

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

Camila de Moura Pereira

**O ELEMENTO TRANSPONÍVEL *mariner* E O ACÚMULO DE
TRANSPOSIÇÃO SOMÁTICA NO DESENVOLVIMENTO DE
*Drosophila***

Santa Maria, RS

2017

Camila de Moura Pereira

**O ELEMENTO TRANSPONÍVEL *mariner* E O ACÚMULO DE TRANSPOSIÇÃO
SOMÁTICA NO DESENVOLVIMENTO DE *Drosophila***

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, área de concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

Orientador: Prof. Dr. Élgion Lúcio da Silva Loreto

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Moura Pereira, Camila
O ELEMENTO TRANSPONÍVEL mariner E O ACÚMULO DE
TRANSPOSIÇÃO SOMÁTICA NO DESENVOLVIMENTO DE Drosophila /
Camila de Moura Pereira.- 2017.
46 p.; 30 cm

Orientador: Élgion L. da Silva Loreto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2017

1. elementos transponíveis 2. mariner 3. transposição
somática 4. Drosophila I. L. da Silva Loreto, Élgion II.
Título.

Camila de Moura Pereira

**O ELEMENTO TRANSPONÍVEL *mariner* E O ACÚMULO DE TRANSPOSIÇÃO
SOMÁTICA NO DESENVOLVIMENTO DE *Drosophila***

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, área de concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Animal.

Aprovada em 20 de março de 2017



Elgion Lúcio da Silva Loreto, Dr
(Presidente/Orientador)



Fabiana de Oliveira Heredia, Dr^a
(Examinadora)



Daniel Mendes Pereira Ardisson de Araújo, Dr
(Examinador)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que fizeram parte da minha trajetória até aqui e que de alguma forma contribuíram para que tudo isso fosse possível:

Aos meus pais, Elenara e Edinei, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por sempre acreditarem nas minhas escolhas.

A minha irmã, Carolina, por ler e reler esse trabalho tantas vezes comigo e por me compreender melhor do que qualquer pessoa.

A minha madrastra, Liz Andreia, e aos seus filhos, João e Vi, por me distrair e alegrar nos momentos bons e por aguentar o meu humor nos momentos ruins.

Ao meu cunhado, Leo, pela amizade e pela ajuda com o abstract.

Ao meu noivo, William, por todo o amor, carinho e paciência ao longo dessa etapa, por estar presente o tempo todo mesmo estando longe, e por sempre tornar tudo mais fácil e bonito na minha vida.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao programa de Pós-graduação em Biodiversidade Animal e ao órgão financiador, CNPq.

Ao professor Elgion, pela oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa incrível, pela orientação que recebi ao longo desse trabalho, pela confiança depositada em mim e por todo o conhecimento transmitido durante esses seis anos.

A todos os membros do LabDros, novos e antigos, com quem tive o prazer de conviver e aprender diariamente: Ronaldo, Lari, Pedro, Tai, Fran, Zé, Carla, Tiago, Mari, Nader, Raquel, Rafa, Vítor, Karen, Dani, Monica (e todos aqueles que já seguiram seus caminhos) obrigada por toda a ajuda com as coletas de larvas e extrações, pelas risadas, pelos churrascos e pela amizade! A Si, por toda a dedicação em me ensinar as técnicas que realizei nesse trabalho; e ao Marcos, por me ouvir e aconselhar desde a graduação e pela amizade fora de série!

Agradeço de coração a todos vocês!

RESUMO

O ELEMENTO TRANSPONÍVEL *mariner* E O ACÚMULO DE TRANSPosição SOMÁTICA NO DESENVOLVIMENTO DE *Drosophila*

AUTORA: Camila de Moura Pereira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Elgion Lúcio da Silva Loreto

Elementos transponíveis (TEs) são sequências de DNA móveis nos genomas hospedeiros. Alguns TEs são capazes de se transpor em células somáticas, processo conhecido por Transposição Somática (TS), que pode estar envolvido no envelhecimento celular, doenças neurodegenerativas e câncer. O elemento *mariner* é um TE capaz de se transpor em células somáticas e germinativas. Uma cópia não-autônoma desse elemento na região promotora do gene *white* gera moscas com olhos cor de pêssego, chamadas *white-peach*. Na presença de cópias autônomas, o *mariner* no gene *white* é capaz de se transpor, revertendo parcialmente a mutação e originando moscas com fenótipo mosaico: olhos *white-peach* com manchas vermelhas. Esse modelo torna possível medir a taxa de TS através do número de manchas das moscas mosaico, pois cada mancha reflete um evento de excisão e como consequência, um evento de TS. Neste estudo utilizamos o estresse por temperatura para induzir a transposição de *mariner* durante diferentes estágios do desenvolvimento de *D. simulans white-peach teste*, buscando verificar se eventos de TS são acumulados em *Drosophila*. A TS de *mariner* sob estresse térmico não foi constante durante todo o desenvolvimento: a fase larval apresentou as maiores taxas de TS; a fase de pupa exibiu taxas menores; e na fase embrionária a transposição não foi detectada. A fase do desenvolvimento e os processos celulares envolvidos nesse período podem influenciar a transposição de *mariner*, que parece ser facilitada por estágios de intensa divisão celular, como a fase larval. O acúmulo de TS não ocorre de maneira linear, podendo variar de acordo com os estágios de maior e menor transposição. A ativação de *mariner* sob estresse foi confirmada por qPCR, que indicou uma taxa de TS duas vezes maior nos tratamentos a 28°C para a fase larval. Essa análise também mostrou um acúmulo de TS ao longo do desenvolvimento.

Palavras-chave: Elementos transponíveis. Transposição somática. *mariner*. *Drosophila*.

ABSTRACT

THE *mariner* TRANSPOSABLE ELEMENT AND ACCUMULATION OF SOMATIC TRANSPOSITION IN *Drosophila* DEVELOPMENT

AUTHOR: Camila de Moura Pereira
ADVISOR: Prof. Dr. Elgion Lúcio da Silva Loreto

Transposable elements (TEs) are sequences of DNA with the ability to move inside host genomes. Some TEs are able to transpose into somatic tissues, process called Somatic Transposition (ST) that can be involved with aging, neurodegenerative diseases and cancer. The *mariner* element is a TE able to move in both somatic cells and germline. A non-autonomous *mariner* was discovered as a cause of the white-peach mutation in *Drosophila* eyes. The insertion of this element in the promoter region of the *white* gene leads to flies with peach colored eyes. In the presence of autonomous copies, the *mariner* in the *white* gene can transpose, reversing the mutation and leading to flies with mosaic phenotype (white-peach colored eyes with red spots). This model makes possible to measure the rate of ST by the number of red spots in mosaic flies, because every spot represents an excision event and as a consequence, a ST event. In this study, we used mild heat stress to induce *mariner* transposition through different stages of *D. simulans white-peach test* development in order to verify if ST events accumulate in *Drosophila*. The *mariner* ST was not constant during the development: the larval stage showed the higher ST rates; pupal stage exhibited less than larval; and transposition was not detected during the embryogenesis. The development stage and the cellular process involved in this period can affect *mariner* transposition: more intense cell division phases may facilitate it. ST accumulation does not occur linearly, but it may vary by the stages with highest or lowest transposition. The *mariner* activation under thermal stress was confirmed by qPCR that indicated twice as high rates of ST in the larval stage at 28°C. Besides, these analyses also showed an accumulation of ST throughout the development.

Keywords: Transposable elements. Somatic transposition. *mariner*. *Drosophila*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 ELEMENTOS DE TRANSPOSIÇÃO.....	6
1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS TES.....	7
1.3 MECANISMOS DE SILENCIAMENTO DE TES.....	10
1.4 TRANSPOSIÇÃO SOMÁTICA.....	13
1.5 A TRANSPOSIÇÃO SOMÁTICA E O ENVELHECIMENTO.....	15
1.6 O ELEMENTO TRANSPONÍVEL <i>mariner</i> E A MUTAÇÃO <i>white-peach</i> EM <i>Drosophila</i>	17
1.7 ESTRESSE TÉRMICO E TS DO ELEMENTO <i>mariner</i>	20
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 DESCRIÇÃO DA LINHAGEM.....	22
3.2 TRATAMENTOS DE VARIAÇÃO DA TEMPERATURA.....	22
3.3 TRATAMENTOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA.....	24
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA.....	24
3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR.....	24
3.6 ESTIMATIVA DA TAXA DE TS PELO MOSAICISMO NO GENE <i>white</i>	25
3.7 EXTRAÇÃO DE DNA.....	26
3.8 ANÁLISE DA TAXA DE TS POR qPCR.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 TRATAMENTOS DE VARIAÇÃO DA TEMPERATURA.....	28
4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR.....	31
4.3 ANÁLISE DA TAXA DE TS POR qPCR.....	33
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
ANEXOS.....	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 ELEMENTOS DE TRANSPOSIÇÃO

Elementos transponíveis (do inglês, *Transposable Elements* - TEs) são sequências de DNA capazes de se mover dentro dos genomas hospedeiros, sendo esse fenômeno denominado transposição.

Esses elementos foram descobertos na década de 40 do século passado pela geneticista Barbara McClintock (1902-1992) no genoma do milho. McClintock percebeu que os TEs poderiam mudar sua posição nos cromossomos, alterando o funcionamento de genes, o que levaria a diferentes padrões na coloração dos grãos de milho (McCLINTOCK, 1950).

No entanto, a existência dos TEs não foi totalmente aceita pela comunidade científica até a década de 80, pois essa descoberta demonstrava que os genomas são dinâmicos e possuem plasticidade, contrariando os conceitos da época de estabilidade do material genético (VARANI, et al., 2015).

O início da era genômica na década de 90 permitiu confirmar a presença de TEs na maioria dos organismos investigados. Além disso, o sequenciamento de genomas em grande escala mostrou que esses elementos podem representar uma grande parte dos genomas hospedeiros, como em *Drosophila melanogaster* (cerca de 15 a 20%), *Homo sapiens* (45%) e algumas plantas (mais de 60%) (BIÉMONT, 2010; HUA-VAN et al., 2011).

Durante muito tempo, os TEs não tiveram uma função reconhecida, devido sua presença ocorrer principalmente em porções do genoma que não são codificantes para polipeptídeos, sendo considerados “DNA lixo” ou “DNA sucata” (termo traduzido do inglês, *junk DNA*). O termo “DNA egoísta” (do inglês, *selfish DNA*) também foi muito usado para se referir aos TEs (FEDOROFF, 2012; HUA-VAN et al., 2011).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular permitiram a compreensão dos mecanismos de mobilização desses elementos e do impacto desse processo nos genomas hospedeiros.

Ao sofrerem transposição, os TEs podem se inserir em diferentes regiões do genoma: dentro de um gene ou de sua região promotora ou reguladora, o que pode alterar a sua expressão gênica ou até mesmo inativá-la, promovendo mutações. Além disso, a inserção ou a excisão de TEs podem gerar alterações como deleções, duplicações, inversões, quebras e fusões cromossômicas (HUA-VAN et al., 2011).

A importância desses elementos no processo evolutivo dos seus hospedeiros é reconhecida atualmente, visto que os TEs podem promover grandes mudanças estruturais nos genomas, gerando variabilidade genética e promovendo inovações biológicas (BIÉMONT, 2010; FESCHOTTE; PHRITHAM, 2007; HUA-VAN et al., 2011).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS TES

A grande diversidade dos TEs descritos a partir da década de 80 tornou necessária a criação de um sistema de classificação. O primeiro sistema de classificação de TEs foi proposto por FINNEGAN em 1989 e os dividia em duas classes de acordo com o mecanismo de transposição.

Os elementos pertencentes à Classe I, também chamados retrotransposons ou retroelementos, utilizam um intermediário de RNA e sofrem transcrição reversa para a sua transposição. A transcrição reversa consiste na síntese de moléculas de DNA a partir de um molde de RNA, assim como ocorre com os retrovírus.

As enzimas envolvidas na transposição dos retroelementos são a Transcriptase Reversa (do inglês, *Reverse Transcriptase* - RT) e a integrase (IN), que são codificadas pelo TE e produzidas pela maquinaria celular.

A transposição tem início quando uma fita de mRNA contendo a sequência total do TE é transcrita; em seguida, a enzima RT sintetiza uma molécula de DNA utilizando o RNA como molde; e, por fim, a nova molécula de DNA é então inserida pela enzima IN em outra região do genoma, denominada sítio receptor.

Esse mecanismo é conhecido como “copia-e-cola (do inglês, *copy-and-paste*) ou transposição replicativa”, pois a cada transposição é gerada uma nova cópia do retroelemento. Dessa maneira, os elementos de Classe I contribuem para o aumento das porções repetitivas dos genomas hospedeiros.

Os elementos da Classe II usam DNA como intermediário para sua transposição e são chamados de transposons. As enzimas responsáveis pela transposição desses elementos são chamadas transposases e atuam na quebra da ligação fosfodiéster da molécula de DNA.

A transposase promove a clivagem do transposon do seu local de origem (sítio doador) e sua inserção em um novo local do genoma (sítio receptor). Esse mecanismo é conhecido como “recorta-e-cola” (do inglês, *cut-and-paste*).

Uma característica estrutural importante dos transposons é a presença de repetições terminais invertidas (do inglês, *Terminal Inverted Repeats* - TIRs) em suas extremidades. As

TIRs podem variar entre 9 e 40 pb de extensão e atuam como sítios de reconhecimento para a ação das transposases (MUÑOZ-LÓPEZ; GARCÍA-PÉREZ, 2010).

Além disso, alguns transposons podem apresentar repetições flanqueando as TIRs. Essas sequências são chamadas de sítio alvo de duplicação (do inglês, *Target Site Duplications* - TSDs) e são geradas durante a inserção no sítio receptor. As TSDs são únicas para cada tipo de transposon e, assim como as TIRs, são usadas na classificação desses elementos (MUÑOZ-LÓPEZ; GARCÍA-PÉREZ, 2010).

Em 2007, WICKER e colaboradores criaram um novo sistema unificado de classificação, que manteve a proposta original de divisão em duas classes e adicionou níveis mais inclusivos como subclasses, ordens e famílias, seguindo uma hierarquia taxonômica.

