
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANDREZA MATTOSO DA CUNHA

**TRANSCRIÇÃO DE DNAs SATÉLITES EM
*Gryllus assimilis***



Rio Claro - SP
2022

ANDREZA MATTOSO DA CUNHA

TRANSCRIÇÃO DE DNAs SATÉLITES EM *Gryllus assimilis*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello

Rio Claro - SP
2022

C972t

Cunha, Andreza Mattoso da

Transcrição de DNAs satélites em *Gryllus assimilis* / Andreza Mattoso da Cunha. -- Rio Claro, 2022

30 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello

1. DNA repetitivo. 2. DNA satélite. 3. *Gryllus assimilis*. 4. Citogenômica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ANDREZA MATTOSO DA CUNHA

TRANSCRIÇÃO DE DNAs SATÉLITES EM *Gryllus assimilis*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

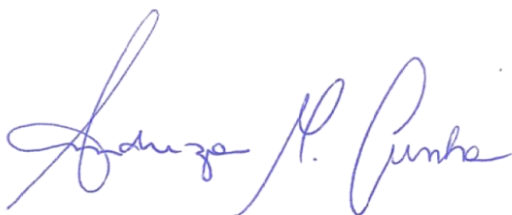
BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello (orientador)

Prof^a. Dr^a. Karen Cristiane Martinez de Moraes

Prof^a. Dr^a. Patricia Pasquali Parise Maltempi

Aprovado em: 25 de julho de 2022



Assinatura do discente



Assinatura do orientador

Dedico este trabalho à minha alma e irmã
gêmea, Natália.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, pelo incentivo e financiamento via processo nº 2018/09010-2 oferecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao meu estimado professor e orientador Diogo, agradeço por toda a paciência e dedicação ao longo de minha primeira Iniciação Científica e também por acompanhar e me guiar no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também à Vanessa Bellini Bardella e Ana Beatriz Ferretti pela parceria e orientações, sem a ajuda de vocês eu provavelmente não teria chegado onde cheguei.

Gostaria de agradecer também pelo suporte da Profª Drª Bernadete Benetti e também do Dr Renato Augusto Corrêa dos Santos, que abriram meus olhos para novos horizontes na biologia e na educação, me oferecendo e proporcionando oportunidades e aprendizagens únicas e que levarei para o resto de minha vida.

Sou grata pelo apoio, incentivo e amor de meus avós e meus pais, assim como toda a minha família e amigos que não apenas me motivaram, mas também me mantiveram resiliente nos momentos mais difíceis dessa jornada. Em especial, gostaria de agradecer aos meus colegas de graduação e amigos Amanda Marcelino Ribeiro, Lívia Machado Lenci, Maíra Coraci Bretas Minillo, Mirelle Santos de Paula, Mônica Midori Suemitsu, Matheus Luqueta, Matheus Shimamoto Pintor, Ágata Gardini, Lucas Bagatini, Leonardo Jardim Pinhati, Beatriz Setin Mosna, Laura Moraes de Menezes, Matheus dos Santos Batista, Alia Moraes, Tainá Oliveira, Jean Felipe Henriques Coutinho, sem vocês a minha caminhada pela graduação não seria possível, obrigada por sempre acreditarem em mim.

À todos os professores e aqueles que participaram direta ou indiretamente de minha formação, o meu muito obrigada.

"Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes."

- *Isaac Newton, 1675*

RESUMO

Nos cromossomos dos eucariotos é notória a ocorrência de heterocromatina, rica em sequências repetidas e ininterruptas de DNA, nomeadas DNAs satélites (DNAsat), que pertencem ao grupo de DNAs repetitivos não codificantes. Por estarem presentes na heterocromatina constitutiva, marcada pela ausência ou baixa frequência de genes codificadores de proteínas, essas sequências por muito tempo foram consideradas inertes. Apesar disso, recentemente, múltiplas evidências surgiram com o avançar dos estudos nessa questão defendendo o envolvimento de tais DNAs em diversas funções, sendo muito conservados entre espécies, o que indica um possível papel regulatório envolvido. Em estudos prévios acerca de bibliotecas de RNA em *Gryllus assimilis* notou-se a conservação de sequências repetitivas de DNAs satélites com atividades transcricionais diferentes entre tecidos e sexos. Pretendeu-se com o desenvolvimento deste projeto analisar a transcrição de algumas das famílias de DNAsat em diferentes tecidos (cabeça, palpos, ceco gástrico, músculos da asa, músculos da perna e gônadas) em seis indivíduos de *G. assimilis*, na busca o melhor entendimento acerca da funcionalidade das mesmas. Para isso, foram extraídas amostras de RNA de diferentes tecidos e estágios embrionários, as quais foram submetidas à técnica de PCR com primers específicos para cada uma das cinco famílias de DNAsat utilizadas. Os resultados apontaram disparidades nas atividades transcricionais entre os tecidos, sexo e também estágios de desenvolvimento, sugerindo papéis funcionais individuais para cada família de DNAsat. Além disso, a presença de transcrição tanto em estágios de desenvolvimento iniciais, quanto na fase adulta, indica que estes elementos são constitutivos para a espécie. Levando em conta os resultados, pode-se concluir a atividade e importância dos DNAsat em *G. assimilis*, corroborando com o proposto por demais pesquisadores em estudos prévios na literatura e abrindo caminho para novas investigações voltadas para o papel e funcionalidade particular dessas sequências de DNA repetitivo.

Palavras-Chave: DNA repetitivo; DNA satélite; *Gryllus assimilis*; Citogenômica.

ABSTRACT

It is remarkable in eukaryotic chromosomes the occurrence of heterochromatin, rich in repetitive and continuous DNA sequences, called satellite DNAs (satDNA), which belong to the non-coding repetitive DNA group. These sequences are present in constitutive heterochromatin, known for its absence or low frequency of protein coding genes, therefore considered inert for a long time. Nevertheless, recently, multiple evidence has arisen with the advance of studies in this matter defending the involvement of these DNA in multiple roles, being highly conserved among species, indicating a possible regulatory role. In preliminary research covering RNA libraries of *Gryllus assimilis* it has been noticed the conservation of repetitive satellite DNA sequences presenting differential transcription between tissues and sexes. The development of this project aimed to analyze the transcription of a few satDNA families in different tissues (head, palps, gastric cecum, wing muscle, leg muscle and gonads) on six individuals of *G. assimilis*, searching for a better understanding upon the functionality of those sequences. To accomplish that, RNA samples were extracted from different tissues and embryonic stages being then submitted to PCR with specific primers for each one of the five satDNA families selected to this experiment. The results pointed to disparities in transcriptional activities between tissues, sex and also development stages, suggesting specific functional roles for each DNAsat family. Furthermore, the presence of transcription activity in early development stages and also in the adult stage indicates that these elements are constitutive to the species. Considering the results, it can be concluded the significance and activity of satDNA in *G. assimilis*, corroborating to what was previously presented by other researchers in literature, and paving the way for new investigations focusing on the role and particular functionality of these repetitive DNA sequences.

