



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDOS EM HETEROCROMATINA DE
Melipona scutellaris

Rosilene Rosa Tavares

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 03/07/2000
Nota 100,00

Ana Maria Coelho
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Genética e Bioquímica
Prof^a Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Ana Maria Bonetti

Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti
Orientadora

Sandra Morelli

Prof^a Dr^a Sandra Morelli
Co-orientadora

Rosana de Cássia Oliveira

MSc Rosana de Cássia Oliveira
Co-orientadora

Uberlândia, 03 de Julho de 2000

DEDICATÓRIA

Ao autor da VIDA.

À meus pais: João Tavares dos Santos e Joanissa R. Tavares, aos meus irmãos e irmãs.

Às minhas orientadoras: Dra Ana Maria Bonetti, MSc. Rosana de Cássia Oliveira, Dra Sandra Morelli e a todos àqueles, os quais Deus permite-me o convívio amigo e fraterno.

"Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo. E os rios não te submergirão; se caminhares pelo fogo, não te queimarás, e a chama não te consumirá. Porque és precioso a meus olhos, porque eu te aprecio e te amo, permuta reinos por ti, entrego nações em troca de ti."

Isaías 43, 2 e 4

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor da VIDA, pelo encontro glorioso de duas células que se uniram e multiplicaram bilhões de vezes nas entranhas do seio em que fui formada, até o dia em que fizestes-me conhecer a luz do mundo, o colorido da vida, o som da tua voz. Obrigado Senhor por reinar em cada átomo que constitui as células que formam o meu corpo, a cada fração de segundos que formam os dias da minha existência, pelas infinitas dádivas, por todos os momentos de alegrias, e também os difíceis, pois são nestes que mais aprendemos, e que muitas vezes sentimos mais a tua presença. Pelas pessoas maravilhosas que colocastes em minha vida ao longo da jornada de minha formação acadêmica. E ao término de mais uma etapa, gostaria de fazer-te alguns agradecimentos indispensáveis:

À Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti pela orientação segura, confiança, incentivo, pelo carinho, respeito, compreensão, amizade, pelos "puxões de orelha", quando necessários, que aliás foram muitos, pela sua vibração quando obtínhamos bons resultados na pesquisa, pelo exemplo de profissional e ser humano.

À Prof^a Dr^o Sandra Morelli pelas preciosas sugestões, esclarecimentos, paciência e amizade.

À MSc. Rosana de Cássia Oliveira, pela sua amizade, compreensão, incentivo, dedicação, respeito, esclarecimentos, disponibilidade e sugestões valiosíssimas.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, pelo exemplo.

À dona Lígia Kerr e Gilda, pela atenção e carinho.

À meus pais João Tavares dos Santos e Joanissa Rosa Tavares, à quem devo a vida, pelo amor e pela forma que educaram-me.

Aos meus irmãos e irmãs: José, Maria de Jesus, Ana, Maria Rosa, Elsonita, Joaquim, Eliane e João Filho, por vocês serem o que são em minha vida.

*Aos meus cunhados (as), sobrinhos (as) e afilhados (as).
À todos os colegas da Biologia.*

Aos amigos de Laboratórios: Rosana, Maria Alice, Carlos, Coletto, Flávia, Cristiano, Patrícia, Eduardo, Renato, Juliano, Gislene, Gustavo, Vânia, Vanessa, Marcolino, Cícero, Alcione, Cláudio, Cristina(s), Juliana(s), Katiere, Ney, Ana Paula, Viviane, Frederico, Fernanda, Cláudio, Soraya, Luciene, Machain, Alessandra, Ana Cristina, Pablo, Jamil, Francis e Wânia.

Aos amigos(as), que não mediram esforços para colaborar na realização de algumas etapas deste trabalho: Bonetti,, Rosana, Eliomar, Maria Alice, Carlos, Coletto, Vânia, Gislene, Flávia, Patrícia e Luciene Sarmiento.

Aos secretários do INGEB, Marlene, Cida e Gerson.

Às secretárias do Curso de Ciências Biológicas: Sirlene e Helena.

Aos técnicos de laboratório: Anselmo, Chico e Belchior.

Aos professores: Oswaldo, Cecília, Thomás e demais professores e funcionários dessa Instituição.

À coordenadora do Curso de Ciências Biológicas, Ana Maria Coelho Carvalho.

Ao Chefe do Departamento de Genética e Bioquímica, Profº Dr. Malcon A. M. Brandeburgo.

Aos amigos e irmãos em Cristo: Pe. Osmar Bezutte, Pe. Eugênio, Diácono Fernando Leite e família.

Aos meus amados irmãos do GOU-Stº Inácio de Loyola (Grupo de Oração Universitário) e demais GOUS de Uberlândia. Pelos nossos momentos maravilhosos, nossas Partilhas, Vigílias, Encontros, Viagens, Serenatas, Intercessão, Núcleo, etc.. Não vou registrar aqui o nome de cada um, pois corro o risco de não lembrar o nome de todos, assim, saibam que o mais importante é que estamos todos no coração de Deus e Ele no coração de cada um de nós. Jamais esquecerei que: "Cristãos não se despedem, encontram-se na Eucaristia".

RESUMO

Com o objetivo de estudar a heterocromatina de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* foram realizadas análises que enfocaram, especialmente, os cromossomos metafásicos de larva defecante e pupas dessa espécie.

Foi possível desenvolver uma metodologia eficiente, para a obtenção de metáfases em vários estágios do desenvolvimento ontogenético, desde larva defecante até pupa de olho preto e corpo pigmentado, com a utilização de Cloreto de Cobalto (CoCl_2) definido esse composto como agente indutor de metáfases em abelhas.

Foi possível, também, verificar que a cromatina de *M.scutellaris*, assim como a de humanos e outros animais, é sensível ao composto 5-azacitidina, respondendo com descondesação da cromatina.

Os resultados obtidos com esses estudos em heterocromatina de *Melipona scutellaris* abrem perspectivas para o desenvolvimento de outras pesquisas, que fazem parte de nossos objetivos.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	01
I.1 Considerações sobre abelhas.....	01
I.2 Organização cromossômica.....	02
I.3 5-Azacidina.....	08
I.4 Cloreto de Cobalto (CoCl ₂).....	09
II. OBJETIVOS.....	10
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
III.1. Material biológico.....	11
III.2. Material de Laboratório.....	16
III.2.1 Tratamento com 5-Azacidina.....	17
III.2.2 Tratamento com Cloreto de Cobalto (CoCl ₂).....	17
III.2.3 Preparação de lâmina para Análise de Cromossomos Metafásicos.....	18
IV. RESULTADOS.....	20
IV.1 Efeitos da 5-azacidina em cromossomos metafásicos de <i>Melipona scutellaris</i>	20
IV.2 Efeitos do tratamento de larvas e pupas de <i>Melipona</i> <i>scutellaris</i> com Cloreto de Cobalto (CoCl ₂).....	22
V. DISCUSSÃO.....	25
VI. CONCLUSÕES.....	29
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

TABELA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS

DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
RNA.....	Ácido ribonucléico
LD.....	Larva defecante
POB.....	Pupa de olho branco
POR.....	Pupa de olho rosa
POM.....	Pupa de olho marrom
POP.....	Pupa de olho preto
POPP.....	Pupa de olho preto piguimentada
HPRH.....	hipoxantina guanina fosforibosiltransferase
TK.....	Thymidine Kinase
mC.....	Metilcitidina
CoCl ₂	Cloreto de Cobalto
KCl.....	Cloreto de Cálcio
C ₂₂ H ₂₅ NO ₆ , 0,005%.....	Colchicina
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ H ₂ O, 0,95%.....	Citrato de Sódio
C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₅	4-amino-1-β-D-ribofuranosyl-5-triazin-2 (1H)-one (5- Azacitidina)

I. INTRODUÇÃO

I.1 Considerações sobre abelhas

As abelhas podem ser agrupadas em duas famílias: Megachilidae e Apidae. Dentre os Apídeos são encontradas três subfamílias: Xylocopinae, Nomadinae e Apinae. Os Apinae estão divididos em 19 tribos, abrangendo indivíduos corbiculados, com concavidade na tíbia das patas posteriores, adaptadas ao transporte de pólen e resina e os não-corbiculados. A tribo Meliponini faz parte dos corbiculados (ALSINA & MICHENER, 1993).

