	152	72%	4e-40	77%	XP_019765337.1

Figura 12: BLASTx da região genômica TC004588 contra todos os bancos de dados não redundantes.

PREDICTED: protein grainyhead isoform X2 [Anoplophora glabripennis]
 Sequence ID: [XP_018569598.1](#) Length: 878 Number of Matches: 1

Range 1: 72 to 174 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
159 bits(402)	1e-42	Compositional matrix adjust.	85/104(82%)	87/104(83%)	6/104(5%)	+1
Query 82	ASSQAGGILTSQKATNGLVSGAGLELPTPP-----QLSSQDWQGLFINQHVGYPOAAAS				246	
Sbjct 72	ASSQAGGILTSQKATNGLVSGA LELPTPP QLSSQD QGLFINQH GY Q AAS					
	ASSQAGGILTSQKATNGLVSGAALELPTPLSSAGQLSSQDLQGLFINQH-GYAQPAAS				130	
Query 247	AQN FQLVKREPEDLSHHRKLDCCSSPSSVSLDGA IINTKQQRHKV		378			
Sbjct 131	QN Q+VKREPEDLSHHRKLDCCSSPSS SLDG+II KQ R KV					
	GQNLQIVKREPEDLSHHRKLDCCSSPSSGSLDGSIIIPKQSRKV		174			

Figura 13: Alinhamento da sequência de aminoácidos traduzida de TC004588 contra a isoforma X2 da proteína grainyhead de *Anoplophora glabripennis*.

A extensão do gene ficou estabelecida como iniciando em TC004587, passando por TC004588 e finalizando em TC004589, visto que as regiões TC004586 e TC004590 não mostraram semelhanças com *grh*. A estrutura gênica após a inclusão do Gap 169 e determinação dos verdadeiros limites gênicos (TC004587, TC004588 e TC004589) se encontram na Figura 12. Daqui em diante a região contida entre TC004587 e TC004589 será denominada "*Tc-grh* completo"

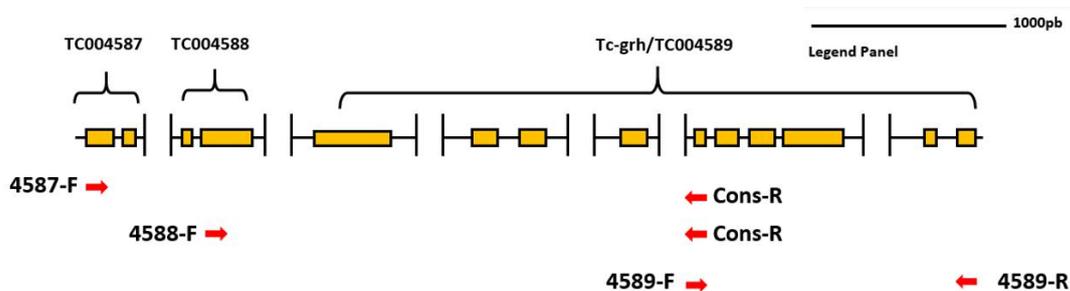


Figura 15: Representação gráfica das regiões amplificadas por cada par de primers. As setas em vermelho representam a região de anelamento dos *primers*, onde as setas apontando para a direita são os *primers forward* e as setas apontando para a esquerda são os *primers reverse*. A região a ser amplificada é a região que se localiza entre os *primers forward* e *reverse*. A abreviação “Cons” Significa que um dos *primers* está ancorado na região conservada mostrada na Figura 12. O *primer* 4589-F também se encontra ancorado na região conservada, porém não apresenta a mesma sequência do *primer* Cons-R.

Expressão das diferentes regiões de *Tc-grh* ao longo da embriogênese

Os *primers* foram usados na realização de RT-PCR conforme descrito na metodologia. A Figura 14 mostra o resultado do perfil de expressão que corresponde aos *primers* desenhados para a região que compreende da região TC004587 até a região conservada. Existe expressão dessa região do gene *Tc-grh* em todos os momentos analisados, embora o perfil das bandas varie de acordo com o momento da embriogênese. O aparecimento de duas bandas no gel significa que existem amplicons de tamanhos diferentes sendo produzidos sugerindo que pode estar ocorrendo *splicing* alternativo desse gene. Já as bandas referentes à região TC004588-Cons (Figura 15), também mostraram perfis variados em todos os momentos da embriogênese e também apresentou o mesmo padrão de bandas duplas, indicando a ocorrência de *splicing* alternativo. O resultado do RT-PCR realizado com os *primers* ancorados na região TC004589-Cons (Figura 16) indica que a região pode ser de fato constitutiva, uma vez que é observada expressão em todos os tempos observados.

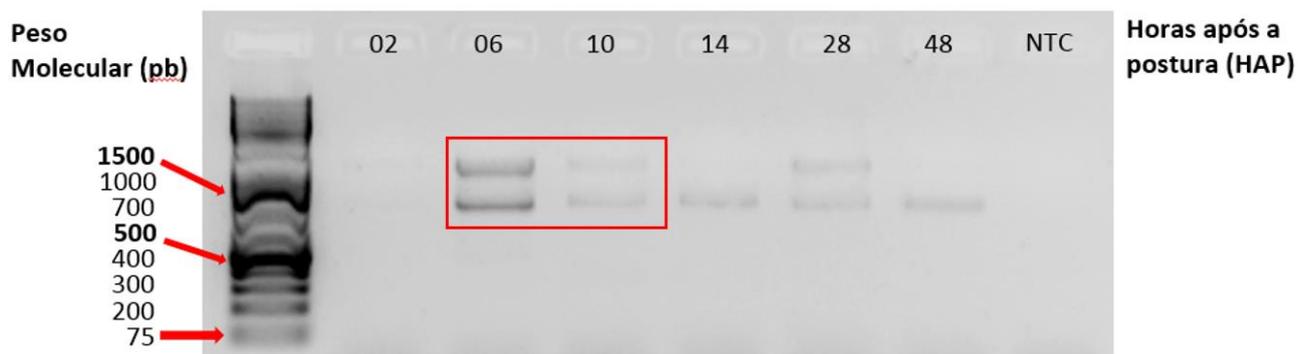


Figura 16: Perfil de expressão da região TC004587-Cons nos períodos embrionários entre 02 e 48 horas após a oviposição. O peso molecular é mostrado em pares de bases no poço mais à esquerda. O último poço representa o controle negativo NTC (*Non-template control*), que é um poço onde não foi adicionado nenhum DNA. As bandas amplificadas possuem aproximadamente 1500 e 2000 pb e a caixa vermelha destaca as bandas selecionadas para avançar para as próximas etapas.

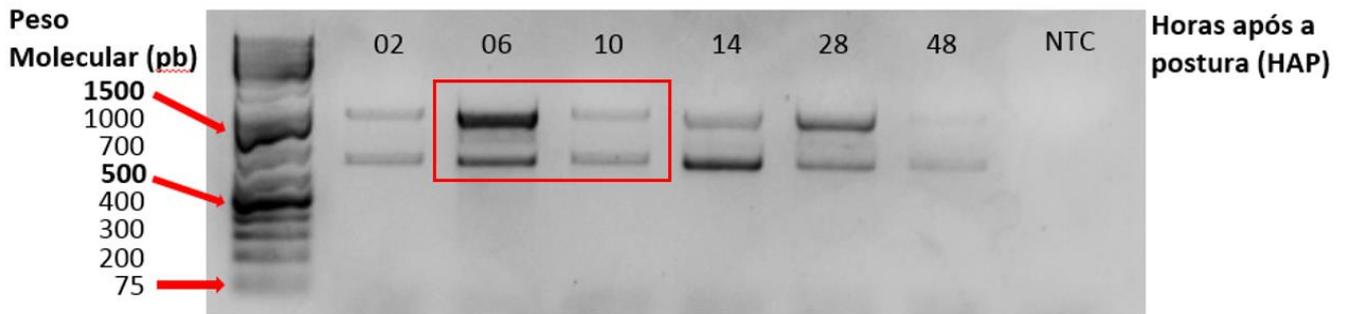


Figura 17: Perfil de expressão da região TC004588-Cons nos períodos embrionários entre 02 e 48 horas após a oviposição. Peso molecular é mostrado em pares de bases. O último poço representa o controle negativo NTC. As bandas amplificadas possuem aproximadamente 1000 e 1500 pb e a caixa vermelha destaca as bandas selecionadas para avançar para as próximas etapas.