Key-words: Repetitive DNA; Satellite DNA; *Gryllus assimilis*; Cytogenomics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Gryllus assimilis</i> e citogenética de Gryllidae	9
1.2 DNAs satélites: organização e transcrição	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1 Aquisição de material biológico	16
2.2 Extração de RNA	16
2.3 Transcrição Reversa	18
2.4 Validação da qualidade do material genético isolado	18
2.5 Detecção da atividade transcricional nos DNAsat de <i>G. assimilis</i>	19
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Gryllus assimilis* e citogenética de Gryllidae

O gênero *Gryllus* (família Gryllidae) possui cerca de 80 espécies descritas, das quais 12 foram registradas para a América do Sul (MARTINS, 2009). A espécie *Gryllus assimilis* distribui-se pelos Estados Unidos da América (EUA), México e grande parte dos países da América do Sul, incluindo o Brasil (REHN e HEBARD, 1915). De acordo com Masaki e Walker (1987) o ciclo de vida da espécie é homodinâmico, tendo em vista que não há grandes variações sazonais, no qual ocorre o crescimento e a reprodução contínua dos indivíduos. Os indivíduos passam, de forma geral, por três estágios, cada qual abriga etapas e diferenças, dependendo da espécie desse gênero: (a) Ovo, que pode apresentar alterações no desenvolvimento de acordo com a umidade do substrato e com a temperatura do ambiente; (b) Ninfa, as espécies do gênero podem apresentar de 5 a 14 mudas até atingirem o estágio adulto, tal estágio também varia em função da temperatura; e (c) Adulto, os *G. assimilis* podem ter uma longevidade partindo de 16 até por volta de 62 dias (MASAKI e WALKER, 1987). Dessa forma, os indivíduos do gênero podem ser identificados como hemimetábolos, visto que não passam por um estágio larval e nem por metamorfose completa (DONOUGHE e EXTAVOUR, 2016).

A espécie *Gryllus bimaculatus* vem sendo utilizada como organismo modelo para uma grande variedade de estudos de diversas áreas, como comportamento, neurobiologia, fisiologia e também genética do desenvolvimento (DONOUGHE e EXTAVOUR, 2016). Levando isso em conta, abaixo encontra-se na Figura 1, a ilustração dos ciclo de vida do grilo, delimitando-se caracteres morfológicos do embrião, para definição de cada estágio do desenvolvimento.

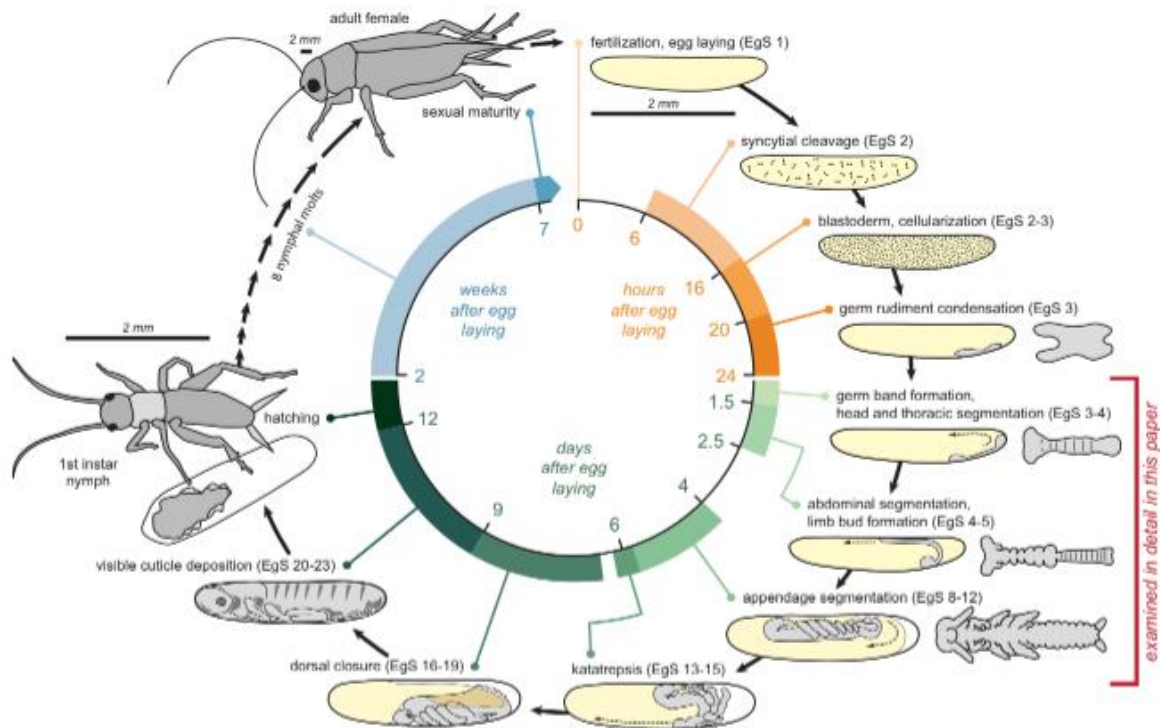


Fig. 1: Representação esquemática dos estágios de desenvolvimento embrionário e ciclo de vida de *G. bimaculatus*, extraído de Donoughe & Extavour, 2016 (página 141).

Com relação aos estudos cromossômicos na família Gryllidae, o número cromossômico varia de $2n (\sigma) = 7$ a $2n (\sigma) = 29$, sendo o número modal $2n (\sigma) = 21$ (ZEFA, 1999; PALACIOS-GIMENEZ et al, 2015). Para o gênero *Gryllus* esta variação é de $2n (\sigma) = 11$ observado em *G. minor* a $2n (\sigma) = 29$ observado na maioria das 22 espécies estudadas até o momento. Sabe-se que a variabilidade cromossômica observada nessa família é decorrente de diferentes rearranjos cromossômicos, incluindo por exemplo, fusão, fissão, translocação e inversão (ZEFA, 1999). Esses eventos envolvem tanto cromossomos autossômicos como os cromossomos sexuais, visto os diferentes sistemas de cromossomos sexuais presentes em algumas espécies, tais como neo-XY, neo- X_1X_2Y e neo- X_1X_20 (PALACIOS-GIMENEZ et al, 2015; 2018). É sugerido que toda a diversidade nos sistemas de determinação sexual cromossômica seja originada do sistema $X0/XX$, visto este ser o modal para o grupo, representando possivelmente o caráter ancestral (PALACIOS-GIMENEZ et al, 2015). A espécie *G. assimilis* é um representante de Gryllidae com maior número cromossômico $2n=29/30$ tendo ocorrência de sistema sexual do tipo $X0$, considerado ancestral. Seus cromossomos possuem dois braços e com morfologia variável, incluindo cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

1.2 DNAs satélites: organização e transcrição

Nos cromossomos dos eucariotos é notória a ocorrência de heterocromatina nas regiões pericentromérica, centromérica e telomérica, além de eventualmente nas regiões intersticiais. Os blocos de heterocromatina, no geral, são ricos em sequências repetidas e ininterruptas de DNA, nomeados DNAs satélites (DNAsat) (YUNIS e YASMINEH, 1971; JENILEK e SCHMID, 1982; PLOHL et al, 2008; PALOMEQUE e LORITE, 2008; PEZER et al, 2012; BISCOTTI, OLMO e HESLOP-HARRISON, 2015; BISCOTTI et al, 2015; FERREIRA et al, 2015; GARRIDO-RAMOS, 2017; FELICIELLO et al, 2021; THAKUR, PACKIARAJ e HENIKOFF, 2021). Esses DNAs compõem, juntamente à microssatélites, minissatélites e elementos de transposição (ETs), o grupo de DNAs repetitivos não codificantes a partir dos quais atribui-se uma porção considerável do genoma eucarioto, muitas vezes atingindo abundância maior do que 50% do conteúdo de DNA (CHARLESWORTH et al, 1994; KUHN, 2015; PALOMEQUE e LORITE, 2008; FELICIELLO et al, 2021; THAKUR, PACKIARAJ e HENIKOFF, 2021).