As abelhas são holometábola, isto é, passam por metamorfose completa, desde larva vermiforme, passando por estágio de pupa, até o adulto voador; alimentam-se de néctar, pólen e mel e vivem socialmente em colônia, que compreende muitos indivíduos de dois sexos (macho e fêmea) e duas castas (rainha e operária) (STORER, 1991).

A Ordem Hymenoptera apresenta características que a tornam um interessante grupo para variados estudos de biologia, visto que se destaca pela grande diversidade de padrões de vida, nichos e evolução de formas sociais.

O sistema de determinação de sexo nos Apoidea é do tipo haplodiplóide, onde os machos se desenvolvem a partir de óvulos não fecundados e as fêmeas, a partir de óvulos fecundados por partenogênese arrenótoca (DZIERZON, 1845).

Os Hymenoptera da sub-família Meliponinae estão distribuídos ao longo da América Central, América do Sul, África, Austrália, Indonésia, dos quais, mais de 300 espécies já foram descritas. As abelhas são parte integrante do ecossistema e a sua principal função na natureza é a polinização das flores e consequente produção de sementes e frutos. As abelhas brasileiras sem ferrão

são responsáveis, conforme o ecossistema, por 40 a 90% da polinização das árvores nativas (KERR *et al.*, 1996).

Melipona scutellaris, popularmente conhecida como Uruçu do Nordeste, foi domesticada pelos Potiguara, Kiriri, Xucuru, Pataxo, Paiaku, Tupirucuba, Caete, Aymore, entre outros povos do Nordeste, cujas técnicas de manejo foram, imediatamente, passadas aos lavradores portugueses que muito apreciavam seu mel. A destruição das florestas nordestinas diminuiu muito o número de meliponicultores porém, recentemente, devido à habilidade dessas abelhas em coletar pólen, e assim realizarem a polinização, elas vêm sendo novamente cultivadas. KERR *et al.*, (1996) recomendam que os meliponários contenham, no mínimo, 44 colméias, para evitar a perda das colônias pela redução do número de alelos sexuais, o que leva à produção de machos diplóides que são mortos pelas operárias. Em pouco tempo, o número de indivíduos da colônia abaixa e ela se extingue.

KERR (1948) determinou $2n=18$ cromossomos para fêmea de *Melipona rufiventris* e *Melipona marginata*, sendo esse o primeiro registro citogenético para esse gênero.

1.2 Organização cromossômica

O comando central da diferenciação e da morfogênese está no genoma, ele é capaz de comandar a síntese de todas as macromoléculas que um organismo necessita ao longo de sua vida, pelo menos em tese. Nas células somáticas de eucariotos, o DNA está associado a proteínas básicas (histonas) formando um complexo núcleo-protéico, ao qual se associam também as proteínas ácidas (proteínas nucleares não-histonas) e o chamado RNA nuclear ou cromossomal. Esta gigantesca associação macromolecular apresenta, em

células quiescentes (não-divisão) uma estrutura enovelada, conhecida como cromatina. A estrutura da cromatina (Figura 1) é semelhante a um colar de pérolas, sendo o fio do colar a cadeia dúplex do DNA e cada "pérola" um agregado de quatro tipos de histonas. A cromatina de diferentes células é classificada em duas categorias: cromatina condensada, que corresponde à heterocromatina, que se cora fortemente em presença de corantes específicos e cromatina estendida ou "frouxa", que corresponde à eucromatina. A proporção de histonas nestas duas frações é a mesma, porém a proporção de proteínas cromossômicas não-histônicas, na forma "frouxa", é bem maior (MOTTA, 1980).

Durante a divisão celular ocorrem algumas alterações nucleares, das quais a mais importante é, sem dúvida, a condensação da cromatina. Na intérfase e no início da prófase, a cromatina está na forma de eucromatina e durante a divisão celular, a cromatina vai, aos poucos, assumindo a forma de heterocromatina, localizando-se na vizinhança dos centrômeros, nas extremidades dos braços cromossômicos (telomérica) ou em outras posições ao longo do cromossomo (BURNS & BOTTINO, 1989).

Em nível molecular, a constituição da heterocromatina é caracterizada como uma associação de sequências altamente repetitivas de códigos não-protéicos (PARDUE & HENNIG, 1990) que se cora fortemente com Tripsina e Giemsa (GELEHRTER & COLLINS, 1992). Citogeneticamente, a heterocromatina pode ser detectada pela técnica de Banda-C (SUMNER, 1990), a qual mostra que sua distribuição e conteúdo nos cromossomos varia entre os diferentes organismos, tendo por isso um importante papel na diferenciação do cariótipo.

Em algumas espécies, é possível reconhecer, por técnicas simples de coloração, em quais regiões dos cromossomos se situam os blocos heterocromáticos, uma vez que, na prófase, esses blocos são mais condensados que o restante do cromossomo. Essas regiões coincidem com as

regiões de síntese tardia, reveladas pela timidina tritiada, demonstrando, portanto, que a heterocromatina difere da eucromatina por se replicar ao final da fase S. Os primeiros citogeneticistas observaram que, após a telófase, quando os cromossomos voltavam ao estado descondensado, alguns cromossomos ou segmentos cromossômicos mantinham-se condensados, e apareciam no núcleo interfásico, como blocos mais corados, os cromocentros. BROWN, 1966 (*apud* GUERRA, 1988) fez uma revisão do que se conhecia sobre heterocromatina e concluiu haver pelo menos dois tipos distintos, que ele chamou de heterocromatina constitutiva e heterocromatina facultativa. A constitutiva se caracteriza pelas propriedades de: a) permanecer condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células do indivíduo; b) geralmente, concentrar-se em blocos no cromossomo, os quais se distribuem, preferencialmente, nas regiões próximas ou terminais dos cromossomos e, também, em torno da constrição secundária; c) aparecer em ambos os homólogos, na mesma posição e com o mesmo tamanho; d) não conter genes estruturais ou só muito excepcionalmente, apresentar regiões codificantes; e) ser o local onde se situa, se não todo ao menos a maior parte, o DNA satélite, embora a heterocromatina constitutiva não seja formada exclusivamente de DNA satélite.

A heterocromatina facultativa é, por definição, um tipo de cromatina que, as vezes, se comporta como heterocromatina (mantém-se condensada durante a intérfase, apresenta replicação tardia e ausência de expressão gênica) as vezes, como uma típica eucromatina. Além disso, distingue-se da constitutiva pelas seguintes características: a) aparece em apenas um dos homólogos de cada par cromossômico; b) envolve todo o cromossomo e não apenas blocos; c) não possui nenhuma particularidade quanto à composição do DNA. Na verdade, a composição dessa heterocromatina é típica de eucromatina, não sendo rica em DNA satélite ou carente em genes.

A heterocromatina facultativa pode conter, também, genes que estão permanentemente inativos em algumas linhagens de células mas não, necessariamente, em outras. Esse é o caso do cromossomo X de mamífero. No macho, o cromossomo X, é primariamente, eucromático. Na fêmea, um X é, aleatoriamente, inativado, tornando-se heterocromático. Portanto, parece que a atividade transcricional de um cromossomo inteiro pode estar relacionado, a sua organização estrutural e nesse caso, uma intensa e permanente condensação do material genético resultaria em inatividade genética (BURNS & BOTTINO, 1989).

O DNA de células de eucariotos, como já foi dito, está complexado com proteínas, especialmente histonas, formando a cromatina. Os resíduos de aminoácidos da porção N terminal de cada histona (20-60 resíduos) são ricos em lisina e estendem-se para a superfície do nucleossomo (estrutura formada pelo empacotamento de 146 pares de bases do DNA em um “core” de 8 histonas) e podem ser modificados por metilação, fosforilação ou pela adição de ubiquitina. A metilação e acetilação das histonas estão associadas à regulação da expressão gênica durante a intérfase. Genes em regiões do DNA que estão condensados na forma de heterocromatina, são inacessíveis à RNA polimerase e outras proteínas requeridas para transcrição (LODISH *et al.*, 2000; NELSON & COX, 2000).