Segundo esse sistema, os elementos da Classe I são divididos em cinco ordens: LTRs, LINEs, SINEs, DIRS-like e Penelope-like (Quadro 1).

A primeira delas é definida pela presença de longas terminações repetidas (do inglês, *Long Terminal Repeats* - LTRs) e diretas em suas duas extremidades. Essas terminações são compostas por sequências repetitivas não-codificantes, que possuem função reguladora na atividade desses elementos.

Os retrotransposons com LTR possuem características similares aos retrovírus e ambos podem estar relacionados evolutivamente. Esses elementos são menos frequentes em animais, mas predominam em plantas. Muitas famílias de retrotransposons com LTRs estão presentes no genoma humano, mas apresentam um número moderado de cópias, em sua grande maioria inativas (WICKER et al., 2007).

Os retrotransposons sem LTRs possuem uma sequência de nucleotídeos poli-A em sua extremidade 3' e são divididos em duas ordens: os elementos nucleares interdispersos longos (do inglês, *Long Interspersed Nuclear Element* - LINEs) e os elementos nucleares interdispersos curtos (do inglês, *Short Interspersed Nuclear Element* - SINEs).

Os LINEs possuem diversidade e abundância variável nos eucariontes. Quando comparados com os elementos com LTRs, são mais abundantes em animais e pouco representativos em plantas, com algumas exceções. Uma família de LINEs chamada *L1* (LINE-1) apresenta milhares de cópias em mamíferos, podendo representar cerca de 20% do genoma humano (WICKER et al., 2007).

Os SINEs são elementos curtos de 50 a 500 pb e não são capazes de transcrever enzimas para sua transposição. No entanto, esses elementos podem sofrer transposição mediada por LINEs. O elemento *Alu* é o mais conhecido dessa ordem e possui pelo menos 500.000 cópias no genoma humano (WICKER et al., 2007).

Além dos elementos Classe I com LTR e sem LTR (LINEs e SINEs), existem ainda duas novas ordens recentemente descritas: os *DIRS-like* (do inglês, *Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence*) e os *Penelope-like* (PLE).

Os elementos Classe II são divididos em duas Subclasses, de acordo com o número de fitas da molécula de DNA clivado na transposição (Quadro 1).

Nos transposons da Subclasse I ocorre a clivagem de ambas as fitas, promovendo a excisão completa do elemento para sua inserção em outro local do genoma. Alguns exemplos que pertencem a essa subclasse são as superfamílias *Tc1-mariner*, *hAT* e *elemento-P* (MUÑOZ-LÓPEZ; GARCÍA-PÉREZ, 2010).

Já nos transposons da Subclasse II apenas uma das fitas é clivada, gerando cópias dos elementos a cada transposição. São exemplos dessa subclasse os elementos *Helitrons* e *Mavericks* (WICKER et al., 2007).

Outros níveis de classificação mais inclusivos utilizam como critérios a presença e similaridade das TIRs e das TSDs, a sequência de polipeptídeos da transposase e outras características, como o grau de identidade entre as sequências dos transposons.

Classificação dos TEs	
<p>Classe I Retrotransposons Intermediário de RNA Mecanismo “<i>cópia-e-cola</i>” divididos em 5 Ordens</p>	<p>LTR (<i>Long Terminal Repeats</i>) Ex. <i>Gypsy</i> e <i>Copia</i> LINE (<i>Long Interspersed Nuclear Element</i>) Ex. LINE 1 (L1) SINE (<i>Short Interspersed Nuclear Element</i>) Ex. <i>Alu</i> DIRS-like (<i>Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence</i>) Ex. DIRS Penelope-like (PLE) Ex. <i>Penelope</i></p>
<p>Classe II Transposons Intermediário de DNA Mecanismo “<i>recorta-e-cola</i>” divididos em 2 Subclasses</p>	<p>Subclasse I Excisão completa do sítio doador e integração no sítio receptor (“<i>recorta-e-cola</i>”) Ex. Ordem TIR <i>Tc1-mariner</i>, <i>hAT</i> e <i>PiggyBac</i></p>
	<p>Subclasse II Clivagem de apenas uma fita do DNA, gerando cópias do TE (“<i>cópia-e-cola</i>”) Ex. Ordem Helitron, <i>Helitron</i> Ordem Maverick, <i>Maverick</i></p>

Quadro 1: resumo da classificação dos TEs segundo WICKER et al., 2007.

Os TEs podem ainda ser divididos em autônomos ou não-autônomos, à parte do sistema de classificação (WICKER et al., 2007).

Os TEs são autônomos quando codificam as enzimas necessárias para sua transposição, ou não-autônomos quando não produzem suas próprias enzimas.

No entanto, elementos não-autônomos podem ser mobilizados por enzimas produzidas por um autônomo, desde que o sítio de reconhecimento da enzima seja similar em ambos. Esse tipo de mobilização é chamado de transposição em *trans*.

Os SINEs são um bom exemplo desse sistema. Essa ordem de retrotransposons não possui representantes autônomos e sua transposição é feita por enzimas RTs produzidas por LINEs. Alguns SINEs são restritos quanto à origem da enzima, enquanto outros são generalistas (WICKER et al., 2007).

1.3 MECANISMOS DE SILENCIAMENTO DE TES

Como já foi dito anteriormente, os TEs podem promover mutações, mudanças no padrão de regulação gênica e grandes alterações cromossômicas nos genomas, produzindo variabilidade genética e inovações biológicas, o que os torna agentes indiretos nos processos evolutivos de seus hospedeiros (HUA-VAN et al., 2011).

No entanto, a maioria dessas alterações tem efeitos deletérios para os organismos, como a inativação de genes decorrente da inserção de TEs. Para evitar que isso ocorra, muitos hospedeiros desenvolveram mecanismos de silenciamento dos TEs, a fim de controlar a atividade e a expansão desses elementos no genoma.

Existem duas principais estratégias para a repressão de TEs: a primeira é o controle pré-transcricional através da metilação do DNA ou modificação de histonas, impedindo que os RNAs mensageiros dos elementos sejam produzidos; a segunda é o controle pós-transcricional feito pela clivagem dos RNAs já produzidos, impedindo que esses sejam traduzidos para a formação de enzimas de transposição (LEVIN; MORAN, 2011).

O silenciamento pré-transcricional (ou transcricional) altera os níveis de compactação da cromatina, impedindo o acesso da maquinaria de transcrição à molécula de DNA.

A metilação do DNA é essencial na regulação de genes endógenos e no controle de TEs em eucariotos. Esse processo consiste na adição de grupos metil (CH₃) ao carbono 5 da citosina em sequências promotoras, impedindo a ligação de fatores de transcrição e a consequente produção de transcritos (LAW; JACOBSEN, 2010).

Outro tipo de controle pré-transcricional é a modificação de histonas. As histonas são proteínas ligadas a molécula de DNA que atuam na sua compactação. Essas proteínas possuem uma cauda N-terminal que pode sofrer modificações, como acetilação ou metilação, alterando o estado de compactação da cromatina e regulando a transcrição de genes e TEs (VOLPE; MARTIENSSEN, 2011).

Como o sistema de silenciamento reconhece TEs para a metilação e compactação da cromatina ainda é incerto, mas esse processo pode ser dependente de pequenos RNAs, como já foi descrito em plantas (FEDOROFF, 2012; LAW; JACOBSEN, 2010).

O silenciamento pré-transcricional constitui uma defesa permanente e a longo prazo contra os TEs que já passaram por esse processo de reconhecimento, mas não é capaz de conter invasões recentes no genoma.

O controle pós-transcricional é a primeira defesa dos hospedeiros contra a invasão de novos TEs e é feito pela interação entre pequenos RNAs e uma família de proteínas chamada Argonauta.

De modo geral, os pequenos RNAs são divididos em três tipos e cada um deles se liga a uma proteína Argonauta, são eles: os pequenos RNAs de interferência (do inglês, *small interfering RNA* - siRNA) que se ligam a proteínas Ago2 e atuam no silenciamento de TEs em células somáticas; os piRNA (do inglês, *Piwi-interacting RNA*) que se ligam a proteínas do grupo PIWI e fazem a repressão de TEs em células germinativas; e os microRNA (miRNA) que se ligam a proteínas Ago1 e estão envolvidos na regulação de genes endógenos, mas não participam do silenciamento de TEs (CZECH; HANNON, 2011).

É importante observar que essa divisão é uma síntese e tem como base o conhecimento sobre pequenos RNAs reunido em revisões até o momento. No entanto, as descobertas envolvendo pequenos RNAs e suas funções nos genomas podem tornar essas interações ainda mais complexas.

O silenciamento em células somáticas começa quando é detectado um RNA aberrante produzido por um novo TE. Quando um elemento invade um genoma que não possui defesas, sua atividade se torna muito alta e o grande número de eventos de transposição aumenta a probabilidade de produzir transcritos defeituosos como, por exemplo, mRNA sem cauda poli-A ou mRNA fita dupla (do inglês, *double strand RNA* - dsRNA) (BLUMENSTIEL, 2011).

Os dsRNA são reconhecidos por uma endonuclease chamada Dicer e clivados em pequenos RNAs de 21 a 24 nucleotídeos. Esses pequenos RNAs são processados para a produção de siRNA (BLUMENSTIEL, 2011; CASTEL; MARTIENSSEN, 2013).

Os siRNA produzidos ligam-se a proteínas Ago2 para a formação de um complexo de silenciamento chamado RISC (do inglês, *RNA-Induced Silencing Complex*) (CZECH; HANNON, 2011). O complexo RISC utiliza a sequência do siRNA na busca por transcritos do TE, que são clivados e, então, degradados.

O controle de TEs em células germinativas requer um sistema mais complexo para proteger a integridade do material genético. Caso contrário, altas taxas de transposição poderiam levar a esterilidade dos progenitores ou inviabilidade da prole.

Esse sistema utiliza piRNA associados a uma classe de Argonautas chamada PIWI, que inclui as proteínas Ago3, Piwi e Aubergina (Aub).

Os piRNA são produzidos a partir de locus chamados “piRNA clusters” que contêm sequências de diferentes tipos de TEs, a maioria em orientação antisense. A transcrição desses locus gera longos precursores de piRNA, que são clivados por uma proteína Ago3 em pequenos RNAs de 24 a 35 nucleotídeos. Esses pequenos RNAs passam por um processamento para a formação de piRNA (BLUMENSTIEL, 2011; CASTEL; MARTIENSSEN, 2013).

Os piRNA antisense produzidos ligam-se a proteínas Piwi e Aub e as direcionam para os transcritos do TE, que são clivados para a produção de piRNA senso. Os piRNA senso são capturados pela proteína Ago3 e usados para a produção de novos piRNA antisense, reiniciando o ciclo. Esse mecanismo é conhecido como “modelo ping-pong” (CASTEL; MARTIENSSEN, 2013; GHILDIYAL; ZAMORE, 2009; ZAMORE, 2010).

Quando um novo TE invade o genoma, o hospedeiro não possui os piRNA complementares a sua sequência. Ocasionalmente esse TE irá se transpor para um "piRNA cluster" e sua sequência será usada para a produção de novos piRNA (BLUMENSTIEL, 2011).

O mecanismo de silenciamento com piRNA e proteínas PIWI ajudou a esclarecer o fenômeno de disgenesia híbrida em *Drosophila*, que foi descrito por estudos realizados no final da década de 70.

Esses estudos mostravam incompatibilidade em cruzamentos com moscas de laboratório e moscas selvagens. Cruzamentos realizados entre fêmeas de laboratório e machos de populações naturais apresentavam prole inviável, infértil ou com deformações. No entanto, quando o cruzamento era realizado no outro sentido, fêmeas selvagens com machos de laboratório, a prole era normal (ENGELS; PRESTON, 1979; KIDWELL; KIDWELL, 1977; KIDWELL, 1983).

Isso ocorre porque os pequenos RNAs do gameta materno são herdados pelo zigoto após a fecundação (BLUMENSTIEL, 2011; BRENNECKE et al., 2008). Logo, as fêmeas de laboratório não possuíam RNAs contra os TEs presentes no genoma dos machos selvagens.

Dessa forma, as elevadas taxas de transposição afetavam a viabilidade do zigoto (BLUMENSTIEL, 2011; BRENNECKE et al., 2008).

O TE responsável pelas alterações detectadas nesses cruzamentos era o *elemento-P*. Anos mais tarde, foi observado que inserções do *elemento-P* em um determinado gene causavam deformações nas gônadas e esterilidade em machos e fêmeas (LIN; SPRADLING, 1997). Esse gene foi chamado *piwi* (do inglês, *P-element Induced Wimpy testes*) e mostrou ser essencial para a viabilidade e integridade das células germinativas.

Embora o sistema piRNA e proteínas PIWI esteja associado ao silenciamento em tecidos germinativos, um estudo recente demonstrou a ativação de TEs no cérebro de *Drosophila* em linhagens mutantes para os genes *Aub* e *Ago3* (PERRAT et al., 2013). Essas evidências apontam para o uso dessa via também em alguns tecidos somáticos.

1.4 TRANSPOSIÇÃO SOMÁTICA

De maneira geral, a atividade dos TEs é regulada por um balanço entre as taxas de transposição, os mecanismos de silenciamento e a seleção natural (HUA-VAN et al., 2011). Quando um elemento é muito ativo, as transposições podem causar sérios danos ao organismo hospedeiro, o que pode resultar na perda do TE numa população recém invadida (HAIG, 2016; MUÑOZ-LÓPEZ; GARCÍA-PÉREZ, 2010).

Logo, essa seleção faz com que muitos TEs sejam ativos apenas em tecidos germinativos, minimizando os efeitos deletérios e se perpetuando ao longo das gerações (HAIG, 2016). Como consequência, grande parte do conhecimento sobre a atividade de TEs é baseado na transposição em células germinativas.

Durante muito tempo, pouco interesse foi dado para a transposição em células somáticas, pois esses eventos não são herdáveis e possuem efeito apenas sobre o organismo hospedeiro, sem contribuir aparentemente para os processos evolutivos. No entanto, evidências acumuladas nas duas últimas décadas mostram que TEs podem ser mais ativos em tecidos somáticos do que se acreditava.

Esse fenômeno é chamado de Transposição Somática (TS) e parece ocorrer principalmente durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (LEVIN; MORAN, 2011; RICHARDSON et al., 2014).