Quanto à organização, os DNAsat encontram-se com repetições dispostas em tandem, nas quais sequências de pares de base chamadas unidades de repetição, ou monômeros, ocorrem de maneira contínua e subsequente por centenas ou milhares de vezes, de forma que esses arranjos em tandem são variáveis tanto em número quanto comprimento em diferentes escalas (TAUTZ, 1993; CHARLESWORTH et al, 1994; PLOHL, MEŠTROVIĆ e MRAVINAC, 2012; BISCOTTI, OLMO e HESLOP-HARRISON, 2015; PALOMEQUE e LORITE, 2008; VĚCHTOVÁ et al, 2016; THAKUR, PACKIARAJ e HENIKOFF, 2021). Os DNAs satélites são normalmente marcados por repetições ricas em AT (PLOHL et al, 2008; PEZER et al, 2011; PALACIOS-GIMENEZ et al, 2018), e no caso dos DNAs repetitivos em *G. assimilis*, os mesmos estão majoritariamente acumulados na heterocromatina pericentromérica e eventualmente terminal nos cromossomos da espécie (PALACIOS-GIMENEZ et al, 2015; 2018).

Biscotti, Olmo e Heslop-Harrison (2015) propõem que, pelo fato de algumas sequências repetitivas serem extremamente variáveis enquanto outras são altamente conservadas entre espécies, as mutações que ocorrem em sequências de DNAsat - por e entre arranjos de repetição em tandem, assim como amplificação ou contração

de arranjos específicos e suas unidades variantes - podem indicar mudanças no perfil do DNAsat, que por consequência, dada à sua abundância, podem afetar o cariótipo e desempenhar um papel na especiação, favorecendo a sobrevivência da espécie em mudanças ambientais.

A alta homogeneidade de repetição dessas sequências é alcançada pela evolução não independente das unidades de repetição. Isso indica que as mutações não acumulam-se em um único monômero, mas sim espalham-se ao longo do DNAsat, caracterizando uma evolução em concerto, na qual as mutações são homogeneizadas ao longo de membros de uma família repetitiva, sendo que a baixa variabilidade dos monômeros resulta de dois fatores: acúmulo de mutações e taxa de propagação ou eliminação (PLOHL et al, 2008; PLOHL, MEŠTROVIĆ e MRAVINAC, 2012; PEZER et al, 2012). Esse processo ocorre em grupos reprodutivamente ligados, permanecendo fixadas entre os indivíduos de forma que as mutações lentamente se acumulam e se espalham pelo DNAsat de outras espécies. Nesse caso, os DNAsat podem ser então usados como marcadores filogeneticamente informativos (PLOHL, MEŠTROVIĆ e MRAVINAC, 2012; THAKUR, PACKIARAJ e HENIKOFF, 2021).

Por conta da evolução em concerto, é corriqueiro observar maior homogeneidade de repetição dentro de uma linhagem ou espécie do que entre elas. Dessa forma, por se tratarem de elementos de evolução relativamente rápida e acumulativa, até espécies intimamente relacionadas podem apresentar DNAsat satélites que diferem em sequência de nucleotídeos, número de cópias e até em composição de famílias de satélites. Com isso, podemos destacar a seguinte observação: enquanto a estrutura centromérica, necessária à segregação cromossômica em processos de divisão celular, é altamente conservada nos eucariotos, suas sequências de DNA são paradoxalmente variáveis, uma vez que os centrômeros são marcados pela presença de famílias de DNA satélites (PLOHL et al, 2008; PLOHL, MEŠTROVIĆ e MRAVINAC, 2012; THAKUR, PACKIARAJ e HENIKOFF, 2021).

Por conta da abundância de DNAsat na heterocromatina constitutiva e por esta ser uma região com ausência ou baixa frequência de genes codificadores de proteínas, esta região por muito tempo foi considerada inerte no genoma. Além disso, por não se conhecer uma função específica para suas sequências, erroneamente,

esta fração do DNA foi rotulada como ‘DNA egoísta’, ‘DNA parasita’ ou ainda ‘DNA lixo’ (PLOHL et al, 2008; BISCOTTI et al, 2015; KUHN, 2015; VĚCHTOVÁ et al, 2016). Apesar disso, motivados pelo questionamento do por que tais sequências são conservadas em diversos organismos, sem perdas ou diminuições sem uma vantagem evolutiva aparente, estudos começam a acumular múltiplas evidências que surgiram com o avançar de abordagens metodológicas, permitindo que uma visão oposta pudesse ser levantada, defendendo e acumulando dados experimentais que apontassem o envolvimento de tais DNAs em diversas funções (PLOHL et al, 2008; PLOHL, MEŠTROVIĆ e MRAVINAC, 2012; KUHN, 2015; VĚCHTOVÁ et al, 2016).

Uma observação interessante é o envolvimento de diferentes RNA polimerases na transcrição dessas sequências (RNA polimerase I e RNA polimerase III), com possibilidade de transcrição bidirecional, tanto na direção ‘sense’ quanto ‘antisense’ do DNA (FERREIRA et al, 2015; VĚCHTOVÁ et al, 2016), gerando como produtos RNAs não codificantes com ampla diversidade, o que possibilita inferir em diferentes sinais regulatórios envolvidos (FERRERA et al, 2015).

A transcrição de sequências repetitivas no centrômero ou em regiões pericentroméricas, segundo Biscotti et al (2015), pode estar relacionada na manutenção da identidade do centrômero, gerando transcritos dos quais outras proteínas envolvidas na divisão celular. Aponta-se então a importância dos DNAsat para a manutenção da estrutura de regiões de extrema relevância no centrômero, onde ocorrem interações com diversas proteínas, tal qual as envolvidas na segregação cromossômica durante a divisão celular (cinetocoros), também sendo essenciais para a coesão entre cromátides irmãs. Assim, as sequências de DNAs repetitivos estão ligadas a função tanto de organização cromossômica, quanto de pareamento durante a divisão celular através de sítios de ligação para proteínas centroméricas (BRUTLAG, 1980; PLOHL et al, 2008; PALOMEQUE e LORITE, 2008; BISCOTTI et al, 2015; BISCOTTI, OLMO e HESLOP-HARRISON, 2015; FERREIRA et al, 2015; VĚCHTOVÁ et al, 2016; THAKUR, PACKIARAJ e HENIKOFF, 2021).

Para além do evidenciado, pode-se sublinhar a recente associação de transcritos de DNAs satélites em processos oncogênicos, uma vez que esses elementos relacionam-se a meios de silenciamento gênico e manutenção da estrutura do cromossomo (PEZER et al, 2012; FERREIRA et al, 2015).