Em estudo de conteúdo e composição da heterocromatina em oito espécies de abelhas do gênero *Melipona*, entre elas, *M. scutellaris*, ROCHA e POMPOLO (1998) confirmaram o número cromossômico para esta espécie, $2n=18$ (para fêmeas) e $n=9$ (para machos) e observaram que diferentes espécies de *Melipona* apresentam uma ampla variação no conteúdo heterocromático. Segundo essas autoras, em *M. scutellaris*, a heterocromatina ocupa quase toda a extensão de todos os cromossomos, com a eucromatina limitada às extremidades.

Uma das principais características da heterocromatina é a ausência de atividade gênica. O fato de que esse tipo de cromatina se encontra constantemente condensado, e, que o estado condensado se encontra comumente associado ao bloqueio de transcrição, sugere que mesmo que ocorram genes na heterocromatina estes estarão permanentemente bloqueados. Estudos tem demonstrado a relação entre condensação cromatínica e atividade gênica (GRIFFITHS *et al.*, 2000).

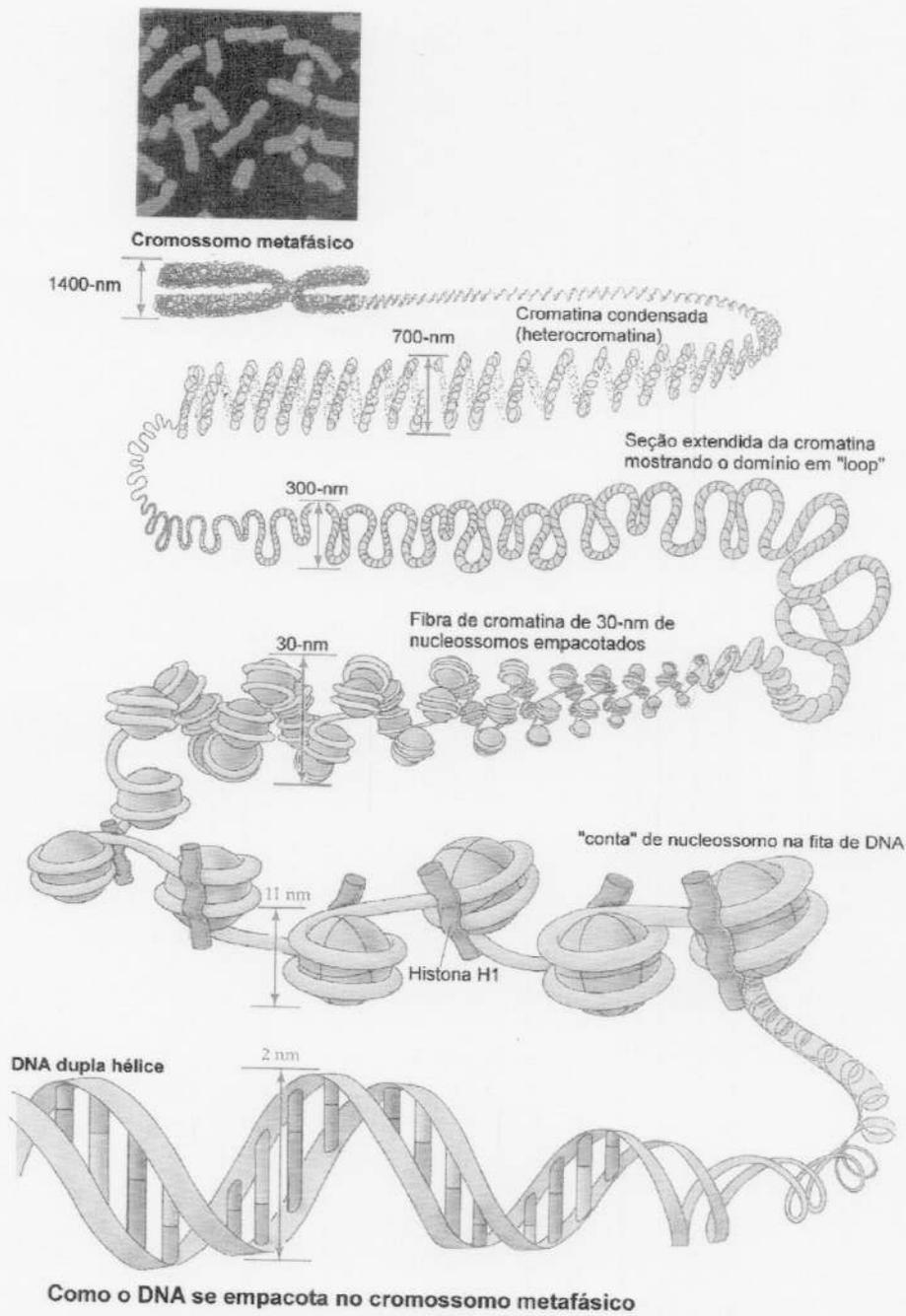


Figura 1: Ultra estrutura do cromossomo metafásico (adaptado de PURVES *et al.*, 1995).

1.3 5-Azacitidina

A 5-azacitidina, de composição química $C_8H_{12}N_4O_5$ e nomenclatura 4-amino-1- β -D-ribofuranosyl-5-triazin-2(1H)-one, é um análogo da base nitrogenada Citosina, que faz parte dos ácidos nucléicos DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico). Em vertebrados, o resíduo de Citosina é, frequentemente, modificado por metilação. Em eucariotos, estima-se que 5% das Citosinas sejam metiladas a 5 metilcuidina, nas duas fitas do DNA (GRIFFITHS *et al.*, 2000). O análogo 5-azacitidina que pode ocupar, no DNA, o lugar da Citosina, não sofre metilação. O estado de metilação do DNA implica em alteração na sua atividade de transcrição para produção de mRNA. Sabe-se, ainda, que a metilação do DNA reprime a migração de Transposons (LODISH *et al.*, 2000).

Em humanos, a 5-azacitidina é capaz de induzir a descondensação cromossômica quando aplicado em culturas de linfócitos, de acordo com a dose e tempo de tratamento (SCHMID *et al.*, 1984). Esses autores usaram a 5-azacitidina para induzir descondensação da heterocromatina constitutiva dos cromossomos 1,9,15,16 e Y humanos.

O tratamento de culturas de células de mamíferos com azacitidina evita a condensação de regiões cromossômicas definidas. Estudos tem mostrado que esse composto inibe condensação de cromatina somente quando usado durante a fase S, por se incorporar ao DNA, durante a replicação (VIEGAS-PÉQUIGNOT & DUTRILLAUX, 1976 *apud* VIEGAS-PÉQUIGNOT & DUTRILLAUX, 1981).

HAAF *et al.*, (1993) trataram com 5-azacitidina o cromossomo X de replicação tardia de fêmea de mamífero e demonstraram a eficiência e utilidade desse composto para análise e estudo de heterocromatina.

Clones de células híbridas de camundongos e humanos, com cromossomo X normalmente inativado, deficientes para a enzima HPRT (hipoxantina guanina fosforibosiltransferase) foram tratados com 5-azacitidina e testados para reativação e expressão de genes ligados ao X. A frequência de clones com enzima ativa foi maior do que no Controle não tratado (MOHANDAS *et al.*, 1981). Esses autores obtiveram evidências de submetilação na cromatina ativa e conseguiram reativar a expressão de genes do cromossomo X. O nível de expressão gênica e o grau de metilação são inversamente proporcionais. A 5-azacitidina, que não pode ser metilada após sua entrada no DNA, promove a expressão de genes em tecidos onde normalmente eles não se expressam (GRIFFITHS *et al.*, 2000).

I.4 Cloreto de Cobalto (CoCl₂)

Em humanos, grandes quantidades de Cloreto de Cobalto (CoCl₂) reprimem a produção de eritrócitos, provoca ruborização cutânea, dermatites, náusea e vômitos (BUDARI *et al.*, 1989).

FARAH (1983) analisou células somáticas e germinativas de machos de *Mesocricetus auratus* (hamster) de 6 a 16 semanas de vida, tratados com solução de Cloreto de Cobalto, com a finalidade de investigar a influência da persistência nuclear na não-disjunção cromossômica. Ocorreu aumento significativo de hiperdiploidia e pseudodiploidia.