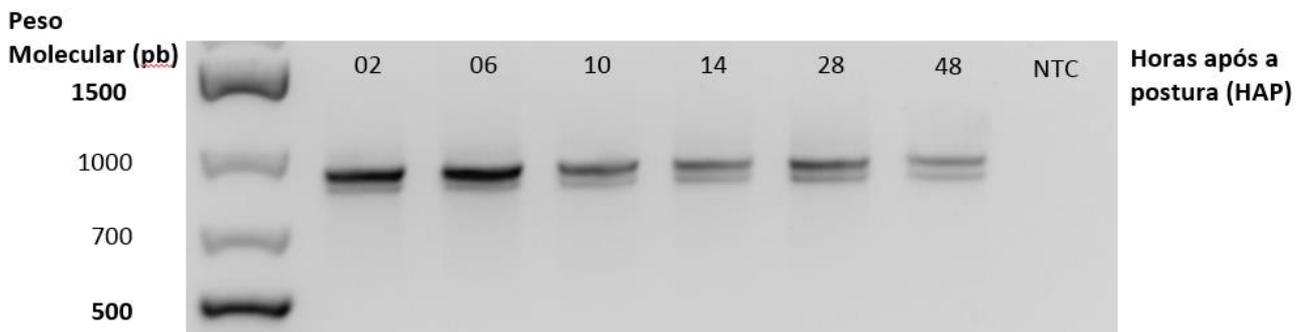


Figura 18: Perfil de expressão da região TC004589-Cons nos períodos embrionários de 02 e 48 horas após a oviposição. Peso molecular é mostrado em pares de bases. O último poço representa o controle negativo NTC. As bandas amplificadas possuem cerca de 1000 pb.

Como o interesse do trabalho é a cutícula serosa, que de acordo com Menezes (2014) é sintetizada em torno de 14 HAP (horas após a postura), foram escolhidos para análises mais profundas, material genético de embriões cujo tempo de vida seja anterior a 14 HAP, os embriões 06 e 10 HAP, conforme hipótese apresentada na Figura 10. Os amplicons selecionados para serem sequenciados foram os obtidos nos RT-PCRs realizados envolvendo as regiões TC004587 e TC004588 (Figuras 14 e 15, indicados pelas caixas vermelhas), totalizando 4 amostras: TC004587 com 6 e 10 horas, e TC004588 com 6 e 10 horas.

Purificação dos amplicons obtidos.

Posteriormente esses mesmos materiais genéticos foram utilizados novamente em reações de PCR de maior volume (100 μ L) a serem utilizadas nas próximas etapas. Essas amostras apresentaram, cada uma, três bandas no gel (Figura 17), totalizando 12 amplicons. Na etapa seguinte as amostras foram purificadas e um novo gel foi feito (Figura 18). A banda do meio de cada amostra não apresentou bons resultados, já que essas bandas se abriram em diversas outras, sugerindo haver diversos amplicons de tamanhos diferentes e por isso, foram descartadas. Sobraram então 2 bandas de cada amostra, totalizando 8 amostras.

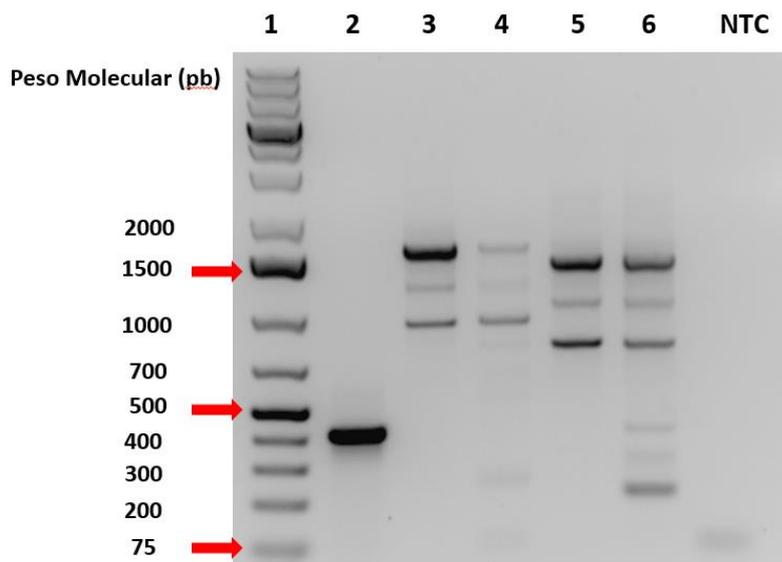


Figura 19: Gel dos amplicons a serem purificados. Relação de poços e conteúdo: 1 – padrão de peso, 2 a 6: produtos de RT-PCR, a saber: 2 – Controle Positivo (RPS6), 3 e 4: – amplicons da região TC004587-Cons com cDNA de embriões de 06 HAP (poço 3) e com cDNA de embriões de 10HAP (poço 4), 5 e 6: – amplicons da região TC004588-Cons com cDNA de embriões 06 HAP (poço 5) e com cDNA de embriões de 10HAP (poço 6). NTC: *non template control*.

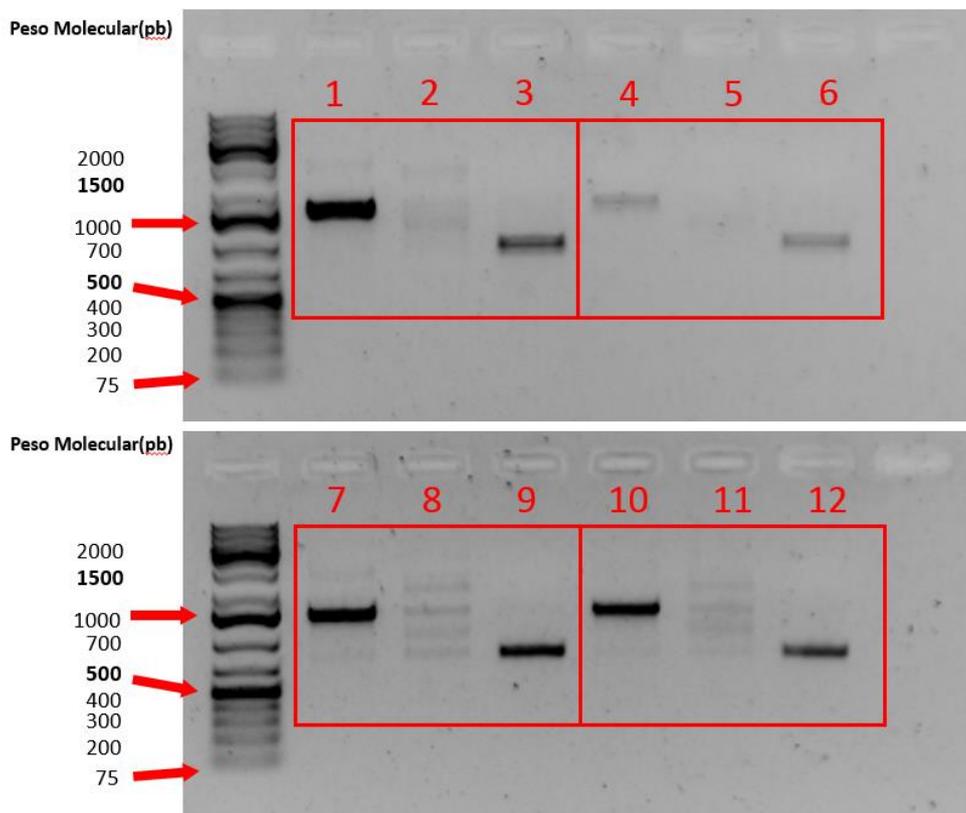


Figura 20: Géis após a purificação dos amplicons selecionados. As bandas numeradas de 1 a 6 são referentes à amplicons da região TC004587-Cons (1 a 3 de 6 HAP; 4 a 6 de 10 HAP) e as bandas de 7 a 12 são referentes à amplicons da região TC004588-Cons (7 a 9 de 6 HAP; 10 a 12 de 10 HAP). As bandas 2, 5, 8 e 11 não apresentaram um resultado satisfatório, uma vez que se abriram em diversas bandas e por isso foram desconsideradas. O padrão de peso molecular é mostrado em pares de bases. Após a purificação então, obteve-se 8 amostras no total (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12) que seguiram para sequenciamento.

Transformação bacteriana

As 8 amostras foram então ligadas em plasmídeos, introduzidas em células *E. coli* DH5 α competentes, crescidas em meio seletivo e posteriormente seus plasmídeos foram extraídos e purificados e seguiram para o sequenciamento conforme metodologia descrita. Da placa de cada uma das 8 amostras, foram selecionadas três colônias bacterianas, nomeadas com a numeração de 1 a 8, de acordo com qual amostra gerou a colônia, e de A a C, de acordo com cada colônia, obtendo assim 24 colônias (*i.e.* 1A, 1B, 1C até 8A, 8B e 8C), como mostrado abaixo (Figura 19).