Dados sobre transcrição de DNAsat em insetos são escassos e apenas poucos representantes de quatro ordens foram estudados: Hymenoptera, Diptera, Orthoptera e Coleoptera (ROULEUX-BONNIN et al, 1996; RENAULT et al, 1999; BAILEY et al, 2013; AKRAP, 2013). Inicialmente a transcrição foi associada a genes adjacentes às regiões repetitivas, funcionando como promotores. Contudo, foram observados em meio a essas sequências sítios de ligação para fatores de transcrição assim como o envolvimento de pequenos RNAs na manutenção e estabelecimento da estrutura pericentromérica heterocromática (SHATSKIKH et al 2020).

Os dados apontaram que os DNAsat geralmente apresentam transcrição diferencial para cada etapa do desenvolvimento e entre tecidos, o que, somado à sua grande conservação entre as espécies estudadas, sugere que essas sequências tenham um possível papel estrutural, e ainda, uma função regulatória, mesmo que seu mecanismo de ação ainda seja desconhecido (UGARKOVIC, 2005; PALOMEQUE e LORITE, 2008; AKRAP, 2013; PEZER et al, 2011; FERREIRA et al, 2015).

Em Orthoptera, por exemplo, a transcrição diferencial foi estudada previamente na espécie *Teleogryllus oceanicus* (BAILEY et al, 2013), na qual foi utilizada a técnica de pirosequenciamento Roche 454 para caracterizar a variação transcriptômica entre três diferentes tecidos do inseto em questão (testículo, glândula acessória e corpo em geral). Já em *Gryllus assimilis*, Palacios-Gimenez e colaboradores (2018) observaram que o conjunto de DNAsat correspondia a cerca de 4% do genoma dessa espécie, com atividade transcricional diferencial entre os tecidos e também entre sexos. Os mesmos autores também reportaram a presença de alguns destes DNAs repetitivos em outras espécies do gênero *Gryllus*, ainda demonstrando a atividade transcricional tanto em *G. assimilis* quanto em espécies correlacionadas, sugerindo que tais famílias de DNAsat podem ter sido altamente conservadas por conta de uma funcionalidade atrelada às mesmas.

Neste sentido, foram utilizadas informações prévias obtidas em Palacios-Gimenez et al (2018) da espécie *G. assimilis* com intuito de checar a transcrição das famílias de DNAsat nos diferentes tecidos do organismo e também diferentes etapas do desenvolvimento do inseto em questão. O objetivo foi entender se os DNAs são constitutivamente expressos na espécie, se há um padrão temporal de expressão ao longo da embriogênese ou um padrão de transcrição tecido-específico. Estes dados

permitem avançar no conhecimento sobre o possível papel dos transcritos de DNAsat nos genomas da espécie em questão e de insetos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aquisição de material biológico

Os organismos a partir dos quais este trabalho foi desenvolvido são provenientes de uma população de *Gryllus assimilis* (Orthoptera, Gryllidae) mantida e cultivada no biotério da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no Campus de Rio Claro (SP). Esta população é endogâmica, cruzada experimentalmente durante os anos de 2015 a 2019.

Os animais eram mantidos em caixas plásticas para armazenamento adaptadas, com tampas teladas, além da presença de abrigos criados a partir da reutilização de embalagens de papelão para armazenamento de ovos de galinha.

Dessa população, foi extraída uma amostra compreendendo três indivíduos machos em fase de canto, e três indivíduos fêmeas ainda virgens, totalizando assim seis indivíduos representantes da população mantida. Esses animais foram mantidos separadamente e no momento em que os machos iniciaram o cortejo das fêmeas, os animais foram utilizados para a extração do RNA total.

2.2 Extração de RNA (Figura 2)

Os indivíduos selecionados foram então dissecados para a obtenção dos seguintes tecidos:

- Cabeça;
- Palpos;
- Musculatura das asas;
- Musculatura das pernas traseiras;
- Ceco gástrico;
- Gônadas (testículos ou ovários).

Para embriões, diferentes etapas foram amostradas, incluindo diferentes dias, durante os primeiros dez dias do desenvolvimento a partir da postura dos ovos, seguindo o procedimento de Donoughe and Extavour (2016). Foram feitos *pool/s* de 100 embriões por amostragem. Os embriões foram mantidos em TRizol® (600

microlitros) à temperatura -80°C em um freezer até o procedimento de extração de RNA.

O isolamento de RNA proveniente de cada um dos seis tecidos isolados foi realizado utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as recomendações de procedimento sugeridas pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016), através das quatro seguintes etapas:

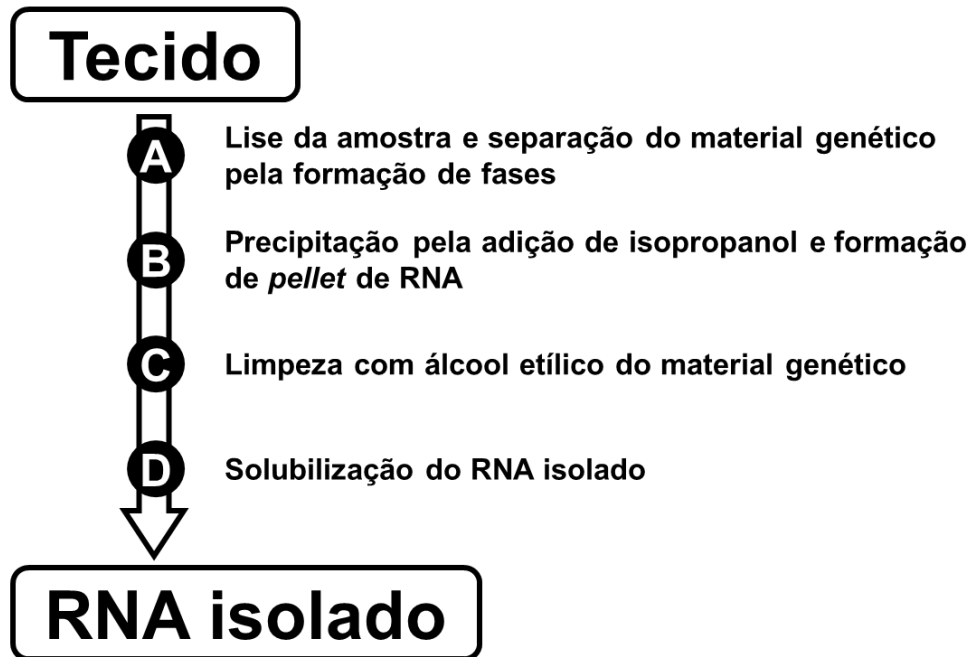


Fig. 2: Representação esquemática do processo de extração de RNA.

A. *Lise e homogeneização das fases das amostras em TRIzol® (Invitrogen):*

Cada um dos tecidos foram macerados mecanicamente em imersão em TRIzol® em tubos Eppendorf (2ml), seguido por incubação e adição subsequente de clorofórmio e centrifugação com configuração de $12,000 \times g$ a 5°C .

Com isso, a solução foi separada duas fases: um transparente sobrenadante, e outra avermelhada, depositada ao fundo. A fase sobrenadante contendo o RNA foi transferida para um novo tubo Eppendorf, sendo destinado à próxima etapa.