Quando a TS ocorre mais tarde no desenvolvimento, ela pode provocar variação no material genético entre células do mesmo tecido, gerando mosaicismos (VIJG, 2014).

Isso pode ser observado no sistema nervoso de humanos, onde a TS de retrotransposons LINE-1 parece contribuir para a diversificação e plasticidade neuronal. Essa variabilidade produzida pela atividade de TEs pode ter um papel importante no desenvolvimento cognitivo e diferenças comportamentais entre indivíduos. No entanto, mais estudos são necessários para compreender melhor a dinâmica desses elementos no cérebro (EVRONY, 2016; RICHARDSON et al., 2014; SINGER et al., 2010; THOMAS et al., 2012; UPTON et al., 2015).

Um estudo recente demonstrou que algo parecido ocorre em *Drosophila*: retrotransposons com LTR, LINEs e transposons de DNA são ativos em estruturas neuronais de forma cogumelar, conhecidas como “*mushroom bodies*”, que estão relacionadas à memória olfativa. Esses dados sugerem que o mosaïcismo genético pode ser uma característica conservada em certos neurônios (PERRAT et al., 2013).

Apesar de contribuir para a diversificação do material genético, a TS possui muitos efeitos negativos para os organismos hospedeiros. Os TEs podem produzir mutações, quebras na molécula de DNA, mudanças epigenéticas e alterações cromossômicas, o que contribui para a instabilidade do genoma (HANCKS; KAZAZIAN, 2012; KAER; SPEEK, 2013; KONKEL; BATZER, 2010).

Todos esses fatores sugerem que a TS esteja relacionada ao desenvolvimento de várias doenças, como transtornos psiquiátricos, doenças neurodegenerativas, síndromes e, principalmente, câncer (AYARPADIKANNAN; KIM, 2014).

Vários transtornos psiquiátricos têm sido relacionados a TS de retrotransposons em humanos. A atividade anormal desses elementos foi detectada no cérebro de pacientes com esquizofrenia em estágios leves e avançados. O mesmo foi observado em pacientes com distúrbios de bipolaridade, autismo e depressão profunda (GUFFANTI et al., 2014).

Análises computacionais sugerem que a TS desses elementos pode afetar a expressão de genes de neurotransmissores, como dopaminas, serotoninas e glutamato (ABRUSÁN, 2012). A variação provocada na biossíntese desses compostos poderia afetar o metabolismo do sistema nervoso e prejudicar as sinapses nervosas, levando a desordens neurológicas.

Outro fator importante a ser considerado é a morte de neurônios, causada pela transposição em genes essenciais para o funcionamento celular. Isso poderia levar a perda de neurônios em regiões do cérebro com maior atividade de TEs (ABRUSÁN, 2012).

Pesquisas com TS podem esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de câncer. Os TEs podem ser usados como agentes mutagênicos para induzir câncer agressivo em camundongos. As mutações causadas pela TS em células tumorais auxiliam na identificação de genes e vias regulatórias envolvidas na oncogênese. Os elementos mais utilizados nesse tipo de

estudo são os transposons *Sleeping Beauty* e *piggyBac* (DeNICOLA et al., 2015; MORIARITY; LARGAESPADA, 2015).

Além disso, amostras humanas de diferentes tipos de tumores têm sido sequenciadas para análise. Esse procedimento tem como objetivo encontrar mutações que possam explicar o papel dos retrotransposons no desenvolvimento do câncer (ARDELJAN et al., 2016; HELMAN et al., 2014; LEE et al., 2012; SHUKLA et al., 2013; SOLYOM et al., 2012).

Uma dessas análises detectou mais de 190 eventos de TS em amostras de tumores de próstata, ovário e colorretal. Foi observado ainda que as inserções ocorreram preferencialmente em genes conhecidos como supressores tumorais, que têm sua expressão alterada em células carcinogênicas (LEE et al., 2012).

Esses dados indicam que a TS pode atuar na indução dessa doença. Os TEs produzem mutações ao se transpor, gerando instabilidade genética, o que os torna potenciais agentes oncogênicos (CHÉNAIS, 2013).

No entanto, a ativação desses retroelementos pode ser uma consequência do processo de neoplasia (CHÉNAIS, 2013). A hipometilação do DNA parece ser comum em células tumorais (KULIS; ESTELLER, 2010; ROSS et al., 2010), o que pode contribuir para a ativação da TS.

Ainda existem muitas questões não compreendidas sobre o desenvolvimento de câncer, mas está claro que este é um processo multifatorial (HOEIJMAKERS, 2009; VOGELSTEIN et al., 2013). Mais estudos são necessários para determinar se a ativação de retrotransposons pode ser uma das causas dessa doença (CHÉNAIS, 2013).

1.5 A TRANSPOSIÇÃO SOMÁTICA E O ENVELHECIMENTO

A ativação de TEs em tecidos somáticos pode estar envolvida no envelhecimento celular. Os TEs são conhecidos por gerar instabilidade genética e podem ser agentes importantes no processo de senescência (SEDIVY et al., 2013).

O envelhecimento tem efeitos em todos os níveis de complexidade biológica, do nível celular ao organismo como um todo. No entanto, são os aspectos moleculares do envelhecimento que contêm as respostas para compreender esse processo.

De maneira geral, existem dois tipos de envelhecimento celular: o cronológico e o replicativo. O envelhecimento cronológico ocorre em células diferenciadas que não sofrem replicação e está associado a alterações em função do tempo, devido ao acúmulo de danos no DNA. O envelhecimento replicativo pode ser observado em células de tecidos que estão em

constante substituição. Essas células suportam um número finito de mitoses, que é determinado pelo encurtamento dos telômeros, e depois entram em estado de senescência (RODIER; CAMPISI, 2011).

Muitas hipóteses tentam explicar quais os fatores genéticos e ambientais envolvidos no envelhecimento celular. Esse processo parece estar diretamente relacionado ao acúmulo de mutações, que resultam em mau funcionamento e morte celular (HOEIJMAKERS, 2009; SEDIVY et al., 2013; STURM et al., 2015).

Algumas vias regulatórias e processos celulares essenciais são afetados durante a senescência. Os mecanismos de regulação epigenética parecem sofrer grandes alterações, como a perda de regiões metiladas e modificações nas histonas (WOOD; HELFAND, 2013). A hipometilação do DNA pode afetar drasticamente a homeostase celular, ativando genes que antes tinham sua transcrição reprimida e TEs que estavam silenciados.

Estudos relacionando o declínio da heterocromatina e a ativação de TEs durante o envelhecimento têm sido realizados em diferentes modelos, como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, camundongos e culturas celulares de mamíferos (STURM et al., 2015; WOOD; HELFAND, 2013).

Em *Drosophila*, a redução na heterocromatina e a ativação da TS de retrotransposons foi detectada no corpo gorduroso, um órgão de imunidade humoral equivalente ao fígado e tecido adiposo em mamíferos. As altas taxas de transposição foram correlacionadas a um aumento nos danos à molécula de DNA nas células desse tecido (CHEN et al., 2016).

Além disso, também foi observada a ativação de muitos TEs no cérebro de *Drosophila* durante o envelhecimento. O aumento nas taxas de TS parece estar relacionado ao declínio neuronal em moscas mais velhas (LI et al., 2013).

Esses efeitos podem ser notados mais cedo em moscas de uma linhagem mutante para *Ago2*, que participa do silenciamento de TEs em células somáticas. Os mutantes *Ago2* não possuem um mecanismo eficiente para reprimir a atividade de TEs, o que leva a ativação desses elementos em tecidos somáticos de moscas ainda jovens. Essas moscas apresentam diminuição na expectativa de vida, indicando que a ativação da TS está relacionada a redução da longevidade (LI et al., 2013).

As alterações nos padrões de regulação epigenética podem diferir um pouco em mamíferos. Um resultado interessante foi observado durante a senescência replicativa de fibroblastos humanos em cultura celular (DeCECCO et al., 2013a), assim como em tecidos de camundongos *in vivo* (DeCECCO et al., 2013b).

Durante o processo de envelhecimento, parece haver uma suavização nas diferenças de compactação entre regiões de heterocromatina e eucromatina. Enquanto regiões de heterocromatina sofrem relaxamento, ativando a expressão de TEs, as regiões de eucromatina, ricas em genes, parecem sofrer compactação, diminuindo a transcrição como um todo (DeCECCO et al., 2013a; DeCECCO et al., 2013b).

Outro estudo analisou a metilação de retrotransposons em células do sangue de pacientes em diferentes faixas etárias. Foi detectada uma correlação significativa entre hipometilação do retroelemento *Alu* e envelhecimento, em pacientes entre 34 e 68 anos (JINTARIDTH; MUTIRANGURA, 2010).

Assim como ocorre no câncer, a ativação de TEs durante o envelhecimento aumenta as taxas de mutações e danos à molécula de DNA, levando a perturbação de todo o funcionamento celular. Isso sugere que a TS desses elementos é um fator determinante no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças associadas a esse processo (SEDIVY et al., 2013; STURM et al., 2015).

Alguns autores defendem que a TS pode ser a principal causa desses fenômenos, mas existem dificuldades metodológicas para testar essa hipótese (SEDIVY et al., 2013; STURM et al., 2015).

Uma alternativa seria o desenvolvimento de fármacos que reprimam a transposição, de maneira semelhante às drogas usadas no tratamento de retrovíroses como o HIV em humanos (SEDIVY et al., 2013). Essas drogas se ligam ao sítio catalítico da Transcriptase Reversa (do inglês, *Reverse Transcriptase* - RT), inibindo sua atividade e interrompendo o ciclo de infecção dos retrovírus.

Um estudo em culturas de células mostrou um efeito significativo de inibidores de RT na repressão de retrotransposons LINE-1 (DAI et al., 2011).

O desenvolvimento de novas metodologias para estudos de TS pode auxiliar na compreensão dos fatores e mecanismos envolvidos no envelhecimento e nas doenças associadas a esse processo, como o câncer, além de esclarecer qual a participação dos TEs nesses fenômenos.

1.6 O ELEMENTO TRANSPONÍVEL *mariner* E A MUTAÇÃO *white-peach* EM *Drosophila*

O elemento transponível *mariner* é um transposon capaz de se transpor tanto em células somáticas quanto em germinativas. Esse elemento pertence à Classe II, Subclasse I, Ordem TIR, Superfamília *Tc1-mariner* e Família *mariner* (WICKER et al., 2007).

A Superfamília *Tc1-mariner* é ubíqua em eucariotos (WICKER et al., 2007), sendo a Família *mariner* o grupo de TEs mais distribuído na natureza, com representantes nos mais variados táxons, como fungos, ciliados, rotíferos, insetos, nematoides, peixes e mamíferos (MUÑOZ-LÓPEZ; GARCÍA-PÉREZ, 2010).

O primeiro elemento *mariner* descrito possui 1286 nucleotídeos de extensão, com TIRs de 28 pb flanqueando uma única ORF (do inglês, *Open Reading Frame*) que codifica uma transposase de 346 aminoácidos (JACOBSON et al., 1986; MEDHORA et al., 1991).

Esse transposon tem preferência por sítios receptores ricos em nucleotídeos TA, gerando um sítio alvo de duplicação (TSD) TA (JACOBSON et al., 1986; MEDHORA et al., 1991).

A descoberta de *mariner* ocorreu devido uma alteração fenotípica na coloração dos olhos em *Drosophila mauritiana*. A inserção desse transposon na região promotora do gene *white*, localizado no cromossomo X, leva a uma redução drástica na expressão desse gene, gerando moscas com olhos cor de pêssego, chamadas de *white-peach* (HAYMER; MARSH, 1986; JACOBSON; HARTL, 1985; JACOBSON et al., 1986). A proteína codificada pelo gene *white* atua no transporte dos precursores dos pigmentos que dão cor ao olho de *Drosophila* (EWART; HOWELLS, 1998; O'HARE et al., 1984; SULLIVAN, SULLIVAN, 1975; SULLIVAN et al., 1979).

A cópia do elemento *mariner* causadora da mutação *white-peach*, conhecida como cópia “*peach*”, não é capaz de produzir a transposase para sua transposição, permanecendo estável no genoma. No entanto, na presença de outras cópias de *mariner* autônomas, o elemento inserido no gene *white* pode utilizar essas transposases para se mobilizar em algumas células, revertendo parcialmente a mutação (BRYAN et al., 1987; JACOBSON et al., 1986).

A transposição do elemento em células somáticas que originarão os olhos resulta em moscas com fenótipo mosaico. Essas moscas possuem olhos *white-peach* com manchas de coloração vermelha, onde ocorreu reversão ao fenótipo selvagem devido a excisão do *mariner peach* (Figuras 1 e 2) (BRYAN et al., 1987; HAYMER; MARSH, 1986; JACOBSON et al., 1986; MEDHORA et al., 1988; MEDHORA et al., 1991).

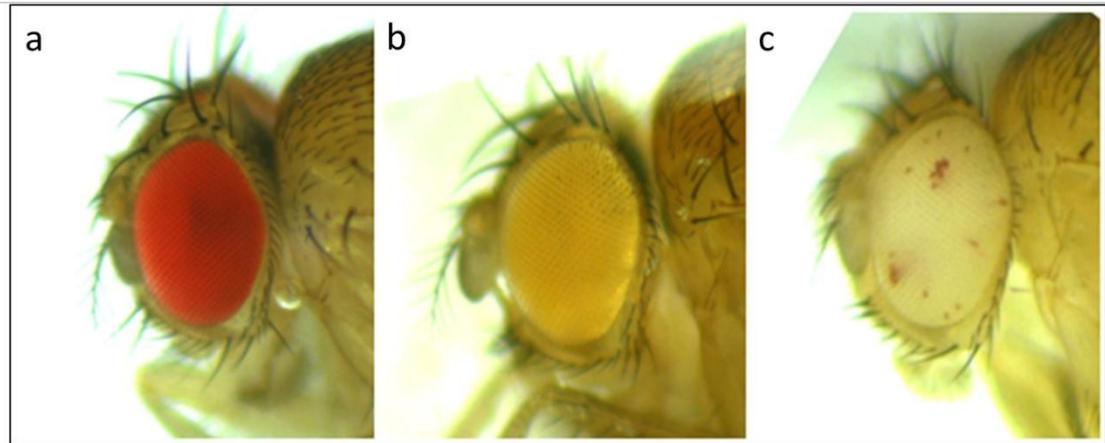


Figura 1: Diferentes fenótipos na coloração dos olhos em *Drosophila*: a) mosca com olho vermelho correspondente ao fenótipo selvagem; b) mosca com mutação *white-peach*; c) mosca com fenótipo mosaico: olho *white-peach* com manchas vermelhas. Fotos de Mariana Cancian.