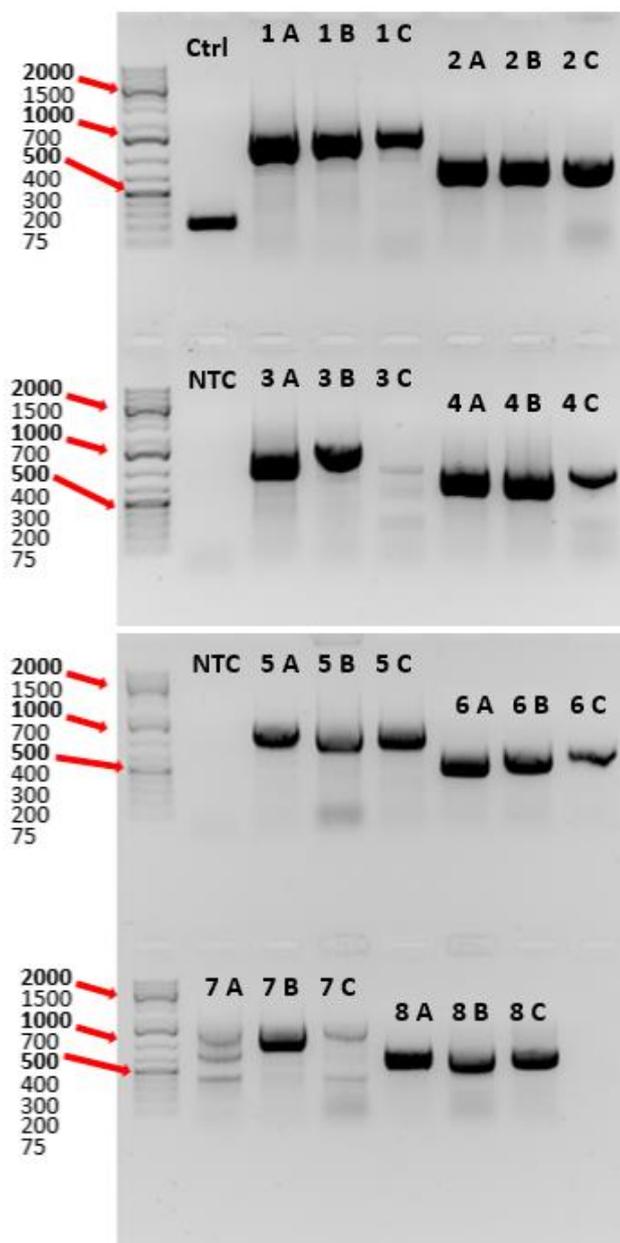


Figura 21: Géis dos PCRs de colônia. São mostradas todas as 24 colônias geradas a partir das 8 amostras purificadas anteriormente, juntamente com o controle positivo do PCR (Ctrl Pos., onde foi utilizado o gene constitutivo *Tc-Rps6*) e os controles negativos de cada gel (NTC).

Das três colônias obtidas de cada uma das 8 amostras, seriam escolhidas duas para o sequenciamento, o que resultaria num total de 16 colônias. Porém, das três colônias geradas a partir da amostra 7, duas (7A e 7C) apresentaram diversas bandas e por isso escolhemos seguir somente com a amostra 7B, chegando a um total de 15 colônias sequenciadas. De cada colônia, foram gerados dois sequenciamentos, uma com o *primer* M13 *forward* e outro com o *primer* M13 *reverse*. O sequenciamento do clone obtido da colônia 1C não funcionou, e, portanto, ficamos com apenas 14 clones que foram sequenciados com sucesso.

Análise do sequenciamento

A análise das sequências apontou a presença de 7 formas de *splicing* alternativo de *Tc-grh*. Os diferentes *splices* foram alinhados e comparados e uma representação esquemática dos mesmos encontra-se na Figura 20. Os quatro exons mais 3' são comuns as sete isoformas encontradas. Já os exons mais 5' variam bastante entre as isoformas. Inclusive a região mais 5' de todas as isoformas sequenciadas não condiz com a predição de exons encontrada no Ensembl e BeetleBase.

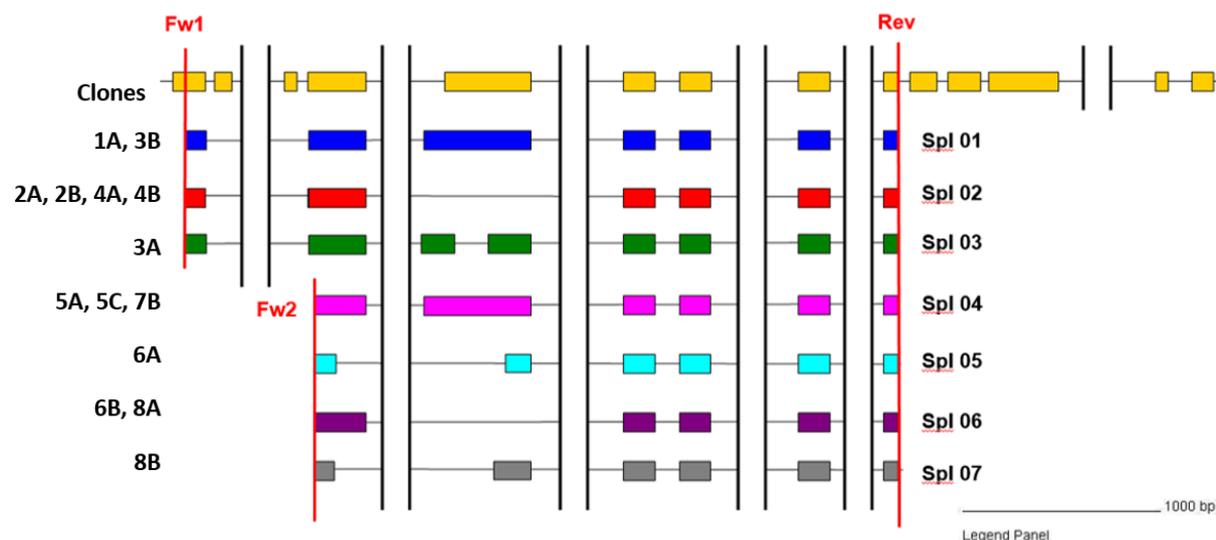


Figura 22: Representação gráfica dos diferentes splices de *Tc-grh* (Spl 01 – 07). Nesse esquema são mostrados diferentes splices de *Tc-grh*, cada um com uma cor diferente. Os retângulos indicam os exons, linhas horizontais e verticais representam, respectivamente, regiões intrônicas e cortes nessas regiões. Em amarelo são representados os exons para a região "*Tc-grh* completo" descrita no Ensembl. Fw1, Fw2 e Rev representam, respectivamente, a região dos *primers* 4587-F, 4588-F e Cons-R (vide Tabela 1). Os clones que geraram cada sequência se encontram sinalizados à esquerda. Essa representação gráfica foi feita com auxílio dos programas *GenePalette* e *Microsoft Powerpoint 2013* a partir dos alinhamentos obtidos com a extensão do *Clustal W* dentro do programa *Bioedit*.

Após análises das diferentes isoformas de *Tc-grh*, deduziu-se que as formas Spl 01 e Spl 04 provavelmente representam o mesmo *splice*, sendo que o que muda é apenas o *primer* que os limita a 5' (Fw1 e Fw2). O mesmo acontece com as formas Spl 02 e Spl 06.

A partir das sequências das cinco formas de *splices* não redundantes (*i.e.* Spl 03; Spl 04; Spl 05; Spl 06 e Spl 07) foi calculada a frequência de cada *splice*, dentro dos 14 clones sequenciados. Na Figura 21 estão indicadas essas frequências. As formas Spl 01 e Spl 02 foram então removidas do esquema e suas frequências foram somadas a seus equivalentes (Spl 04 e Spl 06, respectivamente). Dentre todas as encontradas, as formas Spl 01 + 04 e Spl 02 + 06 possuem percentuais de frequência bem acima das demais: 36 e 43%, respectivamente. É interessante notar que essas formas têm uma diferença marcante: a presença ou ausência de um grande exon de 663 pares de bases, denominado pelo grupo de “Exon novo” (Figura 21). Parte do “exon novo” pertence ao Gap169, região não sequenciada no genoma de *T. castaneum* (vide Figuras 9 e 14).

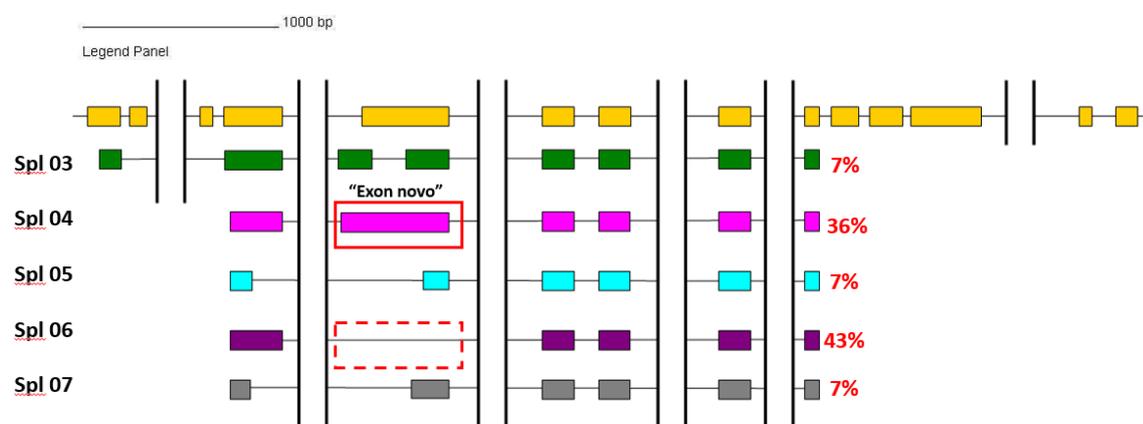


Figura 23: Representação gráfica dos splices 03 – 07. Splices 01 e 02 foram removidos por se tratarem de formas repetidas (Spl 01 = Spl 04 / Spl 02 = Spl 06). A direita dos *splices* são mostrados em vermelho os percentuais de frequência dentre todos os clones analisados. No Spl 04 em caixa vermelha está destacado o “Exon novo” e a ausência do mesmo também está destacada, no Spl 06. A barra em amarelo representa a região genômica de *grainyhead* com os éxons deduzidos no Ensembl; parte do “exon novo” está contida na região Gap169, não sequenciada no genoma (vide texto principal e Figuras 9 e 14).