B. *Precipitação:*

É adicionado ao sobrenadante oriundo da etapa de lise, isopropanol para a precipitação do RNA, seguida de centrifugação nas mesmas configurações citadas no tópico anterior.

O RNA será precipitado na forma de *pellet* sutilmente percebido ao fundo do tubo Eppendorf. O sobrenadante é descartado com o uso de uma micropipeta.

C. Limpeza:

Nesta etapa, o *pellet* é ressuspenso em álcool etílico 80% e novamente centrifugado, brevemente, para a “limpeza” do material, desagregando-o de quaisquer resquícios dos reagentes utilizados até então.

O sobrenadante é então descartado com o uso de uma micropipeta, e o *pellet* de RNA é secado (5-10 minutos em temperatura ambiente).

D. Solubilização:

O RNA é diluído em água ultrapura (Milli-Q) e incubado em banho a 60°C por 10 minutos.

Para a remoção completa de moléculas de DNA, a solução obtida foi tratada com *Amplification Grade DNase I* (Sigma-Aldrich) por 15 minutos à temperatura ambiente.

2.3 Transcrição Reversa

Uma vez alcançado o produto do isolamento de RNA, realiza-se então uma reação enzimática por transcriptase reversa (RT-PCR) utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Life Technologies). Dessa forma o material genético é estabilizado, obtendo o DNA complementar (cDNA) da amostra.

2.4 Validação da qualidade do material genético isolado

Para corroborar o isolamento de RNA - bem como sua conversão à cDNA - sem a contaminação por DNA genômico ou degradação do material genético, realizou-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores (*primers*)

do gene Actina. É esperado que este gene, devido sua transcrição ampla no organismo, seja o controle positivo para o experimento.

Assim, cada uma das amplificações do cDNA dos sete tecidos, e com seus respectivos *primers* específicos, foram comparados a este controle, além de também serem comparados com a amplificação por PCR do mesmo gene para DNA genômico.

Os resultados, em gel de agarose, apresentariam então diferentes tamanhos de bandas, para cada material amplificado: a amostra que continha DNA genômico deve-se mostrar maior, com cerca de 100 pb a mais, do que a observada no cDNA. Essa diferença é explicada pela presença de introns no DNA genômico, região que é processada e retirada após a maturação do RNA.

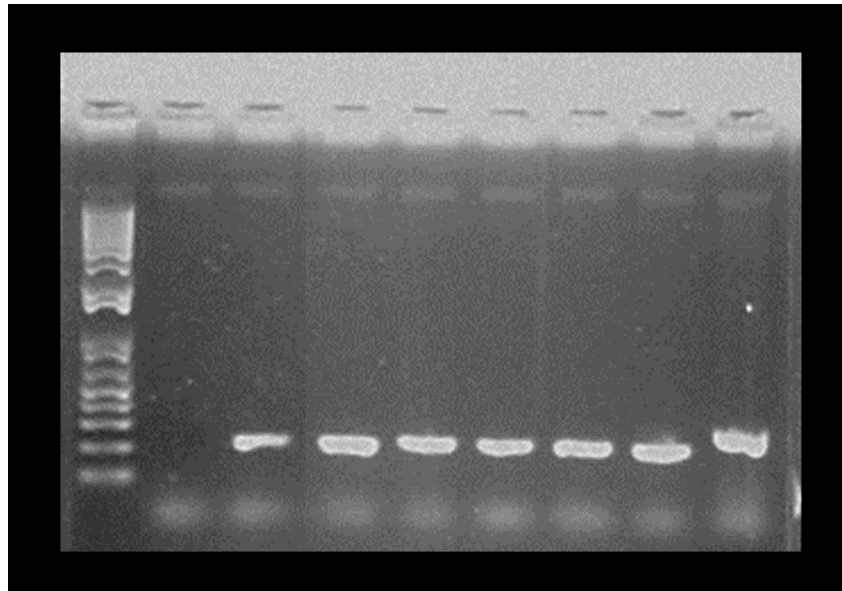


Fig. 3: Imagem de gel de eletroforese em agarose do cDNA de um indivíduo macho, utilizando primer para o gene de actina. Em cada poço, seguem os seguintes componentes, da esquerda para a direita: Ladder, reação “branca” (sem material genético), palpos, cabeça, ceco gástrico, músculo da asa, músculo da pata, testículo, DNA genômico.

2.5 Detecção da atividade transcricional nos DNAsat de *G. assimilis*

Após a obtenção dos cDNAs provenientes dos seis tecidos selecionados (cabeça, palpos, ceco gástrico, músculos da asa, músculos da perna traseira, testículos ou ovário), foram então escolhidas cinco dentre as onze famílias de DNAsat estudadas por Palacios-Gimenez et al (2018). Para isso, levou-se em conta a

existência de famílias de tamanhos distintos, e com distribuições diferentes ao longo dos cromossomos do organismo. Sendo assim, foram selecionadas as seguintes famílias de DNAsat (Figura 4):

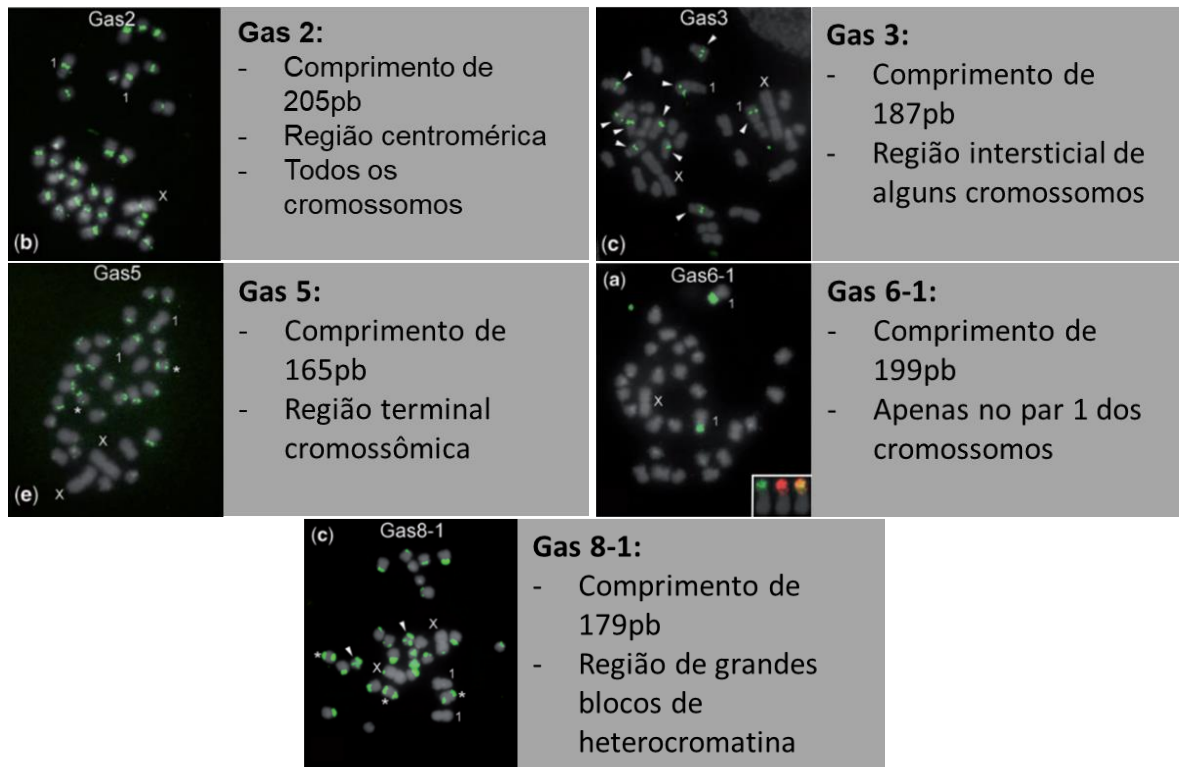


Fig. 4: Descrição e detalhamento das famílias de DNA satélite utilizadas nesse trabalho.
Fonte: Imagens extraídas de PALACIOS-GIMENEZ et al. (2018).