II. OBJETIVOS

- ◆ Obtenção de metáfases nos diferentes estágios de pupas de rainhas, operárias e machos de *Melipona scutellaris*, que receberam ou não tratamento com Cloreto de Cobalto(CoCl_2)
- ◆ Verificar se o análogo de base 5-azacitidina tem ação na descondensação dos cromossomos de *Melipona scutellaris* e comparar os resultados com aqueles descritos para humanos e outros organismos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Material biológico

O material biológico utilizado foi a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*, de ambos os sexos (macho e fêmea) e castas (rainha e operária) provenientes da Bahia (Catu, Murici e Alagoinhas) e mantidas no Meliponário-Uberlândia. Esse localiza-se na Fazenda Água Limpa/UFU, que dista 30 Km de Uberlândia-MG (latitude sul de 18° 55' 23" e longitude oeste de Greenwich de 48° 17' 19") no Triângulo Mineiro, com fitogeografia de Cerrado.

Foram utilizados gânglios cerebrais (Figura 2) de larva defecante (LD), pupa de olho branco (POB), pupa de olho rosa (POR), pupa de olho marrom (POM), pupa de olho preto (POP) e pupa de olho preto pigmentada (POPP) de machos, rainhas e operárias de *Melipona scutellaris* (Figura 3).

O dimorfismo sexual, na fase de pupa, pode ser evidenciado por meio do gonóstilo (Figura 4) que se localiza na região posterior-ventral do abdômen. Os machos possuem dois gonóstilos, enquanto as fêmeas possuem apenas um.

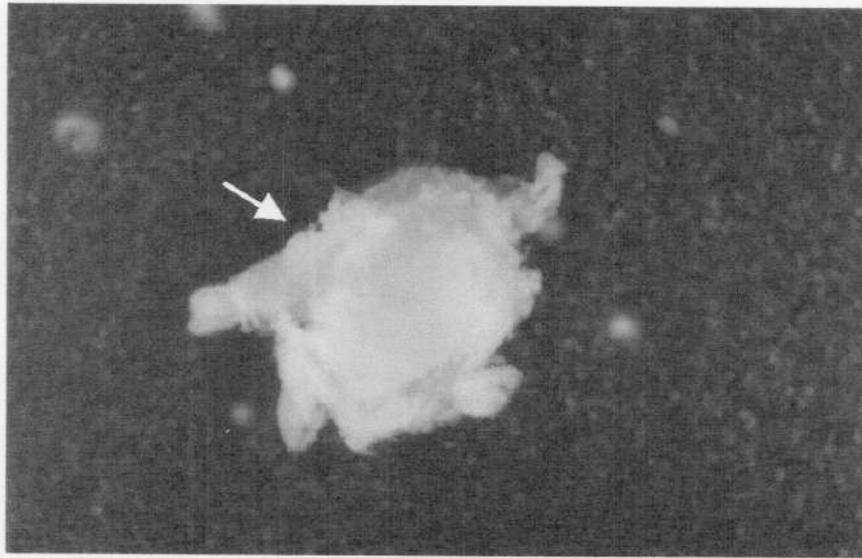


Figura 2. Gânglio cerebral (seta) de *Melipona scutellaris*.

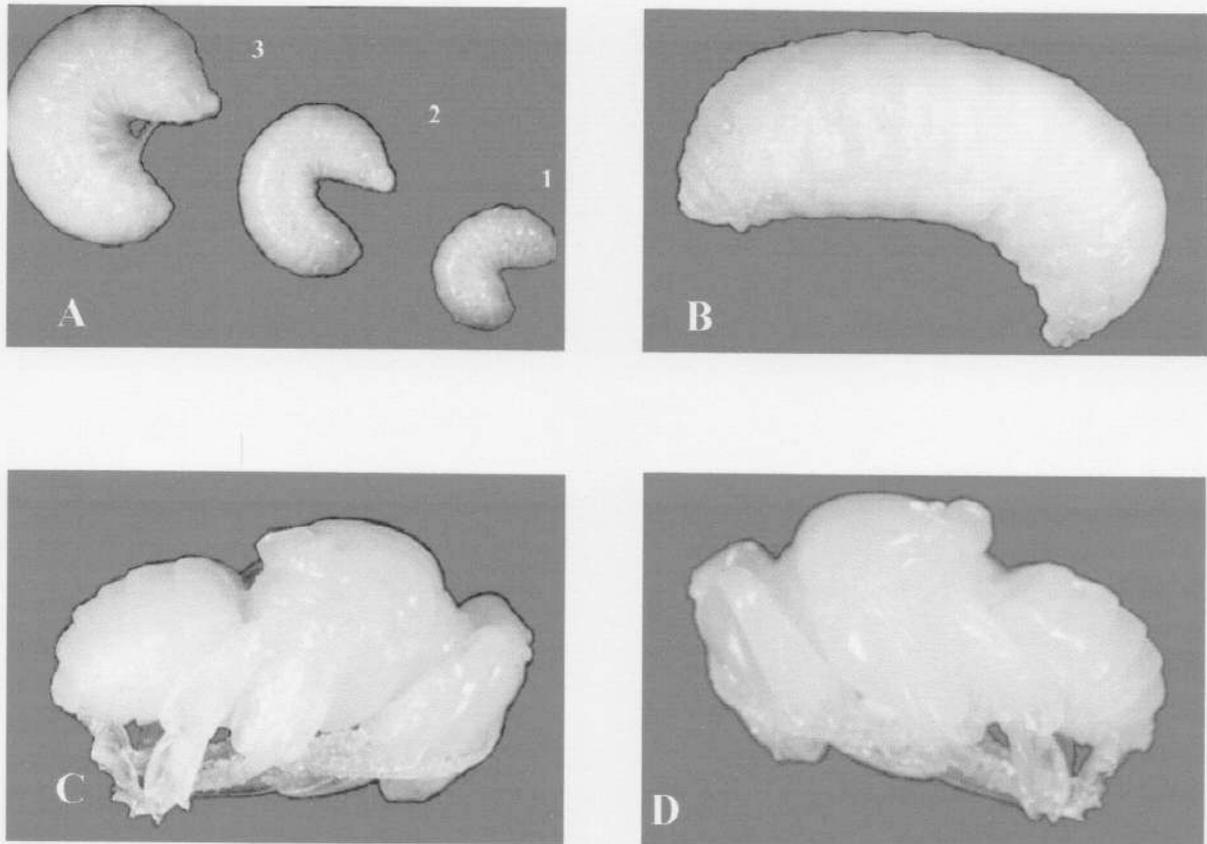


Figura 3: Fases do desenvolvimento ontogenético de *Melipona scutellaris*:

A: Larva 1 (1), Larva 2 (2), Larva 3 (3)

B: Larva Defecante

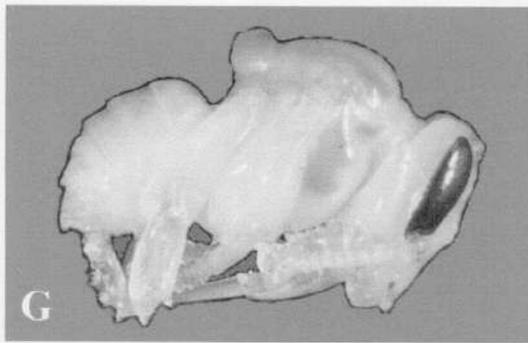
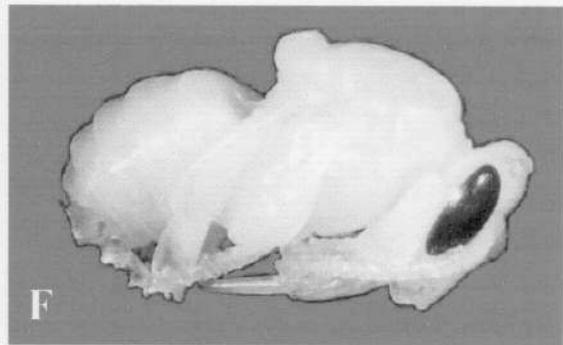
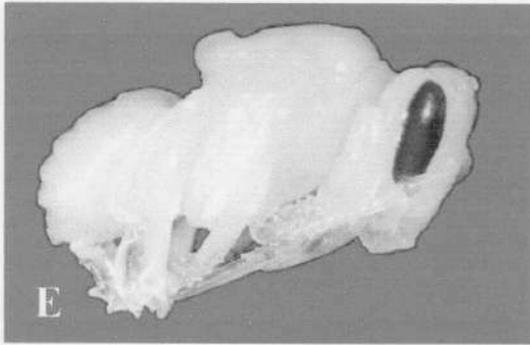
C: Pupa de Olho Branco