A dedução dos aminoácidos referentes ao sequenciamento das diferentes isoformas de *Tc-grh* encontram-se na Figura 24.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
|       |       |       |       |       |       |       |       |
QLKATNGLVSGAGLELPTPPQLSSQDWQGLFINQHVGYPQAAASAQNFQLVKREPEDLSHHRKLDCCSPSSVSLDGAIINTKQQRHKVVLVSSAGGQHG
110     120     130     140     150     160     170     180     190     100
|       |       |       |       |       |       |       |       |
LVVDVNSVKDENNPRLNSPQHGRSVNATPTSQHSHELLADGSNTGPIEFISSDGIKPAMYATQMFAAMTNNHGSGTSPSTPYSNIVTGTTCGAG
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
|       |       |       |       |       |       |       |       |
FAASRTATSAAPVSDPYRYEYFTVAGGGATPEPAYEQQLPQSDAYS EEVGGGTTASFVERYVVRQPYHSGKGVIAAATAAGLTVDLPSFDSGIGADAITP

```

```

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
RDONTLQQNYEYPEICPNPNILDPLTISQRNSSSSQSPGSQSTSRSRPWHDFGRQNDADKIQIPKIFSPVGFYKQLETPISTSORREDDRITYINKGQFY

      410      420      430      440      450      460      470      480      488
      |      |      |      |      |      |      |      |      |
GITLDYIPDPDKQLKSQTIVKSIIVMLMFREEKSPEDIKAWQFWHGRQHSVKQRILDADTRNSVGLVGCIEEVAHNAVAIYWNPLESPA

```

Figura 24: Sequência parcial de aminoácidos de Tc-grh, obtida experimentalmente. A sequência de aminoácidos do splice Spl 04 é mostrada como base, comparada com as demais isoformas presentes na Figura 21. Os resíduos de aminoácido com fundo cinza são a região do “exon novo” encontrada no Spl 04 e ausente do Spl 06. As letras em amarelo representam os aminoácidos ausentes no Spl 03. As letras em vermelho representam os resíduos presentes no Spl 07 e os resíduos sublinhados são os presentes no Spl 05.

Na figura abaixo (Fig 23) é mostrado um alinhamento entre as sequencias deduzidas de resíduos de aminoácidos de *Grh* de *D. melanogaster* (isoforma RJ), de *A. gambiae* (isoforma PA) e de *T. castaneum*. As sequencias de *D. melanogaster* e *A. gambiae* foram obtidas no *Ensembl*, enquanto a de *T. castaneum* foi deduzida a partir do sequenciamento dos nucleotídeos da isoforma Spl 01(vide Figura 20-22), combinada com as extremidades 3' e 5' não sequenciadas, deduzidas a partir dos dados genômicos presentes no *Ensembl*.

```

Ag      -----MSASPEMHHQHQLQOE-----
Dm      MSTSTATTSSVITSNELSLSGHAHGHHGHAHQHQLHQTHTSRLGVGVGVGILSDASLSPIQQGS
Tc      -----

Ag      -----ANAPLEMKSNSAEGTPPPPELATMTTVSVLDLHKDYNGGGGGGGG
Dm      GGHSGGGNTNS SPLAPNGVPLLTMRSPDSPQPELATMTNVNVLDLHTDN-----
Tc      -----

Ag      GTAESGATAGAVTSPHIVHEGATDMSLPDDGTTEKVYDKDTNTVYVYTTAAGV-----A
Dm      -----SKLYDKEA--VFYIYETPKVVM PADGGG
Tc      -----

Ag      GHKLVVNPHHQLTITIVHGGQQQQQQQQQQQQQQQQMASPDQLHPSEHHAVAEQNL LHA
Dm      GNSD-EGHAIDARIAAQMGNAQQQQQQQQQTEHQPLAKIE-FDENQIIRVVGPNGEQQ
Tc      -----

Ag      RLIOQQQAVEEQQQQQQQQQQQH-LQRM-----SPGDPH-----QQHHQQ
Dm      QIISREIINGEHHILSRNEAGEHILTRIVSDPSK LMPNDNAVATAMYNQAQKMNNDHGQA
Tc      -----MAELPEGAAPPE-----
          : * :

Ag      HSQVHP-----DDSGIIDGHRLLPATI---NGT-----DASDPQ
Dm      VYQTSPLP-LDASVLHYSGGNDNSVIKTEADIYEDHKKHAAAAAAGGGSIIYTTSDPN
Tc      --DQHPLTAATTAMLNISGGAEDQST-AMGLIYEYK-----FQPIS
          : * : : :

Ag      QHQQQQHHHLGR LSPEDQQQQQAHQQGGVRLLED SHIQRL LGN--QEI-----ISRDI
Dm      GVN VKQLPHLTVPQKLD-----PDLYQA-DKHIDLIYNDGSKTVIYSTTDQKSLEI
Tc      GESKDKL-----ADIWFFLNKLFEFFLPVRVEGVAM-----SKWGL
          . : . : . : . : . :

Ag      ING-EHHIITR NENGETILTRIAISTADQLNRM DNGI IYTTTGGSTG-----VIG
Dm      YSGGDIG-----S---LVS-----DGQVVVQAGLPYATTTGAGGQPVIYVADGALP
Tc      KIGGRA-MNERNE---WVR-----VLAVVISGRMRYVTL CARASS---QAGGILT
          * . : . : * . :

Ag      AGPQEQ-----LPT-----T---VLQYEKDVED--
Dm      AGVEEHLQSGKLNQQTPI-DVSGLSQNEIQGFLLGSHPS SATVSTTG VVSTTTISHHQ
Tc      SQLK--ATNGLVSGAGLELPTPPQLSSQDWQGLFINQHVGY PQA-----
          : : :

Ag      --KHQPQQQQQQHHGHAAHQPTIYATAGAAP-----
Dm      QQQQQQQQQQQQQQQHQQQQHPGDIVSAAGVSTGSI VSSAAQQQQQQQLISIKREPE
Tc      -----AASAQNFQLVKREPE