A partir da seleção dessas famílias, foi então utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction, ou PCR) convencional para cada tecido de cada indivíduo com o intuito de verificar a atividade transcricional de cada DNAsat. Para isso foram utilizados *primers* (oligonucleotídeos) especificados para cada família em Palacios-Gimenez et al. (2018), listados abaixo na Tabela 1.

A reação PCR (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) foi realizada em termociclador (Eppendorf) consistindo em três passos centrais: Desnaturação, Anelamento de *primers* e Extensão (JOSHI e DESHPANDE, 2010).

Família de DNAsat	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' – 3')
Gas2	Gas2 F	CTCACTATGAATTTCTTACGATT
	Gas2 R	TCTGCATTGGA ACTCAGACACT
Gas3	Gas3 F	GGCTCAACTTTGTTTGTCTG
	Gas3 R	CAAAAATTTCTCTTCAAGTACA
Gas5	Gas5 F	TGGAGAGTTGTACCTGTATA
	Gas5 R	CGAGAAATTCAATGGTGCAA
Gas6-1	Gas6-1 F	TGTACAAACGGGGCCGACAC
	Gas6-1 R	GGTGCCGACGTTGTAAAGTT
Gas8-1	Gas8-1 F	GAAATTGAATGGCGTCAAGC
	Gas8-1 R	TCGTATTTTGTCTACTTATATA

Tabela 1: Lista de sequências utilizadas para síntese de *primers* usados na reação de PCR (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2018), onde F indica o *primer* 'Forward' e R indica o *primer* 'Reverse'.

- **Desnaturação:** O material genético (cDNA) é desnaturado a 90°C, sendo observadas então duas fitas-simples de DNA.
- **Anelamento de primers:** Os *primers* desenhados especificamente para cada família de DNAsat são anelados às fitas de DNA desnaturadas em suas respectivas regiões de amplificação à temperatura de 60°C.
- **Extensão:** São criadas cópias de fitas complementares ao DNA delimitadas pelos *primers*, dobrando a quantidade de DNA através da síntese pela enzima Taq polimerase. Dessa forma, cada molécula nova de DNA dupla-fita apresenta uma fita original e outra recém-sintetizada, que podem ser usadas para repetir o processo de amplificação gerando, cada molécula de DNA, duas novas cópias no fragmento de DNA delimitado pelo *primer*.

Com a amplificação realizada pela PCR, foi possível detectar então a atividade transcricional de cada família de DNAsat.

3 RESULTADOS

Foi observada a transcrição de todas as famílias de DNAs satélites em ao menos uma amostra dos tecidos estudados (Figura 5a). De acordo com a família de DNAsat, constatou-se a transcrição apenas dos monômeros e, em alguns casos, dos multímeros da sequência. Notou-se a aplicação eficiente do gene Actina como controle positivo na detecção de pureza do cDNA estudado (Figura 5b). O resumo dos resultados obtidos na análise da transcrição das diferentes famílias de DNAsat abordadas podem ser observados na Tabela 2.

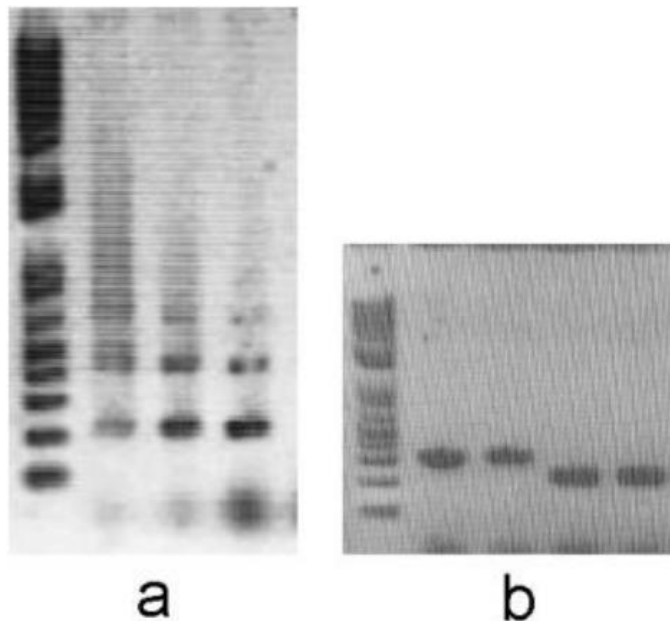


Figura 5: (a) Exemplo de transcrição de DNAsat em *G. assimilis* (DNAsat Gas 6-1) no testículo de um indivíduo macho. (b) Teste de eficiência do gene Actina para detecção de possíveis contaminações no cDNA (poços 2 e 3 da esquerda para a direita contendo DNA genômico, e os poços 4 e 5 contendo amostras de cDNA da cabeça de um indivíduo fêmea).

Foi verificada a ausência de atividade transcricional, em ambos os sexos, nas famílias de DNAsat Gas 2 (músculo da asa) e no Gas 6-1 (músculo da asa, palpos e ceco gástrico). Por outro lado, diferenças transcricionais foram notadas entre os sexos em Gas 2 (palpos, ceco gástrico e gônadas), Gas 5 (gônadas), Gas 6-1 (cabeça, músculo da perna e gônadas) e para o Gas 8-1 (ceco gástrico e gônadas). Os demais DNAs satélites exibiram atividade transcricional para ambos os sexos.