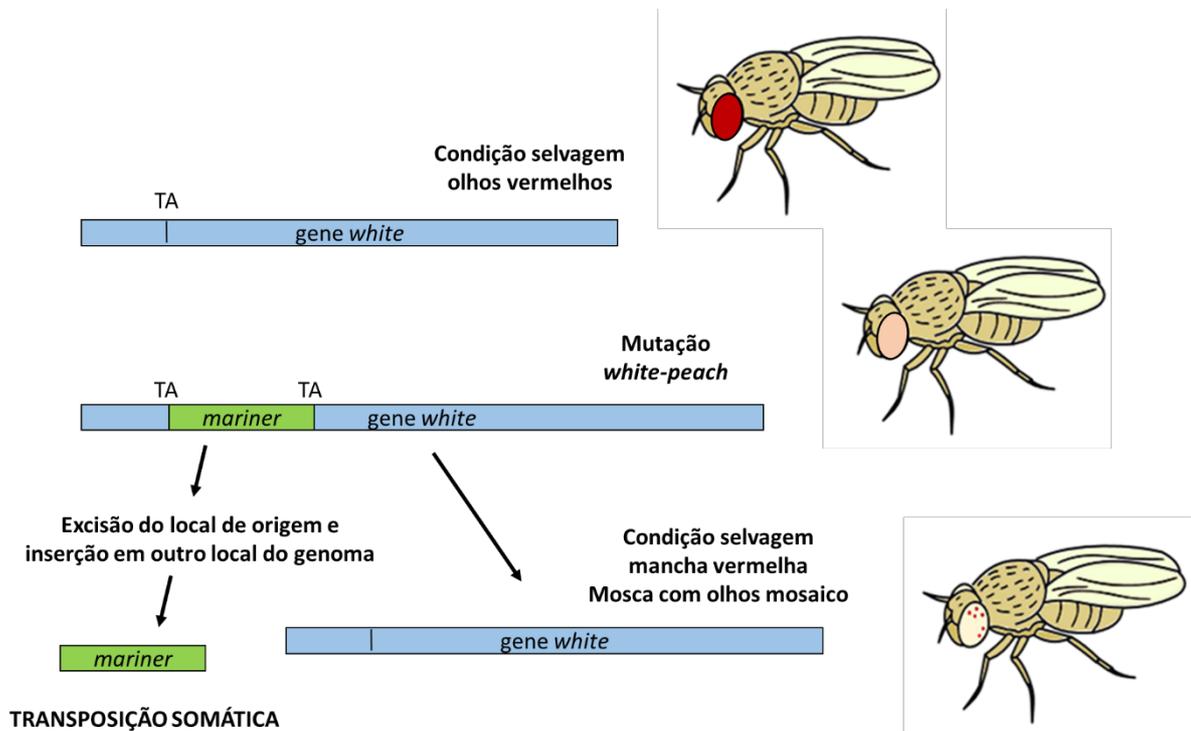


Figura 2: relação entre o genótipo (condição do gene *white*) e o fenótipo (coloração dos olhos) em *Drosophila*. Na parte superior da figura temos a condição selvagem do gene *white* e seu respectivo fenótipo, uma mosca com olhos vermelhos. A mutação *white-peach* é causada pela inserção do elemento *mariner* na região promotora do gene *white*, gerando moscas com olhos cor de pêssego. Na presença de cópias autônomas, o *mariner* inserido no gene *white* é capaz de se transpor em algumas células, revertendo parcialmente a mutação e resultando em moscas com genótipo e fenótipo mosaico. Essas moscas apresentam olhos *white-peach* com manchas vermelhas.

A primeira cópia ativa descrita foi chamada de fator de mosaicismo ou *Mos1*, pois promovia o fenótipo mosaico. O *mariner Mos1* apresenta a mesma extensão da cópia *peach*, diferindo em apenas 11 nucleotídeos distribuídos ao longo da sequência (MEDHORA et al., 1988; MEDHORA et al., 1991).

Posteriormente, a cópia mutante *peach* foi transferida por hibridização interespecífica para *D. simulans* e por transgenia para *D. melanogaster*, gerando linhagens *white-peach* dessas espécies (BRYAN et al., 1987; GARZA et al., 1991).

O modelo *white-peach* foi amplamente utilizado para analisar a atividade do elemento *mariner* em populações naturais de *Drosophila*. Ao realizar cruzamentos entre machos selvagens e fêmeas *white-peach*, a atividade do elemento pode ser avaliada pela progênie de machos mosaicos (CAPY et al., 1990; JARDIM; LORETO, 2011).

O número de cópias ativas pode variar entre espécies de *Drosophila*: *D. mauritiana* pode conter de 10 a 20 cópias desse transposon; em *D. simulans*, o número de cópias é bastante diversificado, podendo ocorrer diferenças intrapopulacionais; e em *D. melanogaster* parece estar ausente (CAPY et al., 1990; HARTL, 2001; JACOBSON et al., 1986; PICOT et al., 2008; RUSSELL; WOODRUFF, 1999).

O fato da excisão do elemento *mariner* se refletir diretamente no fenótipo mosaico, sendo este facilmente observável, faz do mutante *white-peach* um excelente modelo para estudos de transposição somática em *Drosophila*.

1.7 ESTRESSE TÉRMICO E TS DO ELEMENTO *mariner*

A transposição de muitos elementos pode ser influenciada por condições ambientais. Fatores abióticos, como temperatura e irradiação, e fatores bióticos, como infecções virais, podem desencadear a ativação de TEs (GUERREIRO, 2012).

O aumento de temperatura pode ativar a transposição do elemento *mariner* em *Drosophila simulans* (CHAKRANI et al., 1993; JARDIM; LORETO, 2011; JARDIM et al., 2015).

Várias pesquisas analisaram a atividade de *mariner* em populações naturais de *D. simulans* de diferentes latitudes. As populações distribuídas em regiões de menor latitude teriam taxas elevadas de TS em função da temperatura, no entanto, resultados controversos mostraram que essa hipótese não pode ser generalizada. Fatores históricos e evolutivos, como rotas de dispersão e eventos de colonização, podem interferir na dinâmica desse elemento (GIRAUD; CAPY, 1996; PICOT et al., 2008; RUSSELL; WOODRUFF, 1999).

Estudos realizados em laboratório mostram uma relação mais direta entre aumento da temperatura e ativação da TS. A resposta ao estresse térmico pode ocorrer através do aumento na transcrição da transposase de *mariner*. Esse elemento contém a uma sequência de 14bp na região 5' UTR que possui de 50 a 57% de similaridade com regiões promotoras de proteínas de

choque térmico (do inglês, *Heat Shock Proteins* - HSPs) (CHAKRANI et al., 1993; JARDIM et al., 2015).

O aumento de temperatura estimula síntese de HSPs, que podem funcionar como chaperonas moleculares, impedindo a desnaturação de outras proteínas pelo calor. O estresse estimula fatores de transcrição que se ligam às regiões promotoras dos genes *Hsp*, ativando sua expressão (SANTORO, 2000).

Logo, o elemento *mariner* pode ser co-ativado pelos mesmos fatores de transcrição, levando ao aumento da TS em função da temperatura (JARDIM et al., 2015).

O estresse por temperatura está relacionado à redução na expectativa de vida de *Drosophila*, devido ao acúmulo de mutações em tecidos somáticos (GARCIA et al., 2010).

Os TEs são conhecidos por seu potencial mutagênico e sua ativação em tecidos somáticos pode ter consequências a longo prazo na vida dos indivíduos, porém não existem trabalhos mostrando se eventos de TS podem ser acumulados.

A dificuldade em realizar esses estudos está no desenvolvimento de uma metodologia que possa responder de maneira satisfatória essas questões.

A ativação do elemento *mariner* sob estresse por temperatura e o modelo *white-peach* fornecem as ferramentas necessárias para estudar o acúmulo de TS em *Drosophila*. A taxa de transposição somática pode ser quantificada através do número de manchas das moscas com fenótipo mosaico, pois cada mancha reflete um evento de excisão do elemento *mariner* e, como consequência, um evento de TS.

Nesse estudo utilizamos o estresse térmico para ativar a transposição do elemento *mariner* em diferentes estágios do desenvolvimento de *D. simulans white-peach*, buscando verificar se eventos de TS são acumulados ao longo da vida desse organismo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como principal objetivo verificar se fenômenos de transposição somática do elemento *mariner* são acumulados ao longo do desenvolvimento de *Drosophila*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Medir a taxa de TS nos diferentes estágios do desenvolvimento submetidos ao estresse térmico através do número de manchas das moscas com fenótipo mosaico.

Analisar a expressão de *mariner* por RT-qPCR e verificar se ocorre maior ativação transcricional do elemento ao final de cada fase do desenvolvimento submetida ao estresse.

Estimar a TS do elemento *mariner* em diferentes fases do desenvolvimento por qPCR através da taxa de mosaicismo no gene *white*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DA LINHAGEM

Este estudo foi realizado com uma linhagem de *Drosophila simulans white-peach* (*wpch*) estabelecida no laboratório, chamada linhagem *teste*, com baixa atividade de *mariner* (JARDIM et al., 2015).

Essa linhagem foi obtida através do cruzamento entre fêmeas de *D. simulans white-peach* com machos de uma linhagem selvagem coletada em Brasília (BR), que possuía um número conhecido de cópias ativas de *mariner*. A partir da F2 foram feitas isolinhagens, selecionando aquelas com fenótipo mosaico, até se estabelecer uma linhagem estável com baixa expressão desse elemento (JARDIM et al., 2015).

O número de cópias de *mariner* na linhagem *teste* foi estimado por qPCR em 1,84 ($\pm 0,83$). Todos os indivíduos possuem a cópia *peach* inativa no gene *white*, logo a maioria possui uma única cópia ativa, podendo variar para duas ou nenhuma (JARDIM et al., 2015).

3.2 TRATAMENTOS DE VARIAÇÃO DA TEMPERATURA

Os tratamentos de variação de temperatura consistem em expor os indivíduos a estresse térmico durante diferentes fases do seu desenvolvimento. A temperatura de 28°C foi escolhida por ter sido utilizada em outros trabalhos para induzir estresse térmico (JARDIM; LORETO, 2011; JARDIM et al., 2015).

Os tratamentos foram divididos em oito categorias: 1) controle, no qual os indivíduos permaneceram a 20°C durante todo o seu desenvolvimento; 2) indivíduos submetidos a 28°C apenas durante o estágio de embrião; 3) indivíduos a 28°C durante o estágio de embrião e larval; 4) indivíduos a 28°C durante o 1° e 2° instar larval; 5) indivíduos a 28°C durante todo o estágio

larval; 6) indivíduos a 28°C durante o estágio de pupa; 7) indivíduos a 28°C durante o estágio larval e de pupa; 8) indivíduos a 28°C durante todo o seu desenvolvimento. A figura 3 apresenta um esquema representativo dos tratamentos de variação de temperatura para cada uma das categorias.

As categorias em que mais de uma fase do desenvolvimento foi exposta ao estresse foram estabelecidas para verificar se existe um aumento nas taxas de transposição com relação às categorias em que apenas uma das fases sofreu estresse.

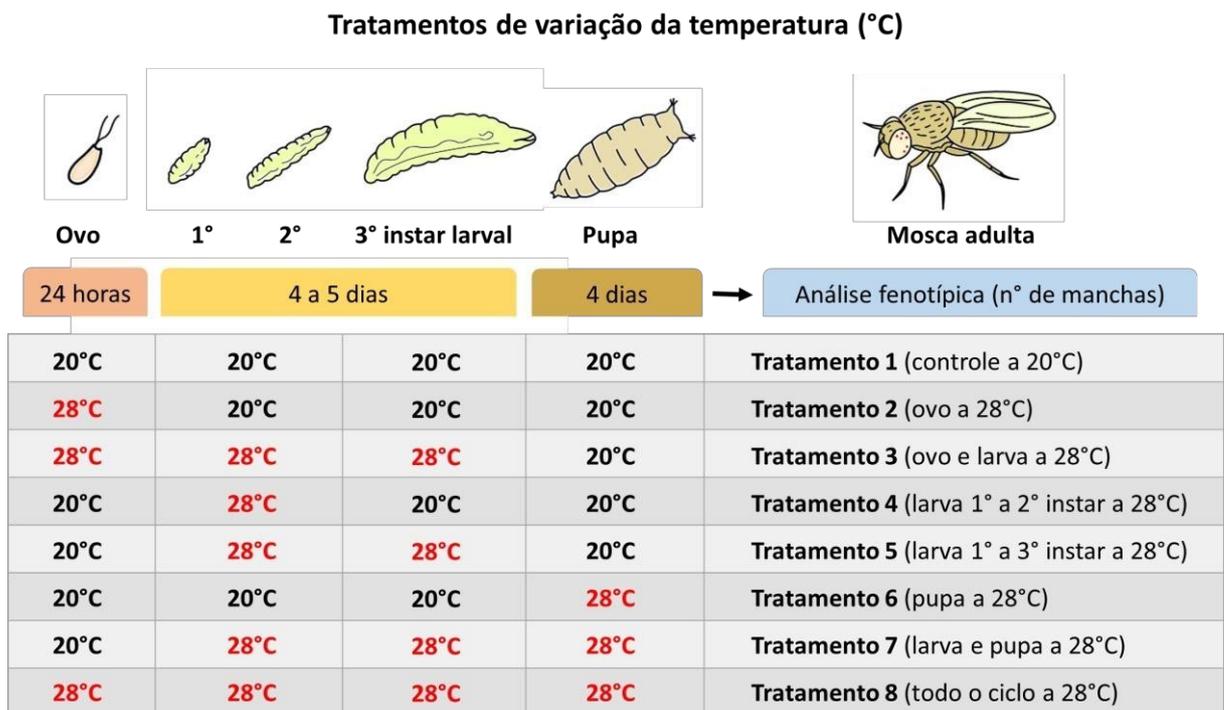


Figura 3: esquema representativo dos oito tratamentos de variação da temperatura, nos quais os indivíduos foram expostos ao estresse térmico (28°C) durante diferentes fases do desenvolvimento e mantidos a 20°C nas demais fases. Após a eclosão das pupas, foram analisadas 100 moscas de cada tratamento quanto ao número de manchas nos olhos.