Ag      -----DQTGQTKQIV-YALGGGEPKNVIYGDPKAAM-----
Dm      DLRKDPKNGNIAGAATANGPGSVITQK-----I-----LHVDAPTASEA-----
Tc      DLSHHRKLD C S S P S - S V S L D G A I N T K Q R H K VVLVSSAGGQHGD L V V D V N S V K D E N N P R
          . : . : . : . :

```

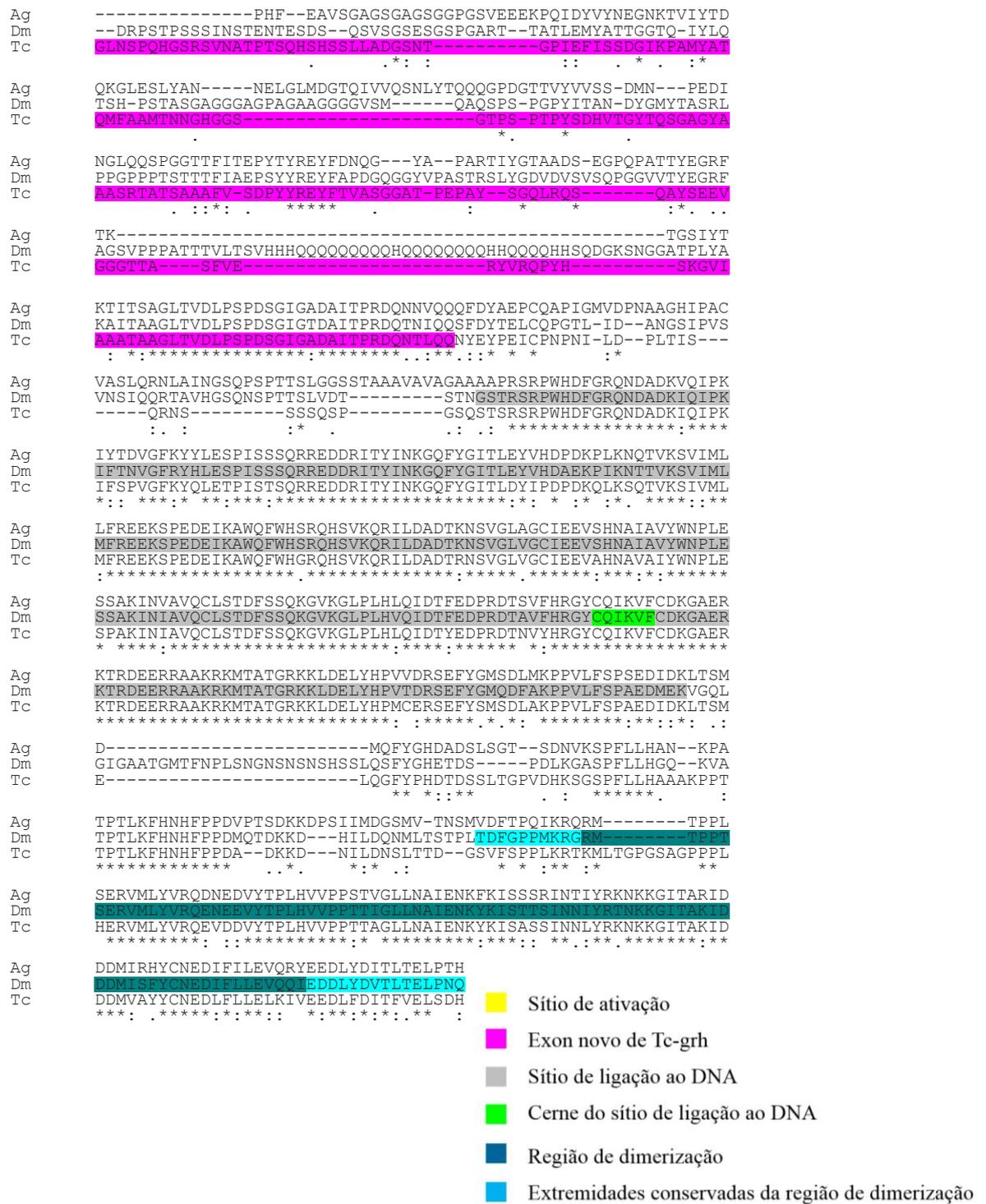


Figura 25: Alinhamento entre as sequências das proteínas deduzidas de grainyhead de *A. gambiae*, *D. melanogaster* e *T. castaneum*. Foram utilizadas as maiores isoformas de Grh de *D. melanogaster* e *A. gambiae*. A sequência de Tc-Grh mostrada é a do Splice 01 adicionada das regiões mais extremas do gene *Tc-grh* que não foram amplificadas pelos primers que utilizamos. Essas regiões estão sublinhadas e foram retiradas da sequência anotada no *Ensembl*. Abaixo dos aminoácidos o ponto (.), os dois pontos (:), e o asterisco (*) significam, respectivamente, aminoácidos conservados, altamente conservados e idênticos. O Splice 01 de *Tc-grh* foi traduzido utilizando o software ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) e as proteínas foram alinhadas com a ferramenta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Hibridização *in situ*

Devido à grande diferença no percentual de representatividade dos *splices* Spl 04 e Spl 06 em relação às outras formas analisadas, resolvemos seguir para a etapa de hibridização *in situ* com essas duas isoformas de *Tc-grh*. Para uma melhor comparação dos resultados de duas hibridizações *in situ* oriundas de sondas diferentes é pertinente que as sondas sejam de tamanhos próximos. As formas Spl 04 e 06 possuem tamanhos de 1464 e 801 pares de bases, respectivamente. Para que pudéssemos ter moldes com tamanhos aproximados, foi feito um PCR a partir do plasmídeo contendo o splice Spl 04, de forma que uma região amplificada de 660 pares de base incluísse o “Exon novo” (Figura 24), mas excluísse uma parte da região mais conservada, a fim de se aproximar do tamanho do Spl 06.

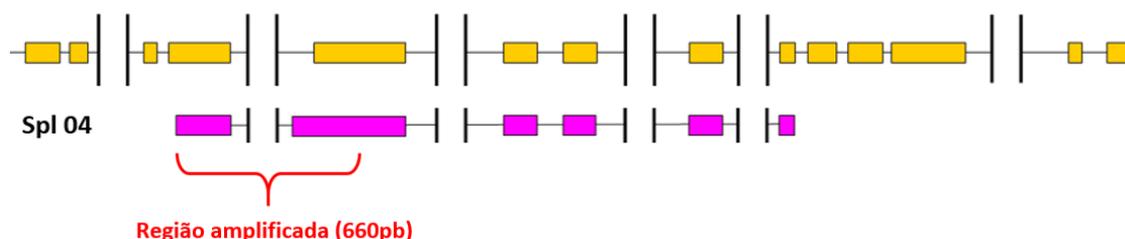


Figura 26: Representação gráfica da região amplificada dentro de Spl 04. A região indicada pelo colchete foi amplificada por PCR incluindo boa parte do “Exon novo”. Os *primers* utilizados foram MC9-F e MC9-R indicados na metodologia.

O produto do PCR com essa versão menor de Spl 04 foi purificado e sequenciado e foi confirmado o fragmento de 660 pares de bases esperado. Foram então sintetizadas sondas para o Spl 06 (801pb) e para a versão reduzida de Spl 04 (660pb). Obtiveram-se também ovos fixados cujas idades foram escolhidas para que melhor fosse vista a separação entre as células da serosa e as células do embrião. Os experimentos de hibridização *in situ* utilizaram três diferentes sondas.

A primeira é para *Tc-Zen-1* (Figura 25), empregada como controle positivo, uma vez que já é conhecido que a sua expressão ocorre apenas nas células da serosa (van der Zee *et al.*, 2005). A sonda senso para *Tc-Zen-1* não mostrou nenhum tipo de marcação (Fig 25 A), embora algumas vezes haja uma marcação difusa (Fig 25 B). Já a sonda anti-senso mostra claramente o padrão de expressão exclusiva nas células da serosa e ausência de marcação em células embrionárias (Fig 25 C).

A segunda sonda é para *Tc-grh* Spl 06 (Figura 26). A sonda senso apresentou marcação bem fraca no embrião e nenhuma marcação nas células da serosa, tanto em

embriões precoces (Fig 26 A), quanto em embriões em estágio um pouco mais avançado (Fig 26 B); vide Figura 03. Já com a sonda anti-senso observa-se uma marcação possivelmente específica nas células do embrião, mas não em células da serosa, tanto em estágios mais novos (Fig 26 C), quanto em estágios mais avançados (Fig 26 D).

A terceira sonda é para a versão reduzida do *Tc-grh Spl 04* (Figura 27). A sonda senso apresentou marcação bem definida em células embrionárias, mas não da serosa, podendo ser tanto em embriões mais novos (Fig 27 A) quanto em embriões um pouco mais tardios (Fig 27 B). Já os ovos tratados com a sonda anti-senso apresentaram uma marcação bem fraca e dispersa, também tanto em ovos mais novos (Fig 27 C), quanto mais velhos (Fig 27 D).

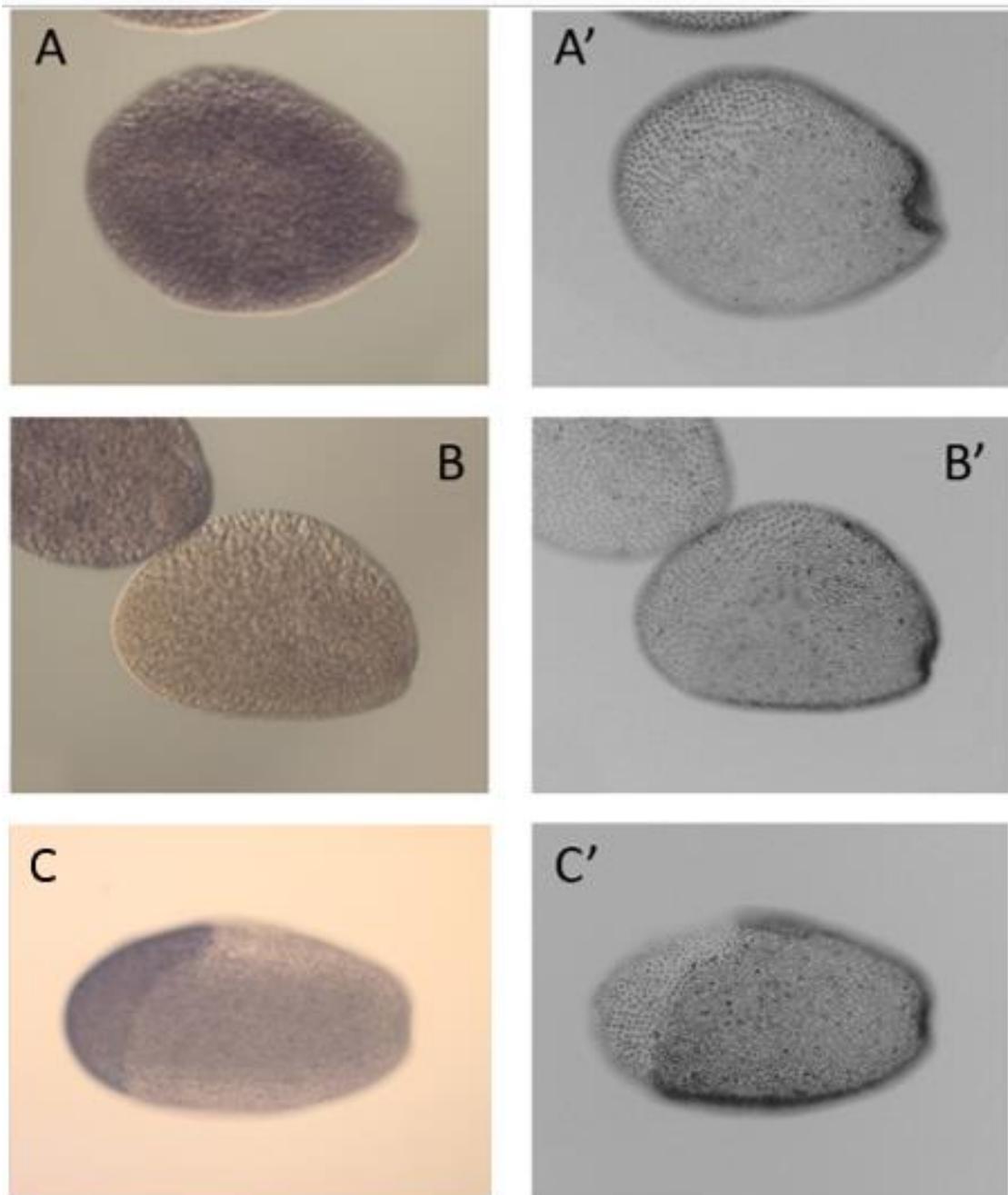


Figura 27: Hibridizações in situ com embriões de *T. castaneum* entre 9 e 15 horas após a postura (HAP) para *Tc-Zen-1*. A, A', B, B': embrião marcado com sondas senso. C, C': embrião marcado com sonda anti-senso. A, B, C: microscopia DIC. A', B', C' microscopia de fluorescência com marcador de núcleos (DAPI). 35

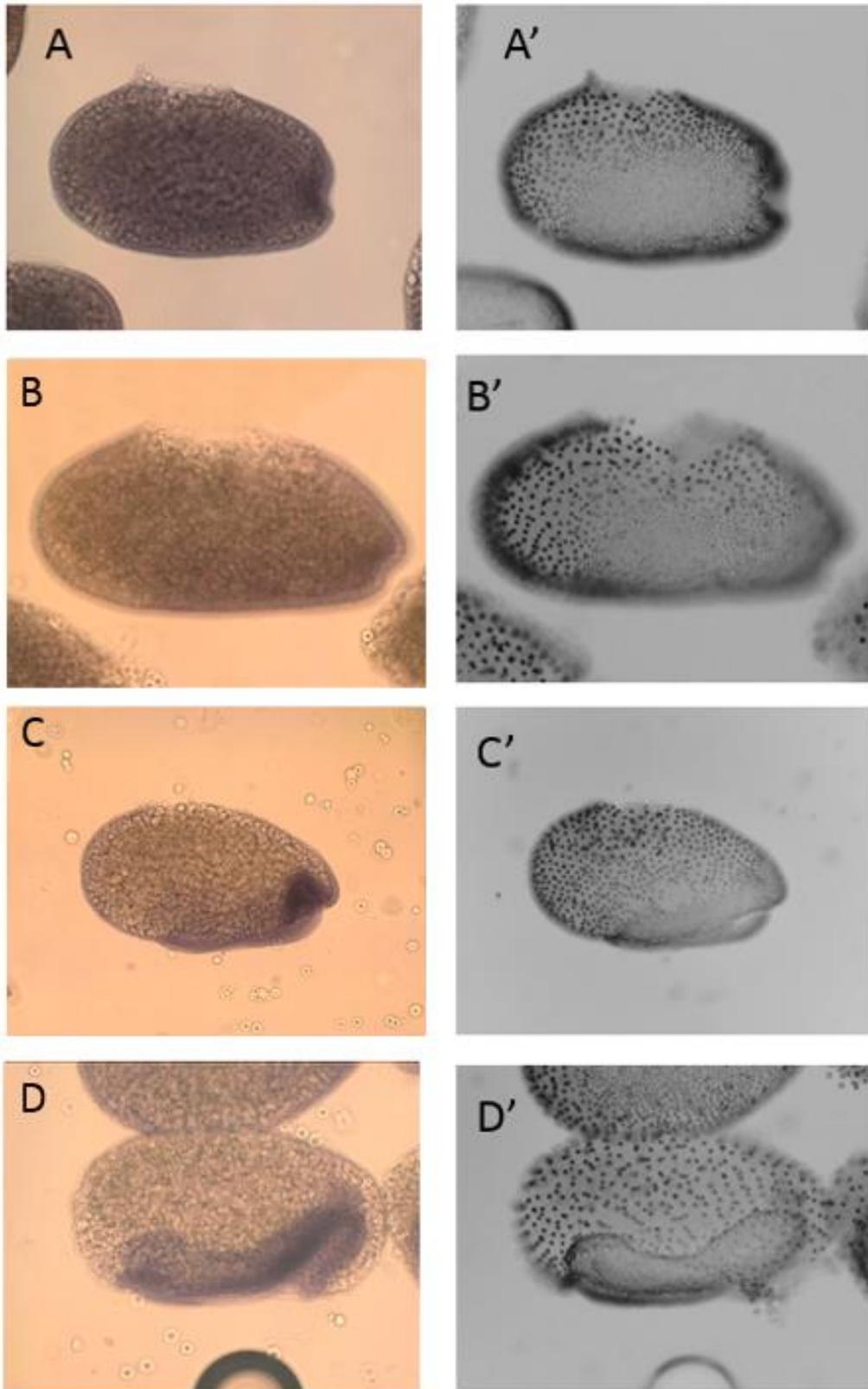


Figura 28: Hibridizações in situ com embriões de *T. castaneum* entre 9 e 15 horas após a postura (HAP) para *Spl 06*. A, A', B, B': embrião marcado com sondas senso. C, C', D, D': embriões marcados com sonda anti-senso. A, B, C, D: microscopia DIC. A', B', C', D' microscopia de fluorescência com marcador de núcleos (DAPI).

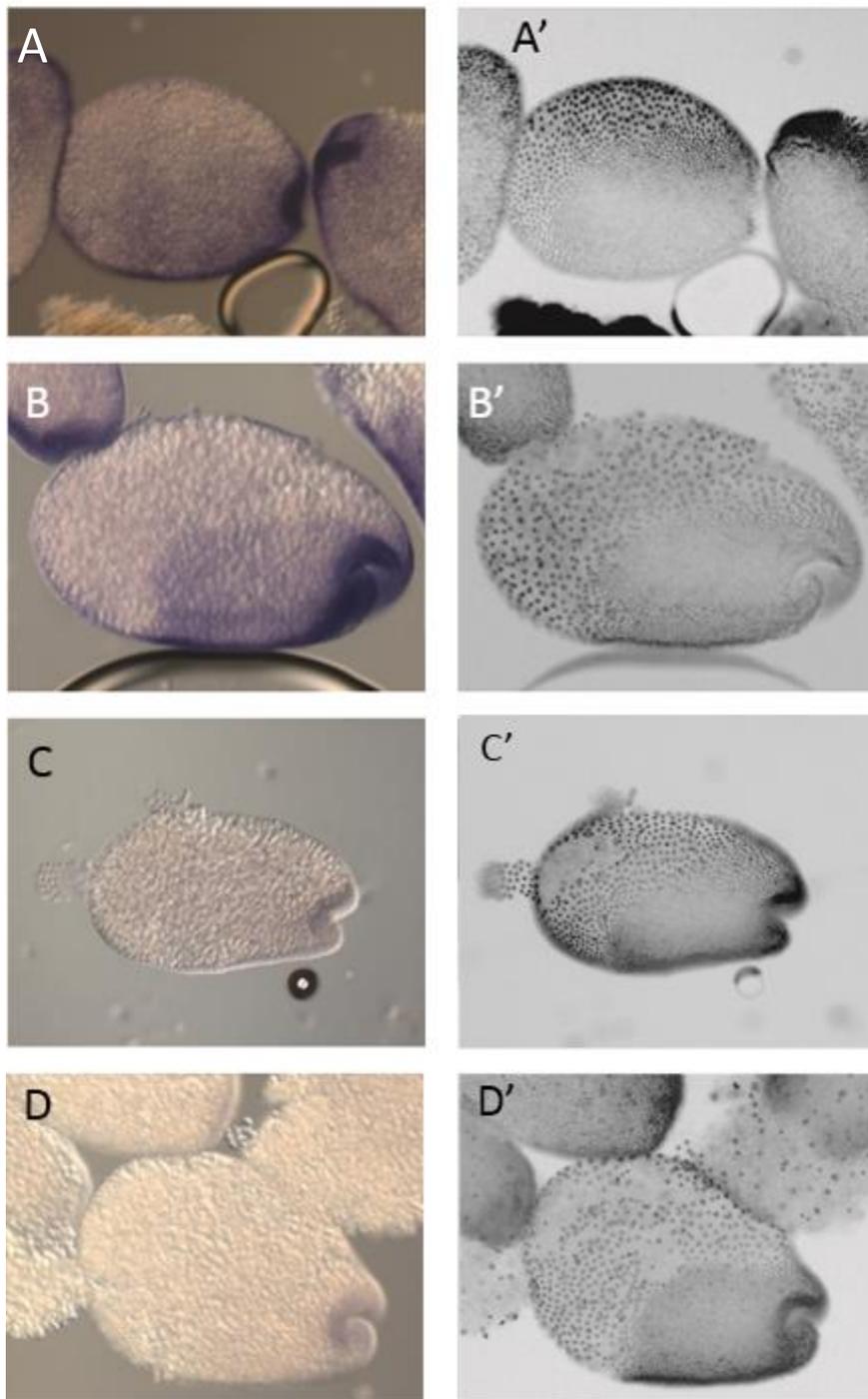


Figura 29: Hibridizações *in situ* com embriões de *T. castaneum* entre 9 e 15 horas após a postura (HAP) para a porção de Spl 04. A, A', B, B': embrião marcado com sondas senso. C, C', D, D': embriões marcados com sonda anti-senso. A, B, C, D: microscopia DIC. A', B', C', D' microscopia de fluorescência com marcador de núcleos (DAPI).

Discussão