Tecido	Indivíduo	Actina	Gas 2	Gas 3	Gas 5	Gas 6-1	Gas 8-1
1 (PALPOS)	♀ 1	+	-	+	+	-	-
	♀ 2	+	+	+	+	-	+
	♀ 3	+	-	+	+	-	+
	♂ 1	+	+	+	+	-	+
	♂ 2	+	+	+	+	-	+
	♂ 3	+	+	+	+	+	+
2 (CABEÇA)	♀ 1	+	-	+	+	-	+
	♀ 2	+	+	-	+	-	+
	♀ 3	+	+	+	+	-	+
	♂ 1	+	+	+	+	+	+
	♂ 2	+	+	+	+	+	-
	♂ 3	+	+	+	+	+	+
3 (MÚSCULO DA ASA)	♀ 1	+	-	+	+	-	-
	♀ 2	+	-	+	+	-	+
	♀ 3	+	-	+	+	-	+
	♂ 1	+	-	+	+	-	+
	♂ 2	+	-	+	+	-	-
	♂ 3	+	-	+	+	-	+
4 (CECO GÁSTRICO)	♀ 1	+	-	+	+	-	-
	♀ 2	+	-	+	+	-	-
	♀ 3	+	+	+	+	-	+
	♂ 1	+	+	+	+	-	+
	♂ 2	+	+	+	+	+	+
	♂ 3	+	+	+	+	-	+
5 (MÚSCULO DA PERNA)	♀ 1	+	-	+	+	-	+
	♀ 2	+	+	+	+	+	+
	♀ 3	+	+	+	+	-	+
	♂ 1	+	+	+	+	-	+
	♂ 2	+	+	-	+	-	+
	♂ 3	+	+	+	+	-	+
6 (OVÁRIO/TESTÍCULO)	♀ 1	+	-	+	-	-	+
	♀ 2	+	-	+	+	-	-
	♀ 3	+	+	+	-	-	-
	♂ 1	+	+	+	+	-	+
	♂ 2	+	+	+	+	+	+
	♂ 3	+	+	+	+	+	+

Tabela 2: Atividade transcricional das famílias de DNAsat estudadas em indivíduos adultos (machos e fêmeas). Legenda: (+) indica presença de transcritos e (-) ausência de transcritos.

Adicionalmente a estes dados, integram-se em conjunto os dados obtidos a partir da análise do desenvolvimento dia-a-dia dos embriões de *G. assimilis*, que podem ser observados na Tabela 3 e no gel de agarose ilustrado na Figura 6.

Foram analisadas as mesmas famílias de DNAsat de forma que apenas a família Gas3 não apresentou transcrição em nenhum dos dias observados. No caso da família Gas6-1, a atividade transcricional foi observada a partir do terceiro dia, enquanto que na família Gas8-1, foi observada com início no segundo dia de desenvolvimento.

Dias de desenvolvimento do embrião	Actina	Gas2	Gas3	Gas5	Gas6-1	Gas8-1
1	+	+	-	+	-	-
2	+	+	-	+	-	+
3	+	+	-	+	+	+
4	+	+	-	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+
6	+	+	-	+	+	+
7	+	+	-	+	+	+
8	+	+	-	+	+	+
9	+	+	-	+	+	+
10	+	+	-	+	+	+

Tabela 3: Atividade transcricional das famílias de DNAsat em diferentes dias do desenvolvimento de embriões de *G. assimilis*, onde a amostra de cada dia contém 100 embriões. Legenda: (+) indica presença de transcritos e (-) ausência de transcritos.

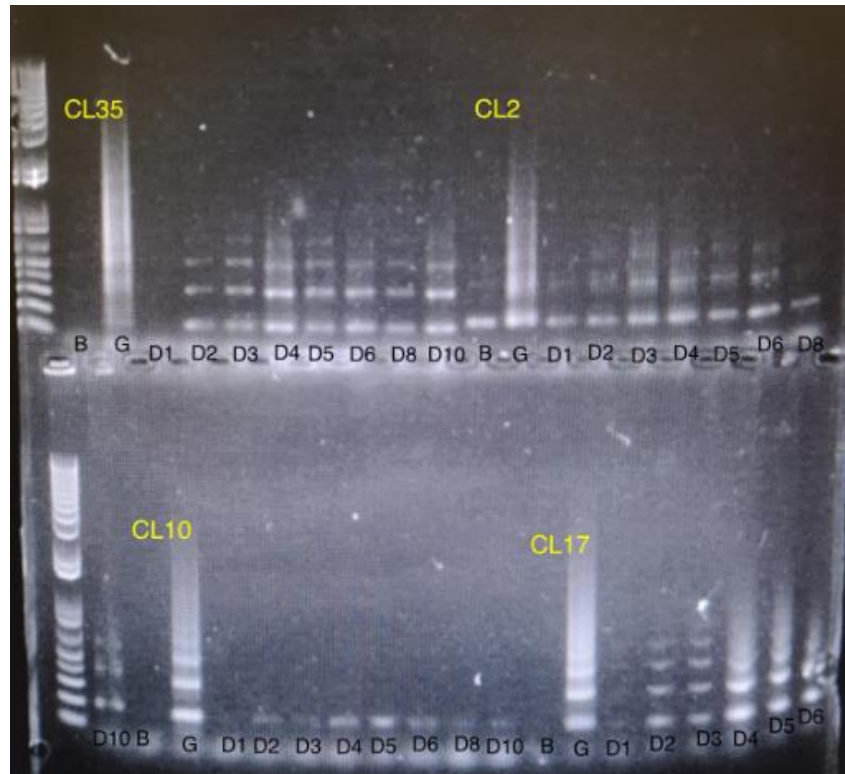


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose evidenciando a transcrição das famílias de DNAsat nos embriões de *G. assimilis* em diferentes dias de desenvolvimento. Legenda: (CL35) Família Gas8-1; (CL2) Família Gas2; (CL10) Família Gas3; (CL17) Família Gas5; (B) PCR em Branco – sem material genético; (G) PCR com DNA genômico; (D1 a D10) Dias de cada extração de RNA.

4 DISCUSSÃO

Os dados obtidos revelam um cenário interessante acerca da atividade de DNAs satélites em alguns tecidos da espécie *G. assimilis*. Com os resultados ilustrados na Tabela 2, nota-se a existência de atividades transcricionais distintas tanto entre os tecidos, quanto entre os sexos, conforme descrito em outras espécies de insetos (UGARKOVIC, 2005; PALOMEQUE e LORITE, 2008; AKRAP, 2013; PEZER et al, 2011; BAILEY et al, 2013; PALACIOS-GIMENEZ et al, 2018).

Ademais, os resultados alcançados permitem inferir que a ocorrência de variação na transcrição em cada um dos tecidos indica papéis distintos para a funcionalidade de cada família de DNAsat, como postulado por Biscotti et al (2015), ao afirmar que a transcrição de diferentes regiões repetitivas estão atreladas ao tipo de tecido e estágio de desenvolvimento.

Segundo pesquisadores e trabalhos prévios, a importância dos DNAsat é centrada em funções ligadas ao centrômero, mas também sugerem o envolvimento de transcritos em possíveis interações com outras enzimas e proteínas, marcando também participação determinante na formação e manutenção heterocromática em diversos organismos (VOLPE et al, 2002; PLOHL et al, 2008; KUHN, 2015).

A transcrição desde os primeiros dias do desenvolvimento embrionário, juntamente com a frequente transcrição da maioria dos DNAsat nos adultos, apontam que estes elementos são constitutivos para a espécie, podendo seus produtos atuarem em funções essenciais para as células. Além disso, Plohl e colaboradores (2008) apontam que os DNAs satélites também estão envolvidos na reestruturação do genoma durante o desenvolvimento em diferentes organismos, de forma que regiões de quebra cromossômica sugerem que os DNAsat representam 'hot spots' recombinativos de uma reorganização genômica.