Para a realização de cada tratamento, cerca de 50 moscas da linhagem foram colocadas para ovopositar em vidros de 50 ml com meio de cultura durante 2 horas a 20°C e retiradas após esse período. Nos tratamentos 2, 3 e 8, em que a fase de embrião foi mantida sob temperatura elevada, a ovoposição ocorreu a 28°C.

Os meios foram verificados diariamente para que cada fase do desenvolvimento fosse mantida na temperatura correta segundo as categorias estabelecidas.

Foram coletadas aleatoriamente 100 moscas nascidas de cada tratamento e observadas em microscópio estéreo. Os indivíduos que apresentavam olhos mosaicos foram fotografados

com auxílio de uma câmera acoplada no aumento 4,5x e o número de manchas apresentado por cada indivíduo foi contado, sendo cada mancha considerada um evento de transposição.

As análises estatísticas desse experimento foram realizadas no software *GraphPad Prism 6*, utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's para múltiplas comparações (comparando cada tratamento contra os demais).

3.3 TRATAMENTOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA

Foram realizados tratamentos independentes para extração de RNA, a fim de medir a expressão do elemento *mariner* em cada estágio do desenvolvimento após o estresse.

Esses tratamentos foram: A) estágio de embrião a 28°C por 6 horas; B) estágio larval a 28°C por 6 horas; e C) estágio de pupa a 28°C por 6 horas;

Ao final do período de 6 horas, foram coletados 100 embriões do tratamento A, 50 larvas de B e 20 pupas de C por amostra, para extração do RNA total. Foram feitos controles para cada um dos tratamentos (A, B e C), os quais permaneceram a 20°C durante todo o período de 6 horas até a sua extração. Para cada tratamento foram feitas réplicas biológicas.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

As amostras foram homogeneizadas em TRIzol[®] Reagent, da Invitrogen[™] Life Technologies. Todo o procedimento de extração seguiu as instruções do protocolo que acompanha o produto, até a ressuspensão com H₂O DEPC.

Para eliminar eventuais contaminações por DNAs, a enzima DNase I (Invitrogen) foi adicionada as amostras contendo os RNAs totais.

A síntese dos cDNAs foi feita com a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), utilizando *primers* oligo-dT e seguindo as orientações do fabricante do produto.

A concentração das amostras foi medida no equipamento *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* e, então, diluída para a concentração final de 3 ng/μl.

3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

O *mix* utilizado na reação de RT-qPCR seguiu as seguintes concentrações: 20 pmol de cada *primer*, 5 mM de dNTPs, Tampão de PCR 10X, 50 mM de MgCl₂ e *SYBR green* 1X,

Platinum Taq DNA polimerase 5 U e H₂O para completar o volume desejado. Para cada reação foram pipetados 5 µL do mix e 5 µL de amostra. Foram feitas triplicadas técnicas para cada reação. O equipamento de PCR em Tempo Real utilizado foi StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

As condições do RT-qPCR iniciaram a 95°C por 7 minutos (Polymerase Activation), seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C (PCR Cycling), seguidos por 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 30 segundos a 95°C (Melt Curve).

Um gene ribossomal cópia única (L17-RPL17) foi usado como gene de referência. Os *primers* utilizados foram RPL 17q2-1 F 5'-CCCTCCTTTTCGTTTTTCGTT-3' e RPL 17q2-2 R 5'-GTGTTGTCG GCACAGTTCAT-3' que amplificam um fragmento de 345 pb.

O gene de *Hsp70* foi usado como um controle positivo para o estresse por temperatura. Os *primers* utilizados para *Hsp70* foram HSP70 F: 5'-GCTGACGTTTCAGGATTCCAT-3' e HSP70 R: 5'-CGGAGTCTCCATTCAGGTGT-3' que amplificam um fragmento de 160 pb.

Os *primers* utilizados para *mariner* foram Mos 308 F 5'-GTGAACGGTGGTTT CAACG-3' e Mos 490 R 5'-AGCGATTGGAACTGCTTGT-3' que amplificam um fragmento de 184 pb.

A análise da expressão em relação ao gene de referência foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) usando os valores de Ct obtidos com o software *StepOne* v2.0.

A expressão de *mariner* e *Hsp70* foi comparada entre cada tratamento e seu respectivo controle. As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 6*, utilizando Teste t para dados paramétricos e Teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos.

3.6 ESTIMATIVA DA TAXA DE TS PELO MOSAICISMO NO GENE *white*

Foram realizados dois tratamentos para extração de DNA em diferentes fases do desenvolvimento (fase larval e fase adulta), a fim de estimar a taxa de transposição da cópia de *mariner* causadora da mutação *white-peach* sob estresse por temperatura.

No primeiro tratamento, os indivíduos foram mantidos a 28°C do início do seu desenvolvimento até o 2º instar larval, quando foram coletados para extração de DNA. Os indivíduos do controle foram mantidos a 20°C durante o período até sua extração.

No tratamento 2 os indivíduos permaneceram a 28°C durante todo o seu desenvolvimento até a fase adulta (mosca), quando foram coletados para extração de DNA. O controle foi mantido a 20°C durante o período até sua extração.

Além dos controles a 20°C, também foram feitos para cada um dos tratamentos extrações com indivíduos de uma linhagem selvagem de *D. simulans* e da linhagem mutante *D. melanogaster white-peach*.

A espécie *D. melanogaster* não possui cópias ativas do elemento *mariner*, logo os mutantes *white-peach* dessa espécie contêm apenas a cópia de *mariner* inativa no gene *white*, não ocorrendo transposição.

As moscas da linhagem selvagem possuem 100% do seu genoma com o gene *white* na condição selvagem, enquanto as moscas da linhagem *D. melanogaster white-peach* possuem em 100% do seu genoma o gene *white* contendo a cópia de *mariner* causadora da mutação *white-peach*.

Logo essas linhagens serviram como referência na comparação com os dois tratamentos, para estimar a taxa de excisão do elemento *mariner* através da porcentagem de mosaicismo do gene *white*, com base na presença ou ausência da cópia do elemento nesse gene.

Para cada tratamento foram feitas réplicas biológicas e em cada amostra foram utilizados 20 indivíduos para extração de DNA.

3.7 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração foi realizada seguindo protocolo adaptado com Fenol/Clorofórmio (SASSI et al., 2005). Após a extração, as amostras foram submetidas a reação com a enzima RNase A (Ludwig Biotec) seguindo o protocolo do produto.

A concentração das amostras foi medida no equipamento *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* e diluída para a concentração final de 3 ng/μl.

3.8 ANÁLISE DA TAXA DE TS POR qPCR

A concentração dos reagentes do *mix*, o preparo da placa, as condições da qPCR e o gene de referência foram os mesmos descritos anteriormente.

Para esse experimento foram sintetizados dois pares de *primers* a fim de medir a taxa de excisão da cópia de *mariner* inserida no gene *white*. A figura 4 apresenta um esquema da região amplificada por cada *primer*.

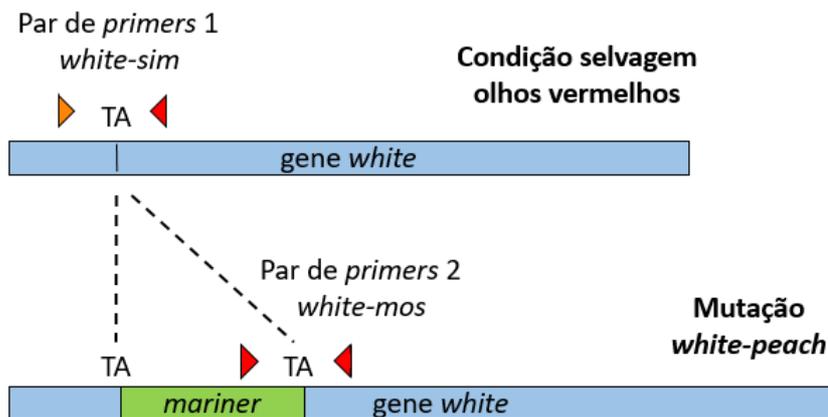


Figura 4: representação da região amplificada por cada par de *primers*. O par de *primers* 1, chamado “*white-sim*”, amplifica uma região do gene *white* onde ocorre a inserção de *mariner*. É importante observar que a amplificação ocorre na ausência desse transposon. O par de *primers* 2, chamado “*white-mos*”, amplifica uma região que engloba um segmento de *mariner* e outro do gene *white*, logo a amplificação ocorre na presença do transposon. Esse conjunto de *primers* permitiu estimar a taxa de transposição do elemento *mariner* com base na presença ou ausência desse transposon no gene *white*.

As sequências dos *primers* *white-sim* foram F: 5’-CCAATCACCCAATCACTCAA-3’ e R: 5’-TCGTGACGAAGCTCCAAGC-3’, que amplificam um fragmento de 107 pb.

Nos qPCR com esse par de *primers*, as amostras da linhagem de *D. simulans* foram utilizadas como controle positivo para a amplificação, visto que carregam em seu genoma o gene *white* na condição selvagem (sem *mariner*). Logo, a curva de amplificação dessas amostras serviu como referência para estimar a porcentagem de reversão do gene *white* à condição selvagem nos tratamentos a 20 e 28°C.

As sequências dos *primers* *white-mos* foram F: 5’-CCGCAAAGACGATGAGTTC-3’ e R: 5’-TCGTGACGAAGCTCCAAGC-3’, que amplificam um fragmento de 197 pb. Nos qPCR com os *primers* *white-mos*, foram utilizadas como referência as amostras da linhagem *D. melanogaster wpch*, que possui em seu genoma apenas a condição mutante do gene *white* (com *mariner*).

O cálculo em relação ao gene de referência (RPL) foi realizado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) usando os valores de Ct obtidos com o software *StepOne* v2.0.

A taxa de excisão do elemento *mariner* no gene *white* foi feita pela comparação entre os tratamentos e as duas linhagens de referência (*D. simulans* e *D. melanogaster white-peach*) e entre cada tratamento a 28°C com seu controle a 20°C.

Essa análise se refere a saída do transposon do seu local de origem no gene *white* (sítio doador) para se inserir em um novo local do genoma (sítio receptor), logo pode servir como uma estimativa da TS desse elemento.

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 6*. Os tratamentos a 20 e 28°C foram comparados com cada linhagem de referência utilizando ANOVA-1-via para dados paramétricos, seguido pelo teste de Dunnett's, ou Teste de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos, seguido pelo teste de Dunn's. Os tratamentos a 20 e 28°C foram comparados entre si utilizando Teste t para dados paramétricos e Teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TRATAMENTOS DE VARIAÇÃO DA TEMPERATURA

Os tratamentos em que uma ou mais fases do desenvolvimento foram expostas ao estresse apresentaram aumento estatisticamente significativo no número de manchas com relação ao controle a 20°C, mas isso não foi detectado para a fase embrionária (ovo a 28°C) (Figura 5).

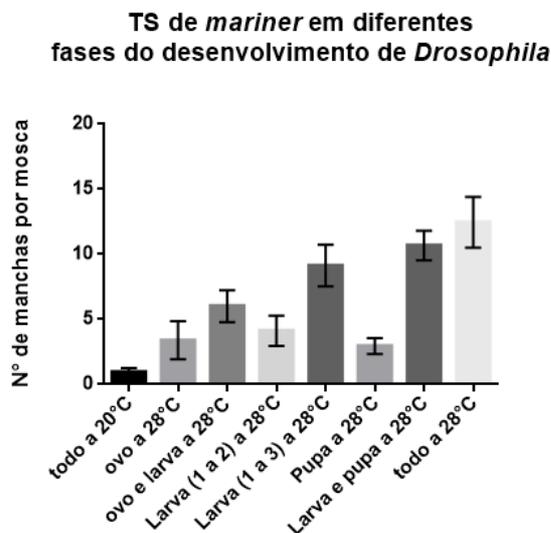


Figura 5: média do número de manchas por moscas em cada tratamento de variação da temperatura. O quadro 4 nos anexos apresenta

informações referentes à análise estatística dos dados, como a presença ou ausência de diferença significativa entre os tratamentos comparados e o grau de significância entre eles.

Os tratamentos em que mais de uma fase do desenvolvimento permaneceu a 28°C foram comparados com aqueles em que apenas uma das fases sofreu o estresse.

A categoria em que as fases de ovo e larva foram expostas a 28°C apresentou aumento significativo no número de manchas quando comparada com a categoria de ovo a 28°C, mas não com larva a 28°C.

A fase de ovo a 28°C não apresentou diferença com o controle a 20°C, sugerindo que a taxa de transposição durante essa fase do desenvolvimento pode ser muito baixa, tornando o acúmulo entre a fase embrionária e larval não detectável com a análise estatística empregada ou, alternativamente, que nessa fase não há diferença na taxa de mobilização do elemento *mariner* por estresse térmico.

Essa metodologia utiliza o número de manchas nos olhos das moscas com fenótipo mosaico para estimar a taxa de transposição do elemento *mariner* em todo organismo. Espera-se que essa taxa seja igual para todos os tecidos, no entanto só são estimados os eventos de TS que ocorrem em células precursoras de omatídeos.

No início da embriogênese, cerca de 20 células estão destinadas a compor a estrutura dos olhos na mosca adulta. Esse número cresce para 10000 no disco imaginal do olho até o terceiro instar larval (HALES et al., 2015). Logo, a taxa de TS estimada para a fase embrionária pode ser uma subestimativa, visto que só serão detectados os eventos que aconteceram em um pequeno conjunto de células.

A categoria em que toda a fase larval (1° ao 3° instar) foi exposta a 28°C apresentou um aumento significativo em relação aos indivíduos que sofreram estresse apenas durante o 1° e 2° instar larval, indicando um acúmulo de eventos de TS ao longo dessa fase do desenvolvimento.