O presente estudo teve como objetivo estudar a respeito do gene *grh* do besouro *T. castaneum*, e seu possível papel na síntese da cutícula serosa desse inseto. A própria estrutura desse gene no besouro *T. castaneum* não era bem descrita nos bancos de dados BeetleBase e Ensembl, uma vez que foi visto anteriormente pelo nosso grupo (Menezes 2014) e no presente trabalho que a verdadeira extensão do gene de *grh* em *T. castaneum* se estende além da estrutura mostrada em ambos os bancos de dados. Esses bancos de dados também mostram uma região não sequenciada (Gap 169) cujo tamanho real, de 195 pares de bases, foi elucidado também por nossa equipe. Além disso o presente estudo mostra na figura 20, que, tanto o segundo quanto o terceiro exon anotados na base de dados *Ensembl* (barras amarelas) na verdade não são exons e sim introns.

Após a elucidação da real extensão de *grainyhead*, foram determinados sítios para a confecção de *primers*, a fim de analisar o nível de expressão do gene em diferentes tempos de embriogênese de *T. castaneum*. Na maioria dos resultados dos RT-PCRs, foi observado o aparecimento de mais de uma banda amplificada pelo mesmo par de *primers*, no mesmo tempo de embriogênese, e em diversas regiões do gene, o que indica a ocorrência de *splicing* alternativo. Além disso, foram observados diferentes níveis de expressão em diferentes tempos de embriogênese, outro fator que indica, além da ocorrência de *splicing* alternativo, que o gene está atuando em intensidades e momentos diferentes. A ocorrência de diversas formas de *splicing* foi confirmada após sequenciamento dos diferentes *amplicons* obtidos.

Os tempos de embriogênese escolhidos para a realização da clonagem e sequenciamento para as subseqüentes etapas do projeto foram de seis e dez horas após a postura (HAP), por serem idades anteriores à secreção da cutícula serosa, que ocorre em torno de 15 HAP (Menezes 2014), para que pudéssemos avaliar o possível papel de Grh nessa secreção. Também foram analisados embriões com 2 HAP, idade bem anterior à secreção cutícula serosa. Com 2 HAP também ocorre a expressão de *grh*, porém nessa idade, o material genético que está sendo utilizado para tradução provavelmente ainda é o material genético materno depositado durante a ovogênese. O material genético materno atua majoritariamente dentro do ovo até o momento da transição materno-zigótica, que é quando o material genético do próprio embrião passa a regular seu próprio desenvolvimento (Ribeiro, comunicação pessoal).

Após a realização do sequenciamento foi observado um grande "exon novo" de 709 pares de bases que se encontra total ou parcialmente presente em algumas isoformas, e completamente ausente em outras. A região do "exon novo" é a única que apresenta

mudanças reais quando comparadas todas as isoformas encontradas, por isso pode ser que a presença ou ausência de exons situados nessa região seria um fator determinante para o momento e forma de atuação do gene. Além disso, esse exon se situa na porção mais 5' (região N-terminal da proteína) das sequências encontradas. No trabalho de Wang *et al.* (2014) foi descrito o gene *grh* da abelha *Apis mellifera*, onde constatou-se que, assim como em diversos insetos, a região mais conservada se encontrava na região 3' (porção C-terminal da proteína). Portanto, os dados aqui apresentados corroboram os dados mostrados em *A. mellifera* e outros insetos. Nas duas isoformas de *Tc-grh* escolhidas para serem utilizadas nas etapas seguintes, Spl 04 e Spl 06, o exon novo estava, respectivamente, completamente presente e ausente. Além disso, ambas isoformas foram as mais presentes dentre os clones sequenciados.

Nos dípteros *D. melanogaster* e *A. gambiae* o gene *grainyhead* possui diversas isoformas depositadas em bancos de dados, enquanto que o besouro *T. castaneum* apresentava somente uma forma (<http://metazoa.ensembl.org>). Sabendo que *grh* pode possuir diversas isoformas em outros insetos, e que o mesmo pode atuar de diferentes formas, tanto em diferentes tecidos como em diferentes momentos, no organismo destes (Uv *et al.* 1997, Harrison *et al.* 2010), imaginamos que com *T. castaneum* não seria diferente, o que se mostrou verdadeiro com a presença de diversos tipos de *splicing*.

Como etapa final do estudo, foram realizadas hibridizações *in situ* a fim de visualizar onde *grh* está sendo expresso nos ovos durante o período da embriogênese inicial, entre 9 e 15 horas após a postura. Nesse período pode-se fazer clara distinção entre as células da serosa e as células do embrião, além desta ser a fase logo antes do período de secreção da cutícula serosa (Menezes, 2014).

As hibridizações *in situ* feitas para *zen-1* (utilizadas como controle) funcionaram como esperado, marcando somente as células da serosa e confirmando a funcionalidade do experimento. Assim, toda a metodologia de hibridização *in situ* foi validada. O resultado da hibridização *in situ* para *Tc-grh* Spl 06, foi diferente do que esperávamos: se imaginava que esse gene seria expresso nas células da serosa, mas foi observado uma marcação específica nas células da banda germinal (o embrião). Curiosamente, foi visto também por nosso grupo, que um gene diretamente responsivo a *Grh*, o *ddc*, também se encontra expresso nas células embrionárias, mas não nas células da serosa (Xavier, comunicação pessoal). Dessa forma, tanto *Tc-grh* quanto *Tc-ddc*, mostram um padrão de expressão diferente do que ocorre em *A. gambiae* (o único outro inseto em que a expressão desses genes foi investigada em relação à

serosa), onde *Ag-grh* e *Ag-ddc* são expressos nas células da serosa, mas não no embrião (Goltsev *et al.* 2009).