Estes dados abrem portas para novas análises em busca de entender que tipo de moléculas são geradas pelos DNAsat na espécie e investigação de suas possíveis atividades e, para isso, enfatiza-se a necessidade de futuros estudos envolvendo genômica, proteômica e até metabolômica para compreender o real papel dessas sequências.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKRAP, Ivana. **Study of satellite DNA-mediated gene regulation in red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797)**. 2013. 53 p. Graduation Thesis (Master of molecular biology) – Faculty of Science, University of Zagreb, Zagreb.
- BAILEY, Nathan W. et al. Tissue-specific transcriptomics in the field cricket *Teleogryllus oceanicus*. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 3, n. 2, p. 225-230, 2013.
- BISCOTTI, M. A. et al. Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles. **Chromosome Research**. v. 23, n. 3, p. 463-477, 2015. doi: 10.1007/s10577-015-9494-4.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**. v. 23, n. 3, p. 415-420, 2015. doi: 10.1007/s10577-015-9499-z.
- BRUTLAG, Douglas L. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. **Annual review of genetics**, v. 14, n. 1, p. 121-144, 1980.
- CHARLESWORTH, Brian; SNIEGOWSKI, Paul; STEPHAN, Wolfgang. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.
- DONOUGHE, Seth; EXTAVOUR, Cassandra G. Embryonic development of the cricket *Gryllus bimaculatus*. **Developmental Biology**, v. 411, n. 1, p. 140-156, 2016.
- FELICIELLO, Isidoro et al. Satellite DNA-Mediated Gene Expression Regulation: Physiological and Evolutionary Implication. In: **Satellite DNAs in Physiology and Evolution**. Springer, Cham, 2021. p. 145-167.
- FERREIRA, Daniela et al. Satellite non-coding RNAs: the emerging players in cells, cellular pathways and cancer. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 479-493, 2015.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, p. 230. 2017.
- JELINEK W. R., SCHMID C. W. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. **Annual Review of Biochemistry**, 51:813-844, 1982.
- JOSHI, Mohini; DESHPANDE, J. D. Polymerase chain reaction methods, principles and application. **International Journal of Biomedical Research**, v. 2, n. 1, p. 81-97, 2010.
- KUHN, G. C. S. 'Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*'. **Heredity**, v. 115, n. 1, p. 1, 2015.
- MARTINS, Luciano de Pinho. **Som de chamado, ultramorfolgia da fileira estridulatória e morfologia do complexo fálico aplicados à taxonomia de *Gryllus Linnaeus, 1758* do extremo sul do Rio Grande do Sul (Orthoptera, Gryllidae)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro, 2009.

- MASAKI, Sinzo; WALKER, Thomas J. Cricket life cycles. In: **Evolutionary biology**. Springer, Boston, MA, 1987. p. 349-423.
- PALACIOS-GIMENEZ, Octavio M. et al. Contrasting the chromosomal organization of repetitive DNAs in two Gryllidae crickets with highly divergent karyotypes. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0143540, 2015.
- PALACIOS-GIMENEZ, Octavio Manuel et al. Satellite DNAs are conserved and differentially transcribed among Gryllus cricket species. **DNA Research**, v. 25, n. 2, p. 137-147, 2018.
- PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, v. 100, n. 6, p. 564-573, 2008.
- PEZER, Željka et al. Transcription of satellite DNAs in insects. In: **Long Non-Coding RNAs**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 161-178.
- PEZER, Ž. et al. Satellite DNA-mediated effects on genome regulation. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 153-169, 2012.
- PLOHL, Miroslav et al. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. **Gene**, v. 409, n. 1-2, p. 72-82, 2008.
- PLOHL, Miroslav; MEŠTROVIĆ, Nevenka; MRAVINAC, Brankica. Satellite DNA evolution. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 126-152, 2012.
- REHN J., HEBARD M. The genus Gryllus (Orhoptera) as found in America. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 67, p. 293-322, 1915.
- RENAULT, Sylvaine et al. Satellite DNA transcription in *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 2, p. 103-111, 1999.
- ROULEUX- BONNIN, Florence et al. Transcription of four satellite DNA subfamilies in *Diprion pini* (Hymenoptera, Symphyta, Diprionidae). **European journal of biochemistry**, v. 238, n. 3, p. 752-759, 1996.
- SHATSKIKH, Aleksei S. et al. Functional significance of satellite DNAs: Insights from *Drosophila*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 312, 2020.
- TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: PENA, S. D. J. et al. (eds). **DNA Fingerprinting: State of the Science**. Basel, Switzerland: Springer Basel AG p. 21-28, 1993.
- THAKUR, Jitendra; PACKIARAJ, Jenika; HENIKOFF, Steven. Sequence, chromatin and evolution of satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4309, 2021.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. TRIZoITM Reagent, **Invitrogen User Guide**, 2016.

UGARKOVIC, Durdica. Functional elements residing within satellite DNAs. **EMBO reports**, v. 6, n. 11, p. 1035-1039, 2005.

VĚCHTOVÁ, Pavlína et al. CpSAT-1, a transcribed satellite sequence from the codling moth, *Cydia pomonella*. **Genetica**, v. 144, n. 4, p. 385-395, 2016.

VOLPE, Thomas A. et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. **Science**, v. 297, n. 5588, p. 1833-1837, 2002.

YUNIS, Jorge J.; YASMINEH, Walid G. Heterochromatin, Satellite DNA, and Cell Function: Structural DNA of eucaryotes may support and protect genes and aid in speciation. **Science**, v. 174, n. 4015, p. 1200-1209, 1971.

ZEFA, Edison. Autosomal rearrangement in *Gryllus assimilis* Fabricius, 1775 (Orthoptera, Gryllidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 333-336, 1999.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

ANDRÉS, Jose A. et al. Patterns of transcriptome divergence in the male accessory gland of two closely related species of field crickets. **Genetics**, v. 193, n. 2, p. 501-513, 2013.

ARUNKUMAR, Ganesan; MELTERS, Daniël P. Centromeric transcription: a conserved Swiss-Army knife. **Genes**, v. 11, n. 8, p. 911, 2020.

CARVALHO, Danila Blanco de. **Estudo de transcriptomas por RNAseq em tecidos de cabeça e glândula salivar de *Rhodnius montenegrensis* e *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**. 2016. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, 2016.

DALÍKOVÁ, Martina et al. W-enriched satellite sequence in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). **Chromosome Research**, v. 25, n. 3, p. 241-252, 2017.

MILANI et al. The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. **BMC Genetics**. v. 18, n. 1, p. 1-11, 2017. doi: 10.1186/s12863-017-0548-9.

PALACIOS-GIMENEZ, Octavio M. et al. Contrasting the chromosomal organization of repetitive DNAs in two Gryllidae crickets with highly divergent karyotypes. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0143540, 2015.

PALACIOS-GIMENEZ, Octavio M. et al. Comparative analysis of morabine grasshopper genomes reveals highly abundant transposable elements and rapidly proliferating satellite DNA repeats. **BMC biology**, v. 18, n. 1, p. 1-21, 2020.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 1-28, 2012.

LORITE, Pedro et al. Evolutionary dynamics of satellite DNA in species of the genus *Formica* (Hymenoptera, Formicidae). **Gene**, v. 332, p. 159-168, 2004.

RUIZ-ESTÉVEZ, M. et al. B-Chromosome Ribosomal DNA Is Functional in The Grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **PLoS ONE**. v. 7, n. 5, p. e36600, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0036600.