D: Pupa de Olho Rosa

E: Pupa de Olho Marrom (Fls. 14)

F: Pupa de Olho Preto (Fls. 14)

G: Pupa de Olho Preto Pigmentada (Fls. 14)



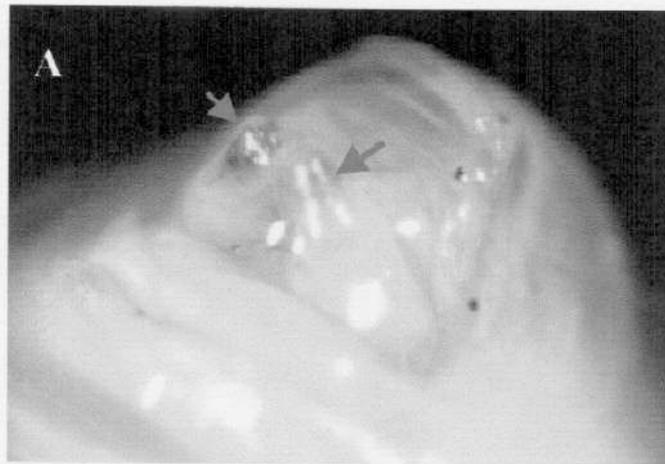


Figura 4: Gonóstilos (setas) de macho (A) e fêmea (B).

III.2. Material de Laboratório

- ◆ Solução de colchicina 0,1%
- ◆ Solução de citrato de sódio 1%
- ◆ Fixador I: 1,5ml de ácido acético glacial: 1,5ml de etanol: 2ml de água duplamente destilada (H₂O dd)
- ◆ Fixador II: 2ml de ácido acético glacial: 2ml de etanol
- ◆ Fixador III: ácido acético glacial 100%
- ◆ Metanol
- ◆ Glicerina
- ◆ Água duplamente destilada
- ◆ Giemsa
- ◆ Cloreto de Cobalto (4mg/ml)
- ◆ 5-Azacitidina 1%
- ◆ Lâminas
- ◆ Estiletes
- ◆ Papel de fotografia Kodadrome RC, Contraste S3
- ◆ Filme de fotografia ASA 400 e 125
- ◆ Câmara escura
- ◆ Cartela de comprimidos vazia
- ◆ Conta-gotas
- ◆ Pinça
- ◆ Placas de Petri
- ◆ Papel de filtro
- ◆ Estereomicroscópio
- ◆ Microscópio óptico
- ◆ Estufa de Cultura à 32°C
- ◆ Freezer

III.2.1 Tratamento com 5-Azacidina

Pupas de olho branco (POB) de operárias foram submetidas à aplicação tópica de 1µl da solução de 5-azacidina à 1% (0,125g de 5-azacidina : 12,5 ml de H₂O deionizada) na região dorsal. Após 2 horas, procedeu-se à extração do glânglio cerebral. A preparação das lâminas foi feita conforme itens III.2.3. Em um dos experimentos foram aplicados 4µl da solução em uma pupa de operária e uma de rainha.

No grupo controle aplicou-se 1µl de água, e os indivíduos foram igualmente manipulados.

III.2.2 Tratamento com Cloreto de Cobalto (CoCl₂)

Para obtenção de células metafásicas, em fases posteriores à Larva Defecante e Pupa de Olho Branco e, também, para melhorar a qualidade e quantidade de metáfases para análises citológicas, introduzimos, nesse trabalho, uma modificação da técnica descrita por CUCCHI & BARUFFALDI, 1990 (*apud* MARGARIDO, 1995) que utilizaram cloreto de cobalto (CoCl₂) para aumentar a frequência de metáfases em peixes.

Foram aplicados, topicamente, 4µl de solução aquosa de cloreto de cobalto (4mg:1ml) na região dorsal de larvas defecantes (LD), pupa de olho branco (POB), pupa de olho rosa (POR), pupa de olho marrom (POM), pupa de olho preto (POP) e pupa de olho preto pigmentado (POPP) de *M. scutellaris*. Após aplicação do CoCl₂, foram testados vários intervalos de tempo, de 5 horas até 7 dias, para verificar o mais eficiente para obtenção do resultado final, a indução de metáfases. As larvas e pupas foram conservadas em estufa à 32° C,

com umidade relativa de 85%, mantida por meio de solução saturada de KCl (ASTM, 1951). A preparação das lâminas foi feita conforme itens III.2.3.

No grupo controle aplicou-se 4µl de água, e os indivíduos foram igualmente manipulados.

III.2.3 Preparação de lâmina para Análise de Cromossomos Metafásicos

As lâminas para análise citogenética foram preparadas segundo a técnica de IMAI *et al.*, (1988).

Faz-se a dissecação do glânglio cefálico em solução hipotônica de colchicina sobre lâmina pré lavada.

Com auxílio de pinças e estiletos remove-se o excesso de gordura e tecidos adjacentes e, em seguida, transfere-se o glânglio cefálico para um recipiente individual, contendo solução fresca de colchicina - citrato, ($C_{22}H_{25}NO_6$, 0,005%, - $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 0,95%) onde o material permanece por 2 horas, à temperatura ambiente e em ausência de luz.

Cada glânglio hipotonizado é transferido para outra lâmina limpa, em inclinação de mais ou menos 20° para que a solução hipotônica seja drenada.

O Fixador I é colocado sobre o material, na lâmina inclinada. Em seguida, retira-se o excesso de líquido com um papel filtro e repete-se a operação. Dissocia-se o tecido, com auxílio de estiletos. Adiciona-se sobre a lâmina, duas gotas do Fixador II antes que o Fixador I evapore. Retira-se o excesso do Fixador II com um papel filtro e adiciona-se duas gotas do Fixador III.

Secar à temperatura ambiente por um período de 24 horas. Corar com solução de Giemsa e Tampão Sörensen ($Na_2 HPO_4$, 0,06 M; $KH_2 PO_4$, 0,06 M; pH- 6.8) na proporção de 1:30, por 20 minutos.

Lava-se em água corrente e analisa-se em microscópio óptico (NIKON, modelo MICROPHOT - FXA).

Para retirar, macerar e fixar os gânglios foi utilizado um estereomicroscópio (WILD, modelo 308700).

As lâminas foram fotografadas com filme Asa 125 e copiadas em papel Kodadrome RC, Contraste S3.

IV. RESULTADOS

IV.1 Efeitos da 5-azacitidina em cromossomos metafásicos de *Melipona scutellaris*

As pupas de olho branco e operárias tratadas com 5-azacitidina por duas horas foram submetidas a análise citológica e apresentaram característica descondensação cromossômica, em comparação com as lâminas Controle, de pupas que não receberam tratamento, como mostra a Figura 5.

O efeito de descondensação foi o mesmo quando se aplicou 1 μ l e 4 μ l da solução de 5-azacitidina. O efeito em pupas de operárias e de rainhas, também foi o mesmo, embora tenha sido analisada uma única pupa de rainha, o que não é suficiente para uma conclusão definitiva. O experimento deve ser repetido. A descondensação ocorreu ao longo de todo cromossomo.

Não foram feitos testes para verificar se os efeitos da 5-azacitidina são dependentes ou não do tempo de exposição dessa espécie à droga.

Foram realizados poucos experimentos com esse composto pelo fato dele ser altamente tóxico e mutagênico.