Já nos experimentos realizados com as sondas anti-senso para o Spl 04 de *Tc-grh*, conforme mostrado na figura 24, houve uma marcação semelhante à que aconteceu nas sondas anti-senso do Spl 06, porém muito fraca. Entretanto, a sonda senso para a região do Spl 04, que deveria apresentar marcação difusa e não específica, apresentou uma marcação muito bem definida nas células do embrião. A partir desse ponto pode-se pensar em algumas teorias: o fato de haver algum mRNA presente nas células embrionárias que seja, mesmo que parcialmente, complementar à sonda senso sintetizada, fazendo com que a mesma tenha um sinal falso positivo ou, no momento da síntese das sondas, ter havido uma troca nos tubos contendo os moldes senso/anti-senso, caracterizando uma falha humana. De qualquer forma, os resultados referentes ao fragmento Spl 04 são inconclusivos, e seria necessária nova síntese das sondas e a repetição do experimento ou, de preferência, uma abordagem diferente no estudo dos padrões de expressão desses *splices*.

No entanto, o resultado apresentado com o Spl 06 se mostrou interessante, e deste surgem duas hipóteses. A primeira hipótese é de que os *splices* de *grh* escolhidos (Spl 04 e Spl 06), não codificam proteínas que fazem parte da cascata de fatores de transcrição responsável pela síntese da cutícula serosa. E seria necessário testar outros *splices* observados atuando nessa faixa de tempo, a fim de descobrir se e qual deles estaria atuando nas células da serosa.

Outra hipótese é de que as células, tanto da serosa quanto do embrião estariam geneticamente programadas para sintetizar uma cutícula no início da embriogênese, porém, nas células do embrião, essa “programação” seria inibida pela presença de um fator repressor, no caso *Grh*. Dessa forma se garantiria que as células do embrião não secretassem essa cutícula, deixando essa função somente para as células que não receberam essa sinalização repressora (i.e. as células da serosa). Essa hipótese pode ser fortalecida pelo fato de que já foi visto que *Grh* atua como repressor gênico em *D. melanogaster* (Harrison *et al.* 2010).

Conclusões

- A verdadeira extensão do gene *grainyhead* de *Tribolium castaneum* não é somente a da região denominada TC004589 nos bancos de dados, mas também as regiões adjacentes a 5', TC004587 e TC004588;
- A sequência do GAP 169, contendo 195 pares de bases, faz parte de um grande exon novo, constituído de 709 pares de bases, não visto nas versões anotadas nos bancos de dados consultados;
- O gene *grh* apresenta diversas isoformas de splicing tanto em *T. castaneum*, quanto em *D. melanogaster*;
- Os *splices* mais representativos dentre os expressos nos ovos de 6 e 10 HAP apresentavam o exon novo como principal diferença.
- Viu-se que ambos os *splices* de maior representatividade são expressos nas células da banda germinal, porém em níveis diferentes.

Referências bibliográficas

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.,** 2008. Molecular Biology of the Cell. 5th edition. New York: Garland Science, 2008. p. 411-500.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al.,** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389–402.
- Attardi LD, Tjian R.** 1993. Drosophila tissue-specific transcription factor NTF-1 contains a novel isoleucine-rich activation motif. *Genes Dev.* 7:1341-53.
- Beckel, WE,** 1958. Investigation of permeability, diapause, and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus*. *Dyar. . Can J Zool* 36, 541-54.
- Benton MA e Pavlopoulos A.,** 2014. *Tribolium* embryo morphogenesis: May the force be with you. *Bioarchitecture.* 4(1): 16–21.
- Bray, S. B. Burke, B. Brown, N. H. Hirsh, J.** 1989. Embryonic expression pattern of a family of Drosophila proteins that interact with a central nervous system regulatory element. *Genes and Development* 3:1130-1145.
- Brown SJ, Shippy TD, Miller S, Bolognesi R, Beeman RW, Lorenzen MD, Bucher G, Wimmer EA & Klingler M.,** 2012. The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): a model for studies of development and pest biology. *Cold Spring Harb Protoc* 2009, pdb emo126.
- Bucher, G., et al.,** 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr Biol.* 12, R85-6.
- Carlberg, C. e Molnár, F.** 2014. Mechanisms of gene regulation. Amsterdã: Springer 211p
- Chapman RN.** 1924. Nutritional studies on the confused flour beetle, *Tribolium confusum* Duval. *J Gen Physiol* 11: 565–585.
- Dynlacht, B. D. Attardi, L. D. Admon, A. Freeman, M. Tjian, R.** 1989. Functional analysis of NTF-1, a developmentally regulated Drosophila transcription factor that binds neuronal cis elements. *Genes and Development* 3:1677-1688
- Ezzat El-Sherif, Jeremy A. Lynch, Susan J. Brown.** 2012. Comparisons of embryonic development in *Drosophila*, *Nasonia*, and *Tribolium*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* (1)16-39

- Ford J.**, 1937. Research on populations of *tribolium confusum* and its bearing on ecological theory: a summary. *Journal of Animal Ecology*, Vol 9, Issue 1 (may, 1937), 1-14.
- Gillespie, John H.** Population Genetics: A Concise Guide. Baltimore/London: The Johns Hopkins University Press, 1998. 169 p. p. 19-48
- Goltsev Y, Rezende GL, Vranizan K, Lanzaro G, Valle D, Levine M.** 2009. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev Biol.* 330:462-70.
- Harrison MM, Botchan MR, Cline TW,** 2010. Grainyhead and Zelda compete for binding to the promoters of the earliest-expressed *Drosophila* genes. *Dev Biol.* 2010 Sep 15;345(2):248-55. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.06.026. Epub 2010 Jul 1.
