

## Plan Overview

---

*A Data Management Plan created using DMPTool-Stage*

**DMP ID:** <https://doi.org/10.48321/D10K63>

**Title:** Marcas epigenéticas potencialmente responsivas à ação do valproato de sódio (VPA) na heterocromatina de *Triatoma infestans* (Klug)

**Creator:** Douglas Silva dos Santos - **ORCID:** [0000-0001-7374-8480](https://orcid.org/0000-0001-7374-8480)

**Affiliation:** State University of Campinas (unicamp.br)

**Principal Investigator:** Maria Luiza Silveira Mello

**Funder:** São Paulo Research Foundation (fapesp.br)

**Funding opportunity number:** 2019/20833-3

**Template:** UNICAMP-GENERIC: Aplicável a todas as áreas

### Project abstract:

As células somáticas de *Triatoma infestans*, hemíptero hematófago e vetor da doença de Chagas, são caracterizadas pela presença de corpos heterocromáticos (cromocentros) cujo DNA é rico em bases AT. Neste inseto, o tratamento com valproato de sódio/ácido valproico (VPA), conhecido inibidor de deacetilases de histonas, promove remodelação cromatínica nos cromocentros, porém, diferindo de respostas usuais a essa droga, esta não se mostra acompanhada por acetilação de H3K9 e H4K8. Também se desconhece se o VPA causaria algum efeito sobre metilação do DNA nesses cromocentros, pois há ainda incerteza quanto à presença de 5-metilcitosina (5mC) nos mesmos. Desconhece-se também se o VPA causaria efeito sobre a metilação de histonas já demonstrada nesse material. Dadas as dúvidas ainda existentes sobre os caminhos metabólicos através dos quais o VPA poderia atuar nesse tipo de cromatina, no presente trabalho será aprofundada a pesquisa de 5mC e de relações entre H3K9me3, H4K20me3, H3K27me3 e HP1- $\alpha$  nos cromocentros de *T. infestans* submetidos a tratamento com VPA. Dados serão levantados para células dos túbulos de Malpighi em diferentes fases do desenvolvimento do inseto que contemplem endorreplicação do DNA (3º. ou 4º. instar) e parada do ciclo celular (5º. instar ou adulto). A metodologia envolvida fará uso de imunoenaios e de imagens 3-D obtidas com microscopia confocal. Serão também desenvolvidos protocolos para isolamento de cromocentros por microcirurgia à laser para subsequente isolamento de DNA e estudo de uma eventual participação de 5mC em sua composição.

**Start date:** 12-31-2019

**End date:** 12-30-2021

**Last modified:** 08-07-2023

**Copyright information:**

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

---

## **Marcas epigenéticas potencialmente responsivas à ação do valproato de sódio (VPA) na heterocromatina de *Triatoma infestans* (Klug)**

Ninfas de 5<sup>o</sup>. instar e adultos de *T. infestans* (Klug, 18340). Os insetos serão dissecados 1 h após injeção com 50 µL de solução de VPA 0.05 mM para a retirada dos túbulos de Malpighi. A utilização de túbulos de Malpighi para o presente estudo se justifica por causa de um conhecimento bem estabelecido sobre sua biologia celular (revisão em Alvarenga et al. 2016).

Em preparados de túbulos de Malpighi fixados em paraformaldeído a 4% serão realizados ensaios de imunocitoquímica com anticorpos primários anti-H3K9me3 (rabbit, policlonal) (Millipore, Billerica, MA, USA), H4K20me3 (rabbit, monoclonal) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), H3K27me3 (rabbit, monoclonal) (Cell Signaling), HP1- $\alpha$  (rabbit, policlonal) (RheabioTech, Campinas, Brasil)); como anticorpo secundário será usada goat anti-rabbit IgG complexada com fluoróforos adequados (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Imagens de microscopia confocal e reconstrução 3-D serão obtidas na facility LACTAD/Unicamp, com a utilização de microscópio confocal Leica TS SP5 II (Wetzlar, Germany), equipado com lasers de argônio e hélio-neônio, objetivas de 63x e 100x e software Leica Applications Suite AF.

5mC será pesquisada em preparados fixados em metanol a 20°C por 10 min, usando-se anticorpo primário anti-5-mC de camundongo (Sigma) e anticorpo secundário rabbit anti-mouse complexado com Alexa 488 (Cell Signaling), bem como em DNA isolado de cromocentros obtidos por microcirurgia a laser, sob supervisão da Profa. Luciana Bolsoni, citogeneticista de anfíbios com larga experiência na técnica, e usando-se análise de ELISA com kit apropriado, conforme instruções do fabricante

(Zymo Research). Obtido DNA isolado, este poderia se prestar a uma análise microespectroscópica ao infravermelho (FT-IR), com equipamento Illuminat IR II™ (Smiths Detection, Danbury, CT, USA), à semelhança do que já foi reportado por nosso laboratório para níveis alterados de metilação do DNA em células hepáticas de animais diabéticos e em células HeLa sob a ação do VPA (Vidal et al. 2014; Veronezi et al. 2017).

Para análise de imagens de microscopia confocal e reconstrução 3-D, será necessário mensurar as distâncias axiais proximal (mais curta) e distal (mais longa) entre os cromocentros e a periferia nuclear. Dessa forma, serão analisados os eixos X, Y e Z utilizando o software Image Pro-Plus 7 (Media Cybernetics, Inc.). As comparações serão feitas por meio de testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney usando Minitab 18™ (State College, PA, EUA) software.

O projeto envolve experimentação animal. Portanto, os animais serão criados em condições através do controle de temperatura, umidade, luminosidade e alimentação, serão fornecidos pelo Insetário da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo). Os procedimentos de manutenção/alimentação dos insetos estarão registrados no Conselho Nacional de Controle do Uso de Animais segundo protocolo de no. 01200.003280/2014-28. O presente projeto de pesquisa já foi aprovado pela Comissão Científica da SUCEN segundo protocolo 64405/2015.

Os arquivos (imagens/ gráficos) serão armazenados em pastas de acordo com as respectivas técnicas utilizadas. As imagens obtidas serão armazenados em banco de imagens em formato tif.

Os dados obtidos serão disponibilizados por meio de congressos, manuscritos e relatórios técnico-científicos.

Os resultados serão condicionados pelos pesquisadores em plataforma de armazenamento online ou por meio de

armazenamento em storages por um período de 5 anos de acordo com a legislação vigente.

---