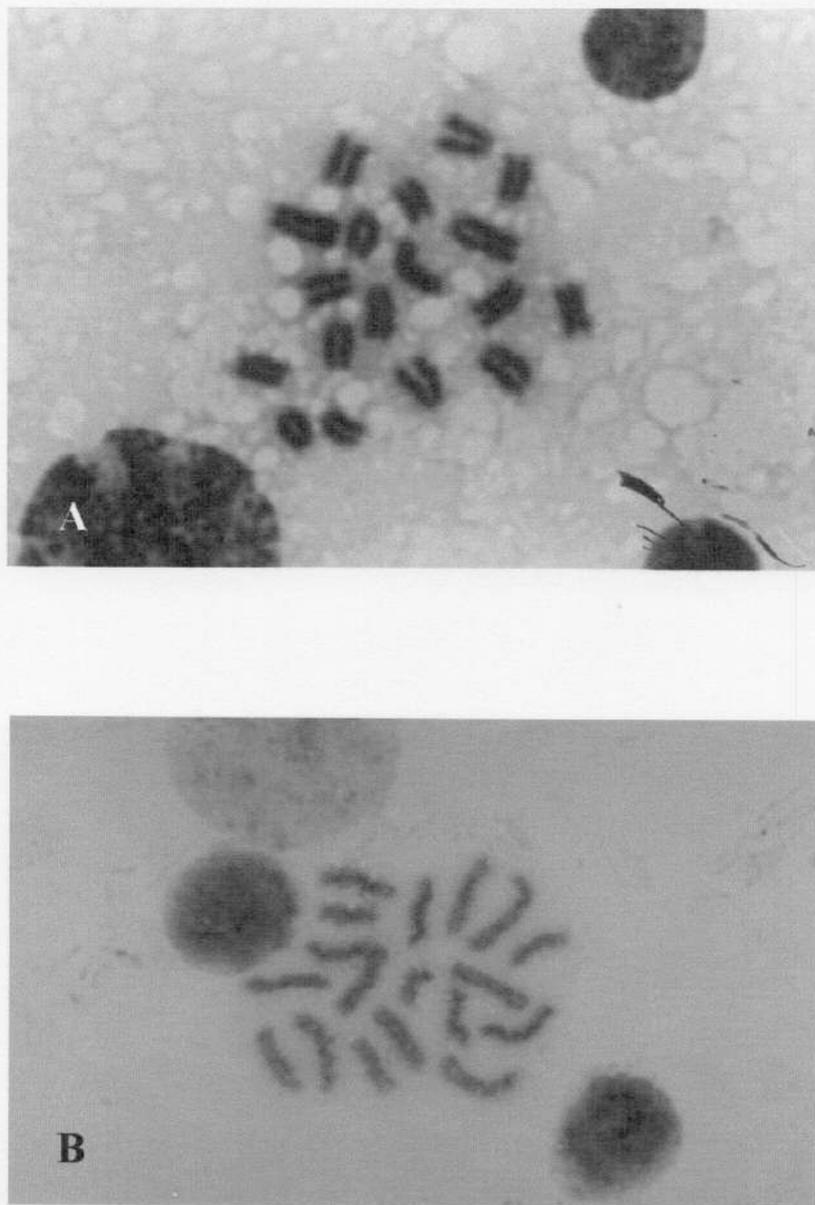


Figura 5: Metáfases de *Melipona scutellaris*: pupa de operária não tratada (A) e tratada com 5-azacitidina (B). Aumento 100X.

IV.2 Efeitos do tratamento de larvas e pupas de *Melipona scutellaris* com Cloreto de Cobalto (CoCl_2)

Nesse trabalho utilizou-se 4 μl de solução de Cloreto de Cobalto aplicados topicamente nas larvas e pupas. CUCCHI & BARUFFALDI, 1990 (*apud* MARGARIDO, 1995) recomendaram o uso de 0,5ml desta solução para cada 100g de peso de animal. Em larvas e pupas de *M. scutellaris*, cujo peso médio é de 120 mg, deveria ser utilizado 0,75 μl dessa solução para manter a proporção recomendada, caso a administração fosse intraperitoneal. Em abelhas a injeção fica prejudicada e por isso optamos pela aplicação tópica, que produz resultados satisfatórios.

O número de metáfases obtidas a partir do tratamento de larvas defecantes, pupas de olho branco, rosa, marrom, preto e pupa de olho preto pigmentada em *Melipona scutellaris* com solução de Cloreto de Cobalto quando comparado com metáfases obtidas de indivíduos que não receberam tratamento com esse composto, aumentou (Figura 6) embora não tenham sido feitos testes de significância. O tempo de tratamento que se mostrou mais adequado para a obtenção dos resultados aqui apresentados foi o de 24 horas. Estes resultados confirmam os dados já descritos para peixes obtidos por CUCCHI & BARUFFALDI, 1990 (*opcit* MARGARIDO, 1995). É importante relatar que, mesmo sem o tratamento com Cloreto de Cobalto (indivíduos Controle) foram obtidas metáfases, desde o estágio de Larva Defecante até Pupa de Olho Preto. A grande variação que se verificou foi com relação ao número de metáfases obtidas.

As fotos das Figura 6 foram apresentadas em diferentes aumentos porque as lâminas foram processadas em momentos distintos e fotografadas. Não pudemos fotografar, novamente, quando preparamos para montagem dessa

porque o material das lâminas havia sido perdido devido ao seu breve tempo de vida.

A umidade relativa de 85% obtida por meio de solução saturada de KCl à 32°C de temperatura mostrou-se eficiente para manutenção das pupas (experimentais e controle) em condições saudáveis, assim como já havia sido verificada para essa e outras espécies de *Melipona* e de uso rotineiro no Laboratório de Genética/UFU.

Não foram testadas concentrações diferentes de CoCl_2 .

As lâminas igualmente preparadas, de machos revelaram $n=9$ cromossomos, conforme o descrito por Kerr (1948) e confirmado por Rocha e Pompolo (1998). Não foi feito tratamento de lâminas de macho com 5 Azacitidina e CoCl_2 . O número de machos à época do experimento era reduzido.

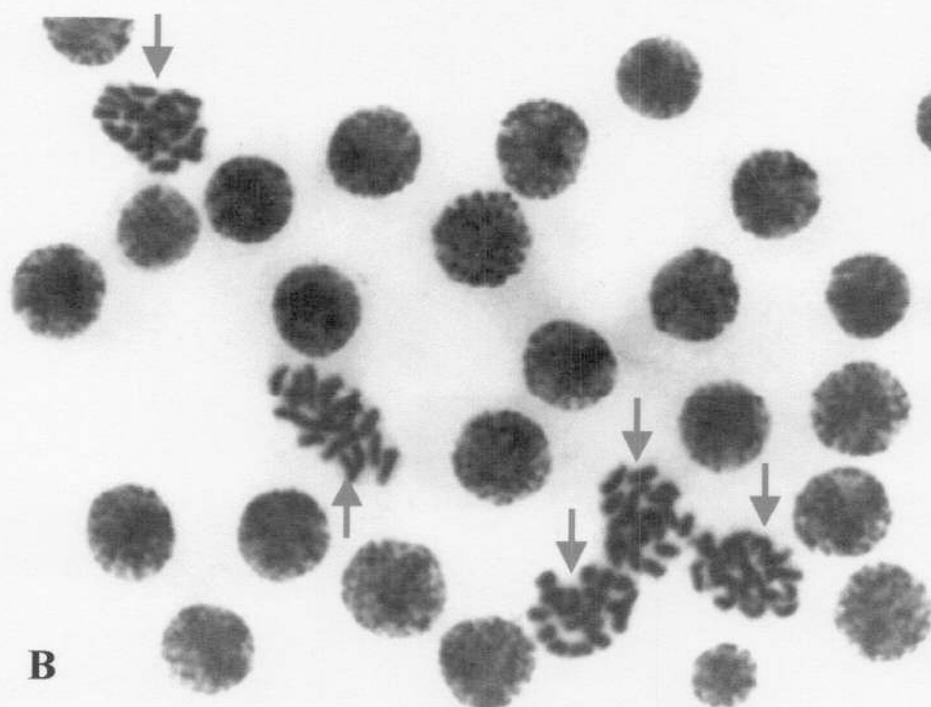
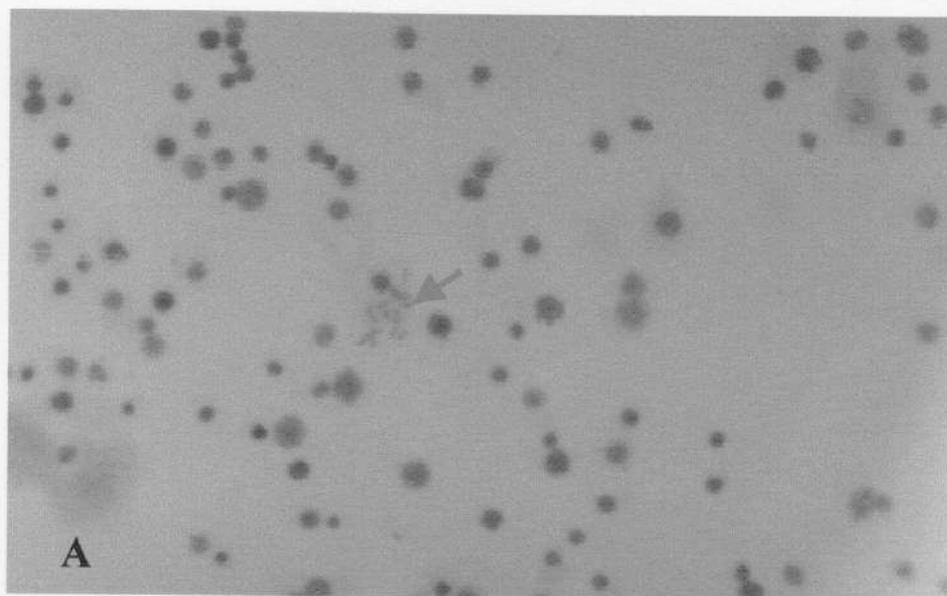


Figura 6: Metáfases (setas) de *Melipona scutellaris* que não receberam tratamento (A) e que receberam tratamento com Cloreto de Cobalto (B). Em A, aumento de 10X e em B de 100X.