- Jacobs, Chris G.C.**, 2014. Surviving embryogenesis: the extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation and infection. PhD thesis, Faculty of Science, Leiden University
- Jacobs CG, Rezende GL, Lamers GE, van der Zee M.**, 2013. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proc Biol Sci.* 280:20131082.
- Jane SM, Ting SB, Cunningham JM.**, 2005. Epidermal impermeable barriers in mouse and fly. *Curr Opin Genet Dev.* 15:447-53.
- Kimelman, D., Martin, B.L.** 2012. Anterior–posterior patterning in early development: three strategies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1: 253-266.
- Klowden, M.J.** 2007 *Physiological systems in insects*. New York: Academic Press, 688p.
- Lamer, A., Dorn, A.**, 2001. The serosa of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera): ontogeny, secretory activity, structural changes, and functional considerations. *Tissue Cell*, 33: 580-595.
- Lewin, B.** 2009. Genes IX. Porto Alegre: Artmed 892p
- Lorini, I.** (2002) Descrição, biologia e danos das principais pragas de grãos armazenados. In: Lorini, I., Miike, L.H., Scussel, V.M. (eds.). Armazenagem de grãos. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 378-397pp.
- Mace KA, Pearson JC, McGinnis W.**, 2005. An epidermal barrier wound repair pathway in *Drosophila* is mediated by grainy head. *Science* 308, 381-385.
- Menezes, T.**, 2014. Análise temporal da formação da cutícula serosa e da expressão do gene grainyhead na embriogênese inicial do besouro *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797). Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado em Biologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, RJ.

- Mockler, TC; Chan, S; Sundaresan, A; Chen, H; Jacobsen, SE; Ecker, JR,** 2005. Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics*. 85 (1): 1–15.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H.,** 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux Arch of Developmental Biology* 193, 267–282.
- Panfilio KA.,** 2008. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Dev Biol*. 313:471-91.
- Rafiqi, A.M., Lemke, S., Ferguson, S., Stauber, M., Schmidt-Ott, U.** 2008. Evolutionary origin of the amnioserosa in cyclorrhaphan flies correlates with spatial and temporal expression changes of zen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 234-239.
- Rezende, GL,** 2008. Investigações sobre a aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), RJ.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, Valle D.** (2008). Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol*. 8:82.
- Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown SJ, Denell R, Beeman RW, Bucher G, Friedrich M, Grimmelikhuijzen CJP, Klingler M.,** 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452: 949–955.
- Schroder R., Beermann A., Wittkopp N. e Lutz R.,** 2008. From development to biodiversity—*Tribolium castaneum*, an insect model organism for short germband development. *Dev Genes Evol*. 218:119–126.
- Sokoloff. A.** (1964) Sex and crossing over in *Tribolium castaneum*. *Genetics*, 50: 491-496.
- Sujata S. Chaudhari, Bernard Moussian, Charles A. Specht, Yasuyuki Arakane, Karl J. Kramer, Richard W. Beeman, and Subbaratnam Muthukrishnan.** 2014. Functional Specialization Among Members Of Knickkopf Family Of Proteins In Insect Cuticle Organization. *PLoS Genet*. 2014 Aug; 10(8): e1004537.
- Ting SB, Caddy J, Hislop N, Wilanowski T, Auden A, Zhao LL, Ellis S, Kaur P, Uchida Y, Holleran WM, Elias PM, Cunningham JM, Jane SM.,** 2005. A homolog of *Drosophila* grainy head is essential for epidermal integrity in mice. *Science*. 2005 Apr 15;308(5720):411-3.
- Tomoyasu, T., Denell, R. E.,** 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analysing adult development. *Dev Genes Evol*. 2014, 575-8.

- Uv AE, Harrison EJ, Bray SJ**, 1997. Tissue-specific splicing and functions of the *Drosophila* transcription factor Grainyhead. *Mol Cell Biol.* 17:6727-35.
- Uv AE, Thompson CR, Bray SJ**, 1994. The *Drosophila* tissue-specific factor Grainyhead contains novel DNA-binding and dimerization domains which are conserved in the human protein CP2. *Mol Cell Biol.* 14:4020-31.
- van der Zee M, Berns N, Roth S.**, 2005. Distinct functions of the *Tribolium* *zerknüllt* genes in serosa specification and dorsal closure. *Curr Biol.* 15:624-36.
- Vargas, H.C.M., Farnesi, L.C., Martins, A.J., Valle, D., Rezende, G.L.**, 2014. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Insect Physiology*, 62: 54-60.
- Vargas, H. C. M. 2015.** Caracterização da expressão de genes *elovl* na serosa de *Tribolium castaneum* (coleoptera: tenebrionidae). Dissertação (Mestrado em biociências e biotecnologia) – Rio de Janeiro - RJ. Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LQFPP/UENF).
- Wang, Y., Odemer, R., Rosenkranz, P., Moussian, B. 2014.** Putative orthologues of genetically identified *Drosophila melanogaster* chitin producing and organizing genes in *Apis mellifera*. *Apidology* 45:733-747
- Wang S, Samakovlis C.**, 2012. Grainy head and its target genes in epithelial morphogenesis and wound healing. *Curr Top Dev Biol.* 98:35-63.
- Zeh DW, Zeh JA, Smith RL**, 1989. Ovipositors, âmnios and eggshell architecture in the diversification of terrestrial arthropods. *Quarterly Review of Biology* 64, 147-168.