Os tratamentos que incluíam a fase larval a 28°C (larva 1° a 3° instar a 28°C; ovo e larva a 28°C; larva e pupa a 28°C; e todo o desenvolvimento a 28°C) exibiram as maiores médias de manchas com relação ao controle a 20°C. Esses dados apontam para uma elevada taxa de transposição durante a fase larval.

O tratamento de pupa a 28°C apresentou uma diferença pequena no número de manchas com relação ao controle a 20°C, sugerindo que as taxas de transposição são baixas durante essa fase.

O tratamento de larva e pupa a 28°C mostrou um aumento significativo em relação ao controle a 20°C e a pupa a 28°C, mas não houve aumento no número de manchas entre o tratamento de larva e pupa a 28°C com o de larva a 28°C.

Esses dados mostram a ativação de *mariner* sob estresse ao longo dessas fases do desenvolvimento e que o acúmulo de transposição não ocorre de forma linear, variando de acordo com os estágios de maior e menor ativação do transposon ou, alternativamente, de maior ou menor taxa de divisão celular.

Analisando esses resultados sob o aspecto da duração de cada fase exposta ao estresse, percebe-se uma relação entre o tempo de exposição e a taxa de TS para alguns dos tratamentos.

A fase embrionária dura em média 24 horas (HALES et al., 2015; TYLER, 2000), como consequência, o tempo de exposição ao estresse térmico para esse tratamento (ovo a 28°C) foi muito curto. O período em que esse tratamento permaneceu a 28°C pode ter sido insuficiente para a ativação de *mariner* ou para acumular transposições em quantidade detectável por essa análise.

Já em fases do desenvolvimento mais longas como a fase larval, que dura em média de 4 a 5 dias (HALES et al., 2015; TYLER, 2000), o tempo de exposição ao estresse foi muito maior, o que pode ter contribuído para a elevada taxa de transposição.

Entretanto, a fase de pupa apresentou uma taxa de transposição menor que a fase larval, mesmo tendo aproximadamente o mesmo tempo de duração, em torno de 4 dias (HALES et al., 2015; TYLER, 2000).

Esses resultados sugerem que a ativação da TS durante o desenvolvimento pode ser influenciada por outros fatores, como os processos celulares que ocorrem em cada uma dessas fases.

Nas primeiras 3 horas do desenvolvimento embrionário, ocorre uma intensa divisão celular durante as fases de clivagem, formação da blastoderme e gastrulação. Após esse período, as células começam a se diferenciar para dar origem aos diferentes tecidos e órgãos, até a eclosão do ovo em uma larva de 1° instar (HALES et al., 2015; TYLER, 2000).

Durante a fase larval quase não há diferenciação e as células passam por sucessivas mitoses, aumentando o tamanho do organismo para que ocorram as mudas. O corpo da larva possui estruturas chamadas discos imaginiais, que durante a fase pupal irão se diferenciar nos órgãos e estruturas do adulto, e células chamadas histoblastos que darão origem a epiderme abdominal e órgãos internos (TYLER, 2000).

Após a formação da pupa, os tecidos da larva se autodestroem, enquanto os discos imaginiais e os histoblastos se diferenciam para originar a forma adulta (TYLER, 2000).

A fase larval, que apresentou os maiores índices de TS, é um período de intensa divisão celular. Enquanto a fase de pupa e grande parte do desenvolvimento embrionário são marcados pela diferenciação celular para formação de tecidos.

Um estudo com a mesma linhagem utilizada nesse trabalho mostrou a ativação de *mariner* em larvas expostas a 28°C. Também foi observado que o calor acelerou o desenvolvimento dos organismos e levou a um acúmulo de células em G2, fase do ciclo celular que antecipa a mitose (JARDIM et al., 2015).

Assim como o calor atua na progressão do ciclo celular e na ativação de *mariner*, talvez a transposição seja facilitada por períodos de intensa divisão celular. No entanto, mais estudos são necessários para testar essa hipótese e compreender como os processos celulares afetam a transposição no contexto de um organismo complexo.

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a ativação da TS de *mariner* sob estresse térmico não é constante durante todo o desenvolvimento. A ativação da transposição não depende apenas do tempo de exposição ao estresse, mas pode ser influenciada por outros fatores, como a fase do desenvolvimento em que o organismo se encontra e os processos celulares envolvidos nessa fase.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

Os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa na atividade transcricional de *mariner* entre as amostras controle (que permaneceram a 20°C) e os tratamentos (que foram submetidos a 28°C durante 6 horas) para as fases de larva e pupa (Figura 6).

Também não foi detectado aumento na expressão gênica de *Hsp70* para o tratamento em que a fase larval foi exposta a 28°C por 6 horas (Figura 7).

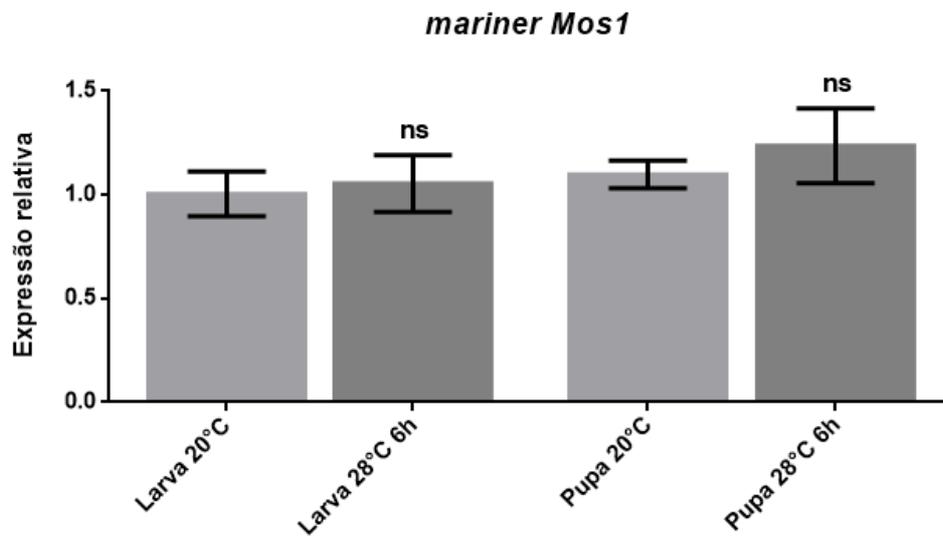


Figura 6: análise da expressão gênica relativa de *mariner Mos1* para os tratamentos de larva a 28°C por 6 horas e pupa a 28°C por 6 horas. Não houve diferença significativa na expressão de *mariner* após o estresse, tanto para a fase larval ($p=0,8286$) quanto para a fase de pupa ($p=0,3429$).

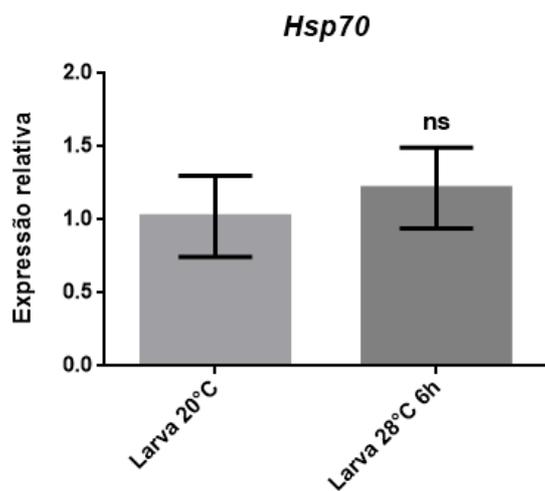


Figura 7: análise da expressão gênica relativa de *Hsp70* para larva a 28°C por 6 horas. Não houve diferença significativa na expressão de *Hsp70* após o estresse ($p=0,4762$).

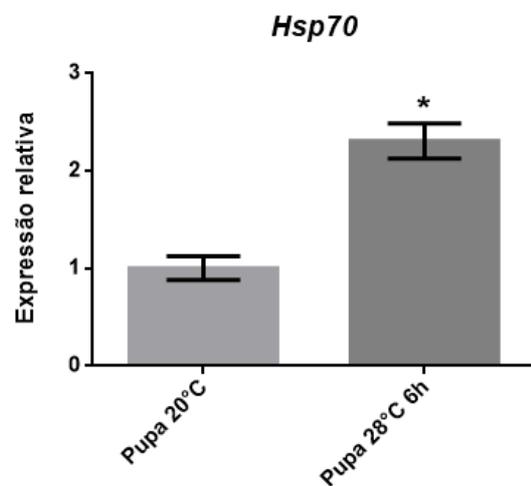


Figura 8: análise da expressão gênica relativa de *Hsp70* para pupa a 28°C por 6 horas. Houve aumento significativo na expressão de *Hsp70* após o estresse ($p<0,05$).

O tratamento de pupa a 28°C por 6 horas apresentou uma atividade transcricional de *Hsp70* aproximadamente duas vezes maior que o controle (Figura 8), embora não tenha sido detectado um aumento na expressão de *mariner*.

Novos testes foram realizados aumentando o tempo de exposição a 28°C para 24 horas em amostras de larvas e pupas. Além disso, foram feitos tratamentos utilizando uma

temperatura mais elevada (30°C) por um período de exposição menor (3 horas) que permitiu a viabilidade dos indivíduos, mas ainda assim não houve alterações na expressão de *mariner* e *Hsp70*.

As amostras em que os embriões permaneceram a 28°C por 6 horas também não apresentaram diferença na expressão gênica relativa de *Hsp70* ($p=0,2000$) e *mariner* ($p=0,2000$).

O gene *Hsp70* codifica um tipo de proteína de choque térmico (do Inglês, *Heat Shock Proteins* - HSPs), também chamadas proteínas de estresse, que são amplamente reconhecidas por responderem ao aumento de temperatura, sendo um excelente controle para ensaios de ativação de TEs sob condições de estresse como ocorre com o elemento *mariner* (JARDIM et al., 2015).

Outro estudo utilizando essa mesma metodologia realizado em nosso laboratório encontrou aumento na expressão de *Hsp70* e *mariner* em amostras de larvas a 28°C por 6 horas (JARDIM et al., 2015).

Além disso, a ausência de alterações na expressão de *mariner* e *Hsp70* contraria os resultados do experimento fenotípico, que mostram a ativação desse elemento nas fases larval e de pupa expostas ao estresse térmico. Em vista disso, esses dados podem indicar um problema metodológico nesse experimento.

4.3 ANÁLISE DA TAXA DE TS POR qPCR

A TS do elemento foi estimada pela porcentagem de mosaicismos no gene *white*, através da taxa de excisão de *mariner* e, conseqüentemente, reversão a condição selvagem do gene *white*.

As amostras da linhagem *D. simulans* possuem no seu genoma somente o gene *white* na condição selvagem (sem *mariner*) e serviram como referência na amplificação com o *primer white-sim*.

Os resultados obtidos nas reações com esse *primer* para as amostras de DNA de larvas mostraram uma taxa de excisão de cerca de 1,20% ($\pm 0,1873$) para o controle a 20°C e 2,35% ($\pm 0,1124$) para o tratamento a 28°C (Figuras 9 e 10).

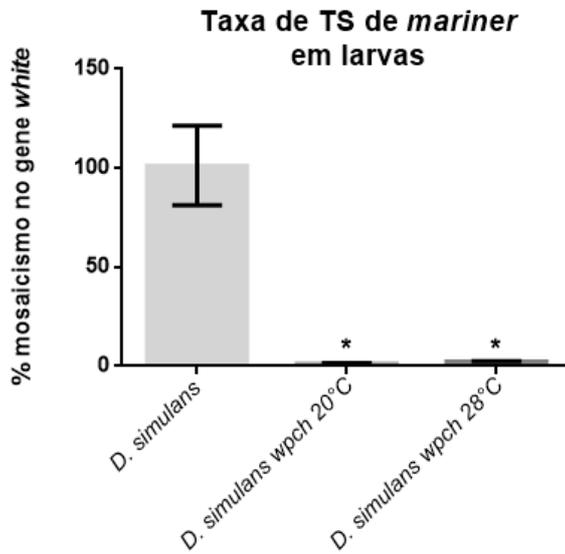


Figura 9: taxa de TS de *mariner* na fase larval, estimada pela porcentagem de mosaïcismo no gene *white*. *D. simulans* serviu como referência, com 100% do genoma com o gene *white* na condição selvagem, diferindo dos tratamentos a 20 e 28°C ($p < 0,0001$).

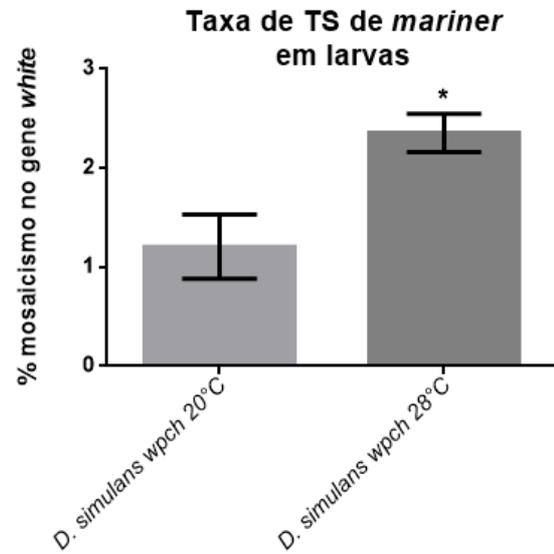


Figura 10: *D. simulans wpch* a 28°C apresentou um aumento significativo na taxa de excisão de *mariner* em relação ao controle a 20°C ($p=0,0062$) durante a fase larval.

Nas amostras de DNA de moscas, a taxa de excisão de *mariner* foi de 3,32% ($\pm 0,2010$) para o controle a 20°C e 7,03% ($\pm 0,08402$) para o tratamento a 28°C (Figuras 11 e 12).