V. DISCUSSÃO

A expressão de genes é regulada por meio de vários processos que afetam as taxas pelas quais os produtos gênicos são sintetizados ou degradados, sendo que a taxa de transcrição de diferentes genes determina o funcionamento e as propriedades das células e tecidos. A regulação da expressão gênica é a base da diferenciação celular e do funcionamento equilibrado dos diferentes tipos celulares em um organismo pluricelular. A atividade de transcrição em cada célula depende do estado da cromatina e esta pode se apresentar, em um organismo vivo, sob duas formas, eucromatina e heterocromatina. Por definição, a eucromatina constitui-se em regiões de atividade de transcrição, enquanto que na heterocromatina, o DNA está inativo transcricionalmente. A cromatina ativa em transcrição é estruturalmente distinta da cromatina inativa e sabe-se que o DNA de cromatina inativa frequentemente, apresenta resíduo de citidina modificado a metilcitidina (mC) por metilação, via enzima Dam metilase.

Quando, em um organismo, a transcrição de um gene não é necessária, a metilação do nucleossomo é aumentada, tornando a cromatina transcricionalmente inativa, como parte do processo de silenciamento gênico.

O papel da metilação do DNA e funcionamento gênico tem sido estudados por vários laboratórios buscando, especialmente, gerar uma estrutura cromossômica que permita transcrições de regiões silenciosas para estudos de citodiferenciação e programas de ativação de estruturas cromatínicas em regiões de heterocromatina.

Células inativas de camundongos com *Herpes simplex*, com o gene TK (Thymidin Kinase) inativo, foram ativadas transcricionalmente com tratamento de 3 μ M de 5-azacitidina (CLOUGH *et al.*, 1982).

Cromossomos X, de replicação tardia em fêmea de mamíferos, foram analisados após tratamento com 5-azacitidina e o tratamento demonstrou ser de

grande eficiência e utilidade para estudos de heterocromatina (HAAF *et al.*, 1993).

MOHANDAS *et al.*, (1981) conseguiram reativar a expressão de genes do cromossomo X em mamíferos, com aplicação de 5-azacitidina, que ao entrar no DNA no lugar de uma citosina e não aceitando metilação fez com que os genes daquela região passassem a se expressar.

Em genes de retrovírus de aves, a estrutura da cromatina pode ser modificada pela exposição das células à 5-azacitidina, que produz hipometilação e ativação transcricional do vírus ev-1, (GROUDINE *et al.*, 1981).

Em cromossomos humanos, a 5-azacitidina induziu nítida descondensação da cromatina (SCHMID *et al.*, 1984).

O que despertou nosso interesse para análise cromossômica de *Melipona scutellaris* utilizando 5-azacitidina foi, primariamente, o fato de abelhas *M. scutellaris* apresentarem alto grau de condensação cromatínica, tendo sido classificadas por ROCHA e POMPOLO (1998) em grupo de alto conteúdo de heterocromatina, com cromatina condensada ocupando quase toda extensão do cromossomo, com a eucromatina, limitada às extremidades.

Nossos resultados demonstraram (Figura 5) que, assim como em cromossomos humanos e de outros organismos, a 5-azacitidina é eficiente na descondensação de cromossomos de abelhas.

Não é possível definir, pela metodologia utilizada a quantidade de Citosinas substituídas pela 5-azacitidina, mas é possível afirmar, pela observação dos resultados, que as regiões heterocromáticas contém DNA altamente metilado, visto que como resultado da submetilação ocorreu descondensação da heterocromatina. Esse resultado indica, ainda, a presença de regiões com bases GC ao longo de toda heterocromatina. Como não foram detectadas, nessa análise, blocos que não descondensaram, isso pode ser indicativo de ausência ou, pelo menos, pequena quantidade de blocos AT.

A heterocromatina de abelha apresenta a característica de ser sensível à 5-azacitidina, assim como a heterocromatina humana e de outros organismos. Nosso interesse em testar a droga 5-azacitidina veio, também, do fato de a 5-azacitidina provocar submetilação e com isso promover a transcrição do segmento de DNA onde a base Citosina é substituída pela 5-azacitidina. As consequências disso na expressão gênica em abelhas são desconhecidas mas, se é possível promover a descondensação da heterocromatina por meio de tratamento com 5-azacitidina, como ficou demonstrado nesse trabalho, algumas hipóteses podem ser levantadas a partir dos conceitos inerentes à expressão gênica e resultados apresentados na literatura.

Em Hymenoptera, de modo geral, o número de metáfases que se obtém em boas preparações citológicas restringe-se a material nas fases de larva, prepupa (POMPOLO & TARAHASHI, 1990; COSTA *et al.*, 1993; GOMES *et al.*, 1995; POMPOLO & CAMPOS 1995; CAXEIRO & POMPOLO 1998 e 1999; MARCOLINO *et al.*, 1998; ALVES, *et al.*, 1999; BRITO-RIBON *et al.*, 1999a 1999b; COSTA *et al.*, 1999) e pupa de olho branco (COSTA *et al.*, 1992), não tendo sido descrito, até o momento, uma metodologia eficiente para obtenção de boas metáfases em fases posteriores de desenvolvimento dessa ordem.

Em função disso, decidimos testar uma nova metodologia para indução de metáfases em abelhas, adaptando uma técnica que CUCCHI & BARUFFALDI 1990 (*apud* MARGARIDO, 1995) utilizaram para peixes. O resultado foi positivo, conforme demonstrado pelas fotos de lâminas (Figura 6).

A análise realizada por FARAH (1983) com células de hamster mostrou que o Cloreto de Cobalto é uma ferramenta útil para estudos cromossômicos, mostrando-se superior ao tioacetamida e 5-fluorodeoxiuridina, testados por outros pesquisadores, para tal análise. Os resultados dessa autora mostraram hiperdiploidia e pseudodiploidia como efeito do CoCl_2 em células de hamster.

Em nossas análises não se observou alteração do número de cromossomos em função do tratamento a que foram submetidos as larvas e pupas.

O mecanismo pelo qual o CoCl_2 intensifica ou induz o número de metáfases, ou seja, a razão pela qual o ciclo celular é influenciado ou alterado, não é conhecido. Sabe-se que o Cobalto age na transcrição de RNA. TRES *et al.*, (1972) observaram correlação positiva entre a biossíntese de RNA ribossomal e a quantidade de cations no núcleo. Esses resultados indicam efeitos do CoCl_2 na atividade da RNA polimerase.

Os objetivos atingidos em nossa pesquisa com as metodologias testadas e otimizadas por nós abrem ótimas perspectivas para estudos em regulação da expressão gênica em abelhas e outros eucariotos.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir de nossa investigação sobre a heterocromatina de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* permitiram verificar que:

- ◆ Cromossomos de *M. scutellaris* são sensíveis ao composto 5-azacitidina, respondendo com nítida descondensação da cromatina. Os resultados obtidos com a metodologia utilizada para indução de descondensação, indicam a presença de bases GC ao longo da heterocromatina dessas abelhas.
- ◆ Cloreto de Cobalto é um eficiente agente indutor de metáfases em abelhas *M. scutellaris*, promovendo o aumento significativo de metáfases nos indivíduos tratados em relação ao Controle;
- ◆ Metáfases foram obtidas em pupas, independentemente da utilização do CoCl_2 , porém em menor número. Preparações adequadas de cromossomos metafásicos em pupas de abelhas não haviam sido, até então, relatadas na literatura;

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSINA, A. R. & MICHENER, C.D. (1993). Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Science Bulletin** **55** (4-5): 123-173
- ALVES, V. S. & POMPOLO, S. das G. (1999). Análise citogenética comparativa de quatro gêneros de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Genetics and Molecular Biology** **22** (3) SUPPLEMENT: 28.
- ASTM (1951). American Society for Testing Materials Recommended Practice for Maintaining Constant Relative Humidity by Means of Aqueous Solutions.
- BRITO-RIBON, R. M.; COSTA, K F. & MIYAZAWA, C. S. (1999). Cytogenetic data of eight stingless bee species (Hymenoptera, Apidae, Liponinae) from cerrado areas of Mato Grosso State - Brazil. **Genetics and Molecular Biology** **22** (3) SUPPLEMENT: 30.
- BRITO-RIBON, R. M.; MIYAZAWA, C. S. & POMPOLO, S. das G. (1999). Cytogenetic characterization of four *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) from Mato Grosso State - Brazil, using C Banding and DA/CMA. **Genetics and Molecular Biology** **22** (3) SUPPLEMENT: 29.
- BUDARI, S. B.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A. & HECKELMAN, P. E. (1989). **The Index Merck**, 11a. Edição, Editora Merck, p 381.

- BURNS, G. W & BOTTINO, P. J. (1989). **Genética**. (Trad. CAMPOS, J. P & MOTTA, P. A – 1991). 6 ed., Rio de Janeiro – RJ, Ed. Guanabara Koogan: 45-46.
- CAIXEIRO, A. P. de A. & POMPOLO, S. das G. (1999). Caracterização Citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo do gênero *Plebeia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Genetics and Molecular Biology** 22 (3) SUPPLEMENT: 31.
- CAIXEIRO, A. P. de A. & POMPOLO, S. das G. (1998). Análise citogenética da heterocromatina constitutiva de duas espécies do gênero *Plebeia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) por meio de bandamento C e fluorocromos. **Genetics and Molecular Biology** 21 (3) SUPPLEMENT: 49.
- CLOUGH, D. W.; KUNKEL, L. M. & DAVIDSON, R. L. (1982). 5 – Azacytidine – Induced reactivation of a herpes simplex thymidine kinase gene. **Science** 216: 70 –73.
- COSTA, K. F.; TROY, W. P.; BRITO-RIBON, R. M. & MIYAZAWA, C. S. (1999). Cytogenetic characterization of *Pseudoaugochlora* sp. (Hymenoptera, Halictidae) from Cuiaba - MT Brazil. **Genetics and Molecular Biology** 22 (3) SUPPLEMENT: 30.
- COSTA, M. A; MELO, G. A. R; POMPOLO, S. G & CAMPOS, L. A. O. (1993) Karyotypes and heterochromatin distribution (C-band patterns) in three species of *Microstingmus* wasps (Hymenoptera, Sphecidae, Pemphredoniae). **Revista brasileira de Genética** 16 (4): 923-926.

- COSTA, M. A; POMPOLO, S. das G. & CAMPOS, L. A. O. (1992). Supernumerary Chromosomes in *Partomona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Brasil. Genet.** **15** (4): 801-806.
- CUCCHI, C.; BARUFFALDI, A. (1990). A new method for karyological studies in teleost fishes. **In Journal of Fish Biology** **37**: 71-75.
- DIZIERZON, J. (1845). Transl. "On the development of bees". **Eichstadt. Bienenzeitung** **1**: 113.
- FARAH, S. B. (1983). The *in vivo* effect of Cobalt Chloride on chromossomes. **Revista Brasileira de Genética** **VI** (3):433-442.
- GELEHRTER, T.D. & COLLINS, F.S. (1992). **Fundamentos Genética Médica**. Rio de Janeiro, RJ, Editora Guanabara Koogan, 248p.
- GOMES, L. F.; POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1995). Cytogenetic analysis of three species of *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae). **Revista Brasileira de Genética** **18** (2): 173-176.
- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R.C. & GELBART, W. M. (2000). **An Introduction To Genetic Analysis**. 7 ed., USA, New York, W.H. Freeman, 860p.
- GROUDINE, M.; EISENMAN, R. & WEINTRAUB, H. (1981). Chomatin struture of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation **Nature** **292** (23): 311 – 317
- GUERRA, M. (1988). **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro – RJ, Ed. Guanabara. Koogan: 24-35.

- HAAF, T, WERNER, P. & SCHMID, M. (1993). 5 - Azadeoxycytidine distinguishes between active and inactive X chromosome condensation
Cytogenetics and Cell Genetics 63: 160-168
- IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROSLAND, M. W. J. & CROZIER, R. H. (1988). Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis.
Jpn. J. Genet. 63: 159-185.
- KEER, W.E; (1948). Estudo sobre o gênero *Melipona*. **Anais Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queiroz"** 5: 181 - 276.
- KERR, W. E; CARVALHO G. A & NASCIMENTO, V. A. (1996). **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação** Belo Horizonte - MG, 1ª. ed., Editora Acangaú, 143p.
- LODISH, H.; BERK, A. A.; ZIPURSSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D. & DARNELL, J. (2000). **Molecular Cell Biology**. 4 ed., USA, New York, W.M. FREEMAN & COMPANY.
- MARCOLINO, M. T.; BRANDEBURGO, M. A. M.; & NASCIMENTO, V. A. (1998). Determinação do número de cromossomos de *Camponotus atriceps* (Hymenoptera, Formicinae). **Genetics and Molecular Biology** 21 (3) SUPPLEMENT: 49.
- MARGARIDO, V. P. (1995). **Uma contribuição à Citogenética dos Bryconinae (Characiformes, Characidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, SP: 115p.

- MOHANDAS, T.; SPARKES, R. S. & SHAPIRO, L. J. (1981). Reactivation of an inactive human X chromosome. Evidence for X inactivation by DNA methylation. **Science** **211**:393-396.
- MOTTA, P.A. (1980). **Genética Médica**. 2 ed., Rio de Janeiro, RJ, Editora Guanabara Koogan: 45-51.
- NELSON, D.L. & COX, M. M. (2000). **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3 ed., USA, New York, Worth Publishers.
- PARDUE, M. L. & HENNIG, W. (1990). Heterochromatin: Junk or collectors? **Cromossoma** **100**: 3 - 7.
- POMPOLO, S. G & TAKAHASHI, C. S. (1990). Karyotype of ten species of wasps (Hymenoptera, Polistinae, Polybini), **Revista Brasileira de Genética** **13 (3)**: 469-477.
- POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. de O. (1995). Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla*. (Hymenoptera, Meliponinae). **Rev. Brasil. Genet.** **18 (2)**: 181-184.
- PURVES, W. K.; ORIAUS, G. H. & HELLER, H. C. (1995). **Life: The Science of Biology**. 4 ed., USA, Sinauer Associates, INC.; W.H. Freeman and Company: 195.
- ROCHA, M. P. & POMPOLO, S. das G. (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology** **21 (1)**: 41-45.
- SCHMID, M.; HAAF, T. & GRUNERT, D. (1984). 5-azacytidine-induced under condensations in human chromosomes. **Human Genetics** **67**: 257-263

- STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STBBINS, R.C. & NYBAKKEN, J.W. (1991). **Zoologia Geral**. (Trad. de CORRÊA, C. G. & SCHLENZ, E.). 6 ed., São Paulo - SP, Ed. Nacional: 504-544.
- SUMMER, A. T. (1990). **Chromosome Banding**. 1a ed., London, UK, Published by Academic Division of Unwin. Hyman Ltd: First ed. 156-185.
- TRES, L. L. KIERSZENBAUN, A. L. & TANDLER, C. J. (1972). Inorganic cations in the cell nucleus. Selective accumulation during prophase in mouse testis. **J. Cell Biol.** **53**: 483-493.
- VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. & DUTRILLAUX, B. (1981). Detection of C rich heterochromatin by 5-azacytidine in mammals. **Hum. Genet** **57**: 134-137.