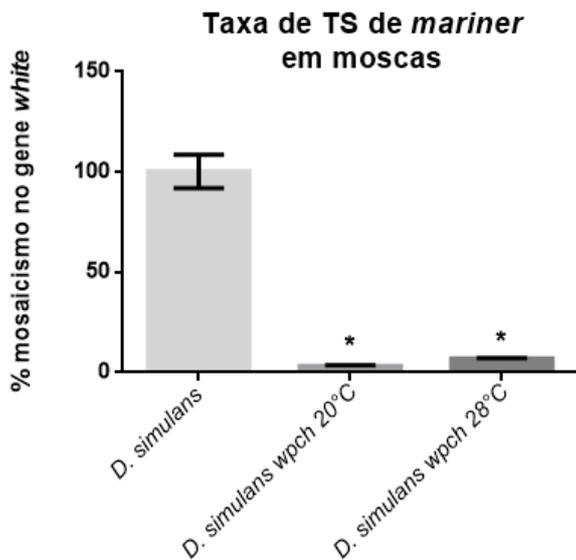


Figura 11: taxa de TS de *mariner* durante todo o desenvolvimento. *D. simulans* serviu como referência, com 100% do genoma com o gene *white* na condição selvagem, diferindo dos tratamentos a 20 e 28°C ($p < 0,0001$).

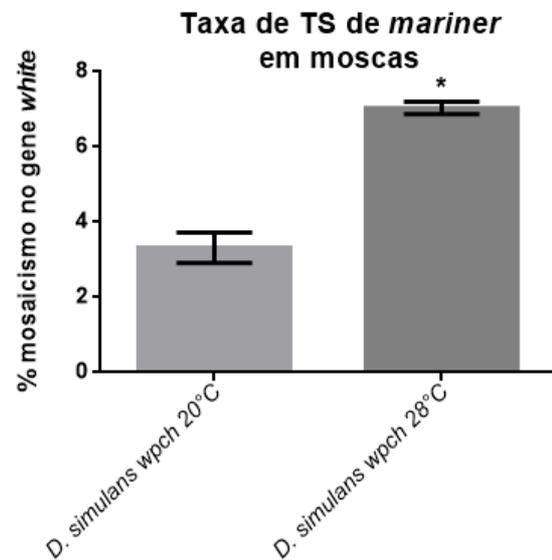


Figura 12: *D. simulans wpch* a 28°C apresentou um aumento significativo na taxa de excisão de *mariner* em relação ao controle a 20°C ($p=0,0286$) durante todo o desenvolvimento até a fase adulta.

Esses dados apontam para uma atividade de *mariner* cerca de duas vezes maior após o estresse durante a fase larval e ao longo de todo o desenvolvimento (mosca adulta).

Além disso, o aumento nos valores encontrados entre o tratamento com moscas em relação ao de larvas, sugere que a ativação de *mariner* não ocorre apenas durante o estágio larval, levando a um acúmulo de eventos de TS, tanto sob condições normais (a 20°C), quanto sob estresse.

A taxa de TS em indivíduos que permaneceram a 28°C durante a fase larval foi cerca de 2,35%, enquanto a taxa para aqueles que foram mantidos a 28°C por todo o desenvolvimento até a fase adulta (moscas) foi de 7,03%.

O mesmo foi observado nos controles em que a taxa de TS para larvas a 20°C foi cerca de 1,20%, enquanto a taxa para moscas a 20°C foi de 3,32%.

Esses dados sugerem que existe um acúmulo de transposições de *mariner* durante o desenvolvimento, que contribui para uma aumento na taxa de mosaicismos desse organismo com o decorrer do tempo, tanto em relação ao gene *white*, como em outros locais do genoma usados como sítio receptor, o que pode estar relacionado a um acúmulo de mutações causadas por esse transposon.

O par de *primers white-mos* foi desconsiderado para essa análise após apresentar variabilidade e baixa eficiência em experimentos pilotos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esse trabalho contribuiu para a compreensão da TS de *mariner* em diferentes fases do desenvolvimento de *Drosophila*.

Os resultados obtidos no experimento fenotípico mostraram que a ativação de *mariner* não ocorre a uma taxa contante durante todo o desenvolvimento, sendo variável entre os estágios. A fase de larva apresentou as maiores taxas de TS, na fase de pupa as taxas foram menores e na embriogênese a transposição não foi detectada pela análise estatística.

A análise da expressão gênica de *mariner* não mostrou diferença entre os tratamentos a 20°C e 28°C para nenhuma das fases do desenvolvimento. Esses dados contrariam os resultados da análise fenotípica, que mostraram um aumento no número de manchas nas fases larval e de pupa expostas ao estresse, e dados da literatura, o que pode indicar algum problema metodológico nesse experimento.

A estimativa da TS através do mosaicismos no gene *white* confirmou a ativação do elemento *mariner* sob estresse durante a fase larval e ao longo de todo o desenvolvimento

(mosca adulta). A excisão de *mariner* foi cerca de duas vezes maior nos tratamentos a 28°C em relação aos controles a 20°C.

A taxa de TS nos tratamentos com moscas apresentou um aumento em relação aos tratamentos com larvas, tanto em condições normais (a 20°C), quanto sob estresse (28°C). Esses dados sugerem que existe o acúmulo de TS desse elemento ao longo dos estágios do desenvolvimento.

A fase do desenvolvimento em que o organismo se encontra e os processos celulares e bioquímicos envolvidos nesse período influenciam a transposição de *mariner*, que parece ser facilitada por estágios de intensa divisão celular. No entanto, mais estudos são necessários para testar essa hipótese e compreender como os processos celulares afetam a transposição no contexto de um organismo complexo.

O elemento *mariner* e o mutante *white-peach* utilizados nesse trabalho compõe um excelente modelo para analisar a TS ao longo do desenvolvimento de *Drosophila*, assim como a metodologia desenvolvida pra estimar a taxa de TS pela excisão do elemento *mariner* do gene *white*.

Futuros estudos com esse modelo podem explicar quais as consequências do acúmulo de TS durante o desenvolvimento e como o potencial mutagênico dos TEs e sua ativação em tecidos somáticos podem influenciar aspectos básicos da biologia desses organismos, como comportamentos de corte, reprodução, memória, capacidade neurológica e expectativa de vida.

REFERÊNCIAS

ABRUSÁN, G. Somatic transposition in the brain has the potential to influence the biosynthesis of metabolites involved in Parkinson's disease and schizophrenia. *Biology Direct*. v. 7, p. 41. 2012.

ARDELJAN, D.; TAYLOR, M. S.; BURNS, K. H.; BOEKE, J. D.; ESPEY, M. G.; WOODHOUSE, E. C.; HOWCROFT, T. K. Meeting Report: The Role of the Mobilome in Cancer. *Cancer Res*. v. 76(15), p. 4316-4319. 2016.

AYARPADIKANNAN, S.; KIM, H. S. The Impact of Transposable Elements in Genome Evolution and Genetic Instability and Their Implications in Various Diseases. *Genomics Inform*. v. 12(3), p. 98-104. 2014.

BIÉMONT, C. A Brief History of the Status of Transposable Elements: From Junk DNA to Major Players in Evolution. *Genetics*. v. 186, p. 1085-1093. 2010.

BLUMENSTIEL, J. P. Evolutionary dynamics of transposable elements in a small RNA world. *Trends in Genetics*. v. 27(1), p. 23-31. 2011.

BRENNECKE, J.; MALONE, C. D.; ARAVIN, A. A.; SACHIDANANDAM, R.; STARK, A.; HANNON, G. J. An Epigenetic Role for Maternally Inherited piRNAs in Transposon Silencing. *Science*. v. 322, p. 1387-1392. 2008.

BRYAN, G. J.; JACOBSON, J. W.; HARTL, D. L. Heritable Somatic Excision of a *Drosophila* Transposon. *Science*. v. 235, p. 1636-1638. 1987.

CAPY, P.; CHAKRANI, F.; LEMEUNIER, F.; HARTL, D. L.; DAVID, J. R. Active *mariner* transposable elements are widespread in natural populations of *Drosophila simulans*. *Proc. R. Soc. Lond. B*. v. 242, p. 57-60. 1990.

CASTEL, S. E.; MARTIENSSEN, R. A. RNA interference (RNAi) in the Nucleus: roles for small RNA in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet*. v. 14(2), p. 100-112. 2013.

CHAKRANI, F.; CAPY, P.; DAVID, J. R. Developmental temperature and somatic excision rate of *mariner* transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. *Genet. Sel. Evol.* v. 25, p. 121-132. 1993.

CHEN, H.; ZHENG, X.; XIAO, D.; ZHENG, Y. Age-associated de-repression of retrotransposons in the *Drosophila* fat body, its potential cause and consequence. *Aging Cell*. v. 15, p. 542-552. 2016.

CHÉNAIS, B. Transposable elements and human cancer: A causal relationship? *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1835, p. 28-35. 2013.

CZECH, B.; HANNON, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*. v. 12(1), p. 19-31. 2011.

DAI, L.; HUANG, Q.; BOEKE, J. D. Effect of reverse transcriptase inhibitors on LINE-1 and Ty1 reverse transcriptase activities and on LINE-1 retrotransposition. *BMC Biochemistry*. v. 12, p. 18. 2011.

DeCECCO, M.; CRISCIONE, S. W.; PECKHAM, E. J.; HILLENMEYER, S.; HAMM, E. A.; MANIVANNAN, J.; PETERSON, A. L.; KREILING, J. A.; NERETTI, N.; SEDIVY, J. M. Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell*. v. 12(2), p. 247-256. 2013a.

DeCECCO, M.; CRISCIONE, S. W.; PETERSON, A. L.; NERETTI, N.; SEDIVY, J. M.; KREILING, J. A. Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues. *Aging*. v. 5(12), p. 867-883. 2013b.

DeNICOLA, G. M.; KARRETH, F. A.; ADAMS, D. J.; WONG, C. C. The utility of transposon mutagenesis for cancer studies in the era of genome editing. *Genome Biology*. v. 16, p. 229. 2015.

ENGELS, W. R.; PRESTON, C. R. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the biology of female and male sterility. *Genetics*. v. 92, p. 161-174. 1979.

- EVRONY, G. D. One brain, many genomes. *Science*. v. 354, p. 557-558. 2016.
- EWART, G. D.; HOWELLS, A. J. ABC Transporters Involved in Transport of Eye Pigment Precursors in *Drosophila melanogaster*. *Methods in Enzymology*. v. 292, p. 213-224. 1998
- FEDOROFF, N. V. Transposable Elements, Epigenetics, and Genome Evolution. *Science*. v. 338, 758-767. 2012.
- FESCHOTTE, C.; PHRITHAM, E. J. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annu Rev Genet*. v. 41, p. 331-368. 2007.
- FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet*. v. 5(4), p. 103-107. 1989.
- GARCIA, A. M.; CALDER, R. B.; DOLLE, M. E. T.; LUNDELL, M.; KAPAH, P.; VIJG, J. Age- and Temperature-Dependent Somatic Mutation Accumulation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*. v. 6(5), e1000950. 2010.
- GARZA, D.; MEDHORA, M.; KOGA, A.; HARTL, D. L. Introduction of the transposable element *mariner* into the germline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. v. 128, p. 303-310. 1991.
- GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. v. 10(2), p. 94-108. 2009.
- GIRAUD, T.; CAPY, P. Somatic Activity of the mariner Transposable Element in Natural Populations of *Drosophila simulans*. *Proc. R. Soc. Lond. B*. v. 263, p. 1481-1486. 1996.
- GUERREIRO, M. P. G. What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? *Heredity*. v. 108, p. 461-468. 2012.
- GUFFANTI, G.; GAUDI, S.; FALLON, J. H.; SOBELL, J.; POTKIN, S. G.; PATO, C.; MACCIARDI, F. Transposable Elements and Psychiatric Disorders. *Am J Med Genet. Part B*. v. 9999, p. 1-16. 2014.
- HAIG, D. Transposable elements: Self-seekers of the germline, team-players of the soma. *Bioessays*. v. 38, p. 1-9. 2016.
- HALES, K. G.; KOREY, C. A.; LARRACUENTE, A. M.; ROBERTS, D. M. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics*. v. 201, p. 815-842. 2015.
- HANCKS, D. C.; KAZAZIAN, H. H. Active Human Retrotransposons: Variation and Disease. *Curr Opin Genet Dev*. v. 22(3), p. 191-203. 2012.
- HARTL, D. L. Discovery of the Transposable Element *mariner*. *Genetics*. v. 157, p. 471-476. 2001.

- HAYMER, D. S. and MARSH, J. L. Germ line and somatic instability of a *white* mutation in *Drosophila mauritiana* due to a transposable genetic element. *Developmental Genetics*. v. 6, p. 281-191. 1986.
- HELMAN, E.; LAWRENCE, M. L.; STEWART, C.; SOUGNEZ, C.; GETZ, G.; MEYERSON, M. Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing. *Genome Res*. v. 24(7), p. 1053-1063. 2014.
- HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. *N Engl J Med*. v. 361, p. 1475-1485. 2009.
- HUA-VAN, A.; LE ROUZIC, A; BOUTIN, T. S.; FILÉE, J.; CAPY, P. The struggle for life of the genome's selfish architects. *Biology Direct*. v.6, p. 19. 2011.
- JACOBSON, J. W.; HARTL, D. L. Coupled instability of two linked genes in *Drosophila mauritiana*: germinal e somatic mutability. *Genetics*. v. 111, p 57-65. 1985.
- JACOBSON, J. W.; MEDHORA, M. M.; HARTL, D. L. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. v. 83, p. 8684-8688. 1986.
- JARDIM, S. S.; LORETO, E. L. S. Comparative methodologies for estimating *mariner* activity using *white-peach* assay in *Drosophila simulans*. *Drosoph Inf Serv*. v. 94, p. 129-132. 2011.
- JARDIM, S. S.; SCHUCH, A. P.; PEREIRA, C. M.; LORETO, E. L. S. Effects of heat and UV radiation on the mobilization of transposon *mariner-Mos1*. *Cell Stress and Chaperones*. v. 20, p. 843-851. 2015.
- JINTARIDTH, P.; MUTIRANGURA, A. Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. *Physiol Genomics*. v. 41, p. 194-200. 2010.
- KAER, K.; SPEEK, M. Retroelements in human disease. *Gene*. v. 518, p. 231-241. 2013.
- KIDWELL, M. G. Evolution of hybrid dysgenesis determinants in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. v. 80, p. 1655-1659. 1983.
- KIDWELL, M. G.; KIDWELL, J. F. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics*. v. 86(4), p. 813-33. 1977.
- KONKEL, M. K.; BATZER, M. A. A mobile threat to genome stability: The impact of non-LTR retrotransposons upon the human genome. *Semin Cancer Biol*. v. 20(4), p. 211-221. 2010.
- KULIS, M.; ESTELLER, M. DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics*, v. 70, p. 27-56. 2010.

LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* v. 11(3), p. 204-220. 2010.

LEE, E.; ISKOW, R.; YANG, L.; GOKCUMEN, O.; HASELEY, P.; LUQUETTE III, L. J.; LOHR, J. G.; HARRIS, C. C.; DING, L.; WILSON, R. K.; WHEELER, D. A.; GIBBS, R. A.; KUCHERLAPATI, R.; LEE, C.; KHARCHENKO, P. V.; PARK, P. J. Landscape of Somatic Retrotransposition in Human Cancers. *Science.* v. 337, p. 967-971. 2012.

LEVIN, H. L.; MORAN, J. V. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat Rev Genet.* v. 12, p. 615-627. 2011.

LI, W.; PRAZAK, L.; CHATTERJEE, N.; GRÜNINGER, S.; KRUG, L.; THEODOROU, D.; DUBNAU, J. Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila*. *Nature Neuroscience.* v. 16, p. 529-531. 2013.

LIN, H.; SPRADLING, A. C. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development.* v. 124, p. 2463-2476. 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods.* v. 25, p. 402-408. 2001.

McCLINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Genetics.* v. 36, p. 344-355. 1950.

MEDHORA, M. M.; MACPEEK, A. H.; HARTL, D. L. Excision of the drosophila transposable element *mariner*: identification and characterization of the Mos factor. *The EMBO Journal.* v. 7(7), p. 2185-2189. 1988.

MEDHORA, M. M.; MARUYAMA, K.; HARTL, D. L. Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element Mos 1 in *Drosophila*. *Genetics.* v. 128, p. 311-318. 1991.

MORIARITY, B. S.; LARGAESPADA, D. A. *Sleeping Beauty* transposon insertional mutagenesis based mouse models for cancer gene discovery. *Curr Opin Genet Dev.* v. 30, p. 66-72. 2015.

MUÑOZ-LÓPEZ, M.; GARCÍA-PÉREZ, J. L. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics.* v. 11, p. 115-128. 2010.

O'HARE, K.; MURPHY, C.; LEVIS, R.; RUBIN, G. M. DNA sequence of the *white* locus of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* v. 180, p. 437-455. 1984.

PERRAT, P. N.; DASGUPTA, S.; WANG, J.; THEURKAUF, W.; WENG, Z.; ROSBASH, M.; WADDELL, S. Transposition-Driven Genomic Heterogeneity in the *Drosophila* Brain. *Science.* v. 340, p. 91-95. 2013.

PICOT, S.; WALLAU, G. L.; LORETO, E. L. S.; HEREDIA, F. O.; HUA-VAN, A.; CAPY, P. The *mariner* transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. *Heredity.* v. 101, p. 53-59. 2008.

- RODIER, F.; CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* v. 192(4), p. 547-556. 2011.
- RICHARDSON, S. R.; MORELL, S.; FAULKNER, G. J. L1 Retrotransposons and Somatic Mosaicism in the Brain. *Annu. Rev. Genet.* v. 48, p. 1-27. 2014.
- ROSS, J. P.; RAND, K. N.; MOLLOY, P. L. Hypomethylation of repeated DNA sequences in cancer. *Epigenomics.* v. 2(2), p. 245-269. 2010.
- RUSSELL, A. L.; WOODRUFF, R. C. The genetics and evolution of the *mariner* transposable element in *Drosophila simulans*: worldwide distribution and experimental population dynamics. *Genetica.* v. 105, p. 149-164. 1999.
- SANTORO, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol.* v. 59(1), p. 55-63. 2000.
- SASSI, A.K.; HERÉDIA, F.; LORETO, E.L.S.; VALENTE, V.L.S. Transposable element P and gypsy in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics and Molecular Biology.* v. 28, p. 734-739. 2005.
- SEDIVY, J. M.; KREILING, J. A.; NERETTI, N.; DE CECCO, M.; CRISCIONE, S. W.; HOFMANN, J. W.; ZHAO, X.; ITO, T.; PETERSON, A. L. Death by transposition - the enemy within? *Bioessays.* v. 35(12), p. 1035-1043. 2013.
- SHUKLA, R.; UPTON, K. R.; MUNÓZ-LÓPEZ, M.; GERHARDT, D. J.; FISHER, M. E.; NGUYEN, T.; BRENNAN, P. M.; BAILLIE, J. K.; COLLINO, A.; GHISLETTI, S.; SINHA, S.; IANNELLI, F.; RADAELLI, E.; SANTOS, A.; RAPOUD, D.; GUETTIER, C.; SAMUEL, D.; NATOLI, G.; CARNINCI, P.; CICCARELLI, F. D.; GARCIA-PÉREZ, J. L.; FAIVRE, J.; FAULKNER, G. J. Endogenous Retrotransposition Activates Oncogenic Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Cell.* v. 153, p. 101-111. 2013.
- SINGER, T.; MCCONNELL, M. J.; MARCHETTO, M. C. N.; COUFAL, N. G.; GAGE, F. H. LINE-1 Retrotransposons: Mediators of Somatic Variation in Neuronal Genomes? *Trends Neurosci.* v. 33(8), p. 345-354. 2010.
- SOLYOM, S.; EWING, A. D.; RAHRMANN, E. P.; DOUCET, T.; NELSON, H. H.; BURNS, M. B.; HARRIS, R. S.; SIGMON, D. F.; CASELLA, A.; ERLANGER, B.; WHEELAN, S.; UPTON, K. R.; SHUKLA, R.; FAULKNER, G. J.; LARGAESPADA, D. A.; KAZAZIAN, H. H. Extensive somatic L1 retrotransposition in colorectal tumors. *Genome Research.* v. 22, p. 2328-2338. 2012.
- STURM, A.; IVICS, Z.; VELLAI, T. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration. *Cell Mol Life Sci.* v. 72(10), p. 1839-1847. 2015.
- SULLIVAN, D. T.; SULLIVAN, M. C. Transport Defects as the Physiological Basis for Eye Color Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Genetics.* v. 13, p. 603-613. 1975.
- SULLIVAN, D. T.; BELL, L. A.; PATON, D. R.; SULLIVAN, M. C. Purine Transport by Malpighian Tubules of Pteridine-Deficient Eye Color Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* v. 17, p. 565-573. 1979.

THOMAS, C. A.; PAQUOLA, A. C. M.; MUOTRI, A. R. LINE-1 Retrotransposition in the Nervous System. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 28, p. 555-573. 2012.

TYLER, M. S. *Developmental Biology, A Guide for Experimental Study*. Second Edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA. ISBN 0-87893-843-5. Cap. 8 Development of the Fruit Fly, p. 85-106. 2000.

UPTON, K. R.; GERHARDT, D. J.; JESUADIAN, J. S.; RICHARDSON, S. R.; SÁNCHEZ-LUQUE, F. J.; BODEA, G. O.; EWING, A. D.; SALVADOR-PALOMEQUE, C.; VAN DER KNAAP, M. S.; BRENNAN, P. M.; VANDERVER, A.; FAULKNER, G. J. Ubiquitous L1 Mosaicism in Hippocampal Neurons. *Cell.* v. 161, p. 228-239. 2015.

VARANI, A. M.; CARVALHO, L. C. B.; ZERILLO, M. M.; VITORELLO, C. B. M. Elementos de transposição: classificação e mecanismos de mobilização. In: CARARETO, C. M. A.; VITORELLO, C. B. M.; SLUYS, M-A V. Elementos de transposição: diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos. 22 ed. Rio de Janeiro. Fiocruz. cap. 1, p. 11-42. 2015.

VIJG, J. Somatic mutations, genome mosaicism, cancer and aging. *Curr Opin Genet Dev.* v. 26, p. 141-149. 2014.

VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V. E.; ZHOU, S.; DIAZ JR., L. A.; KINZLER, K. W. Cancer Genome Landscapes. *Science.* v. 339, p. 1546-1558. 2013.

VOLPE, T.; MARTIENSSEN, R. A. RNA Interference and Heterochromatin Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* v. 3, p. 1-11. 2011.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A. H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet.* v. 8, p. 973-982. 2007.

WOOD, J. G.; HELFAND, S. L. Chromatin structure and transposable elements in organismal aging. *Front Genet.* v. 4, p. 274. 2013.

ZAMORE, P. D. Somatic piRNA biogenesis. *The EMBO Journal.* v. 29, p. 3219-3221. 2010.

ANEXOS

Quadro 2: Número de manchas apresentado por cada um dos 100 indivíduos analisados em cada categoria dos tratamentos de variação de temperatura.

(continua)

Quadro 2 - N° de manchas /ind - Total de 100 indivíduos analisados							
todo a 20°C	ovo a 28°C	ovo e larva a 28°C	Larva (1 a 2) a 28°C	Larva (1 a 3) a 28°C	Pupa a 28°C	Larva e pupa a 28°C	todo a 28°C
1	1	2	5	7	15	19	35
3	2	5	7	13	3	13	13
1	2	6	4	11	3	8	16
1	3	16	9	26	3	10	9
1	1	8	9	10	3	9	16
2	1	17	4	11	3	17	14
2	3	16	2	2	2	12	23
3	2	20	3	5	1	17	27
1	1	8	16	11	4	16	13
2	22	9	4	7	1	11	11
2	15	1	7	4	7	17	21
1	1	9	6	33	1	14	13
1	6	8	8	2	5	7	12
5	1	9	3	14	3	16	13
1	1	5	2	26	3	3	37
1	3	10	1	26	2	10	7
3	8	2	9	9	1	9	22
1	27	6	6	4	3	6	18
1	3	8	13	4	1	11	7
2	2	5	7	27	2	11	11
4	44	7	6	8	2	11	9
3	4	1	4	3	2	14	14
1	11	11	5	20	3	12	15
6	1	4	4	14	4	10	17
1	1	22	12	11	7	10	10
2	8	3	9	12	8	15	45
3	1	9	2	2	6	9	15
1	1	13	1	3	9	17	7
2	11	18	2	17	9	13	11
9	1	4	1	14	2	17	17
2	3	8	1	4	5	10	9
1	2	2	4	23	4	11	12
1	2	2	1	2	5	12	10
2	1	14	1	35	9	16	24
1	1	1	2	14	6	19	11
4	1	4	2	10	10	1	7
1	1	1	10	3	3	12	15
1	1	4	2	9	4	9	55
1	1	23	11	21	5	8	13
2	2	15	20	20	7	6	14
2	1	3	4	12	12	9	18
1	2	13	11	21	6	23	15
1	1	7	2	4	6	15	25
4	2	3	2	5	1	15	19
1	1	3	8	5	6	15	4
1	4	12	2	7	2	21	6
1	1	16	5	17	1	9	2
1	31	5	3	3	1	21	29
1	1	24	3	23	4	14	22
0	1	3	2	8	2	15	10

Quadro 3: informações retiradas do software *GraphPad Prism 6*, referentes à análise estatística dos dados apresentados no quadro 2 – N° de manchas/indivíduo. Para essa análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's para múltiplas comparações (comparando cada tratamento contra os demais).

Table Analyzed	N° de manchas nos 100 indivíduos analisados
Kruskal-Wallis test	
P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	8
Kruskal-Wallis statistic	305,3
Data summary	
Number of treatments (columns)	8
Number of values (total)	800

Quadro 4: informações retiradas do software GraphPad Prism 6, referentes à análise estatística dos dados apresentados no quadro 2 – N° de manchas/indivíduo. Para essa análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's para múltiplas comparações (comparando cada tratamento contra os demais). As duas últimas colunas mostram se existe (Yes) ou não (No - ns) diferença significativa entre os tratamentos comparados e o qual o grau de significância (*).

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary
todo a 20°C vs. ovo a 28°C	-74,67	No	ns
todo a 20°C vs. ovo e larva a 28°C	-234,3	Yes	****
todo a 20°C vs. Larva (1 a 2) a 28°C	-153,9	Yes	****
todo a 20°C vs. Larva (1 a 3) a 28°C	-326,7	Yes	****
todo a 20°C vs. Pupa a 28°C	-127,5	Yes	**
todo a 20°C vs. Larva e pupa a 28°C	-405,3	Yes	****
todo a 20°C vs. todo a 28°C	-400,6	Yes	****
ovo a 28°C vs. ovo e larva a 28°C	-159,6	Yes	****
ovo a 28°C vs. Larva (1 a 2) a 28°C	-79,18	No	ns
ovo a 28°C vs. Larva (1 a 3) a 28°C	-252	Yes	****
ovo a 28°C vs. Pupa a 28°C	-52,84	No	ns
ovo a 28°C vs. Larva e pupa a 28°C	-330,6	Yes	****
ovo a 28°C vs. todo a 28°C	-325,9	Yes	****
ovo e larva a 28°C vs. Larva (1 a 2) a 28°C	80,45	No	ns
ovo e larva a 28°C vs. Larva (1 a 3) a 28°C	-92,4	No	ns
ovo e larva a 28°C vs. Pupa a 28°C	106,8	Yes	*
ovo e larva a 28°C vs. Larva e pupa a 28°C	-171	Yes	****
ovo e larva a 28°C vs. todo a 28°C	-166,3	Yes	****
Larva (1 a 2) a 28°C vs. Larva (1 a 3) a 28°C	-172,8	Yes	****
Larva (1 a 2) a 28°C vs. Pupa a 28°C	26,34	No	ns
Larva (1 a 2) a 28°C vs. Larva e pupa a 28°C	-251,5	Yes	****
Larva (1 a 2) a 28°C vs. todo a 28°C	-246,7	Yes	****
Larva (1 a 3) a 28°C vs. Pupa a 28°C	199,2	Yes	****
Larva (1 a 3) a 28°C vs. Larva e pupa a 28°C	-78,62	No	ns
Larva (1 a 3) a 28°C vs. todo a 28°C	-73,87	No	ns
Pupa a 28°C vs. Larva e pupa a 28°C	-277,8	Yes	****
Pupa a 28°C vs. todo a 28°C	-273,1	Yes	****
Larva e pupa a 28°C vs. todo a 28°C	4,745	No	ns