

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS INTEGRADAS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIASBIOLÓGICAS

Análise da modulação de gene relacionado à morfogênese e diferenciação da asa de
Drosophila melanogaster em resposta ao fármaco doxorubicina.

Rafaela Feliciano Bueno

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Ituiutaba-MG

Dezembro - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS INTEGRADAS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise da modulação de gene relacionado à morfogênese e diferenciação da asa de
Drosophila melanogaster em resposta ao fármaco doxorubicina.

Rafaela Feliciano Bueno

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Coorientadora: Dra Máira Pompeu Martins

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

Ituiutaba - MG

Dezembro - 2017

DEDICATÓRIA

À minha família, por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me dar discernimento e sabedoria.

Agradeço a minha família, meus avós e em especial minha mãe Francine, meu pai Eduardo e minhas três irmãs, Mariana, Maria Laura e Eduarda, pelo amor, pelo apoio incondicional nas minhas decisões e por estarem ao meu lado me motivando a ser um ser humano cada vez melhor.

Agradeço aos meus amigos, que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza, agradeço a Lara, a Tays e a Flávia, que moraram comigo e estiveram presentes quase todos os dias, que me deram incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, à minha amiga Vitória, que divide todos os momentos comigo e está sempre ao meu lado.

Agradeço à Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Bonetti e ao Prof. Dr. Bruno Lassmar Bueno Valadares, membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para fazerem parte da avaliação deste trabalho, pelas sugestões e opiniões dadas ao trabalho apresentado.

Agradeço ao meu orientador Alexandre, uma das pessoas mais inteligentes que conheço, que admiro muito e que é uma referência para mim, e também com um carinho mais do que especial, à minha coorientadora Maíra, que acreditou em mim, me apoiou e ajudou, independente da hora ou circunstância, isso não seria possível se não fosse por vocês.

Agradeço a todos os meus professores por me proporcionarem o conhecimento, não somente por terem me ensinado, mas também por terem me feito aprender.

A Universidade Federal de Uberlândia, *campus* Pontal, pela oportunidade de fazer o curso.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

O cloridrato de doxorubicina (DXR) é um antibiótico antineoplásico da classe das antraciclinas, isolado de culturas de *Streptomyces peucetius*, variedade *caesius*. Embora a principal fonte de DXR seja por meio da biossíntese microbiana, a sua obtenção é possível por meios sintéticos. DXR é utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos, tais como os de mama, ovário, pulmão, leucemia aguda e em menor proporção, em tumores ginecológicos. Devido à sua estrutura singular, a DXR é altamente lipofílica e sua meia-vida é relativamente longa no organismo. *Drosophila melanogaster* é um modelo biológico eucarioto amplamente utilizado em avaliações toxico-genéticas. No presente trabalho, foi avaliada, por RT-PCR, a possibilidade de ocorrência de processamento alternativo no gene Buffy de *D. melanogaster*, após exposição a diferentes concentrações de DXR (1,0; 0,75; 0,5; 0,25 ou 0,125mM). De acordo com as condições experimentais utilizadas, as amostras não apresentaram resultados de amplificação e, portanto, nada se pode afirmar até o momento a respeito da ocorrência de *splicing* alternativo nas condições testadas.

Palavras-chave: *splicing* alternativo, doxorubicina, *D. melanogaster*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Parâmetros de temperatura e tempo da reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos verificação da ocorrência de processamento alternativo do gene Buffy de *D. melanogaster*. 15
- Figura 2. Sequência referente ao gene Buffy de *D. melanogaster*. Fonte: Flybase (<http://flybase.org/>)..... 16
- Figura 3. Representação esquemática dos éxons e íntrons do gene Buffy. As caixas correspondem às regiões de éxons, enquanto os traços correspondem às porções intrônicas. Os tamanhos de cada região estão indicados em número de pares de base..... 17
- Figura 4. M: Marcador de Peso Molecular (Ladder 100 PB, Ludwig Biotecnologia LTDA, RS, Brasil); 1: HB DXR 1mM; 2: HB DXR 0.75mM; 3: HB DXR 0.5mM; 4: HB DXR 0.25mM; 5: HB DXR 0.125mM; 6: HB controle negativo (água); 7: HB uretano 10mM; 8: HB DXR 1mM (réplica); 9: HB DXR 0.75mM (réplica); 10: HB DXR 0.5mM (réplica); 11: HB DXR 0.25mM (réplica); 12: HB DXR 0.125mM (réplica); 13: HB controle negativo (água - réplica); 14: HB uretano 10mM (réplica); 15: ST DXR 1mM; 16: ST DXR 0.75mM; 17: ST DXR 0.5mM; 18: ST DXR 0.25mM; 19: ST DXR 0.125mM; 20: ST controle negativo (água); 21: ST uretano 10Mm; 22: ST DXR 1Mm (réplica); 23: ST DXR 0.75Mm (réplica); 24: ST DXR 0.5mM (réplica); 25: ST DXR 0.25mM (réplica). . 18
- Figura 5. M: Marcador de Peso Molecular (Ladder 100 PB, Ludwig Biotecnologia LTDA, RS, Brasil); 1: ST DXR 0.125mM (réplica); 2: ST controle negativo (água - réplica); 3: ST uretano 10Mm (réplica). 18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. <i>O gene Buffy</i>	9
1.1. <i>Cloridrato de Doxorubicina</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
1.2. <i>Splicing alternativo</i>	11
2. OBJETIVO	13
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	13
2.2. <i>Estratégias</i>	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. <i>Linhagens</i>	14
3.2. <i>Teste SMART e tratamento</i>	14
3.3. <i>Obtenção de RNA e cDNA</i>	14
3.4. <i>RT-PCR e oligonucleotídeos utilizados nas reações</i>	15
4. RESULTADOS	16
4.1. <i>Análise da sequência do gene Buffy</i>	16
4.2. <i>Desenho dos oligonucleotídeos</i>	17
4.3. <i>Análise da ocorrência de processamento alternativo por RT-PCR</i>	18
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

Mutação e recombinação são processos que acontecem, continuamente, a todo instante durante o desenvolvimento celular. A mutação, em especial, é fonte da mudança evolutiva, produzindo novos alelos espontaneamente ou por exposição a agentes físicos, químicos ou biológicos. Já a recombinação, promove o rearranjo de alelos, agrupando-os em novas combinações. Esses processos garantem a variação genética mas, por outro lado, também são responsáveis pelo envelhecimento e por patologias relacionadas, tais como câncer e doenças neurodegenerativas (KENNEDY et al., 2012).

Para manter os processos evolutivos, os organismos biológicos dispõem de uma grande variedade de mecanismos de reparo do DNA, que promovem a replicação exata do DNA durante a divisão celular e a remoção de possíveis danos (FRIEDBERG, 2006), entretanto, falhas nos mecanismos de reparo possibilitam a fixação da mutação.

Nos últimos anos, é possível evidenciar um esforço mundial para reduzir a utilização de animais superiores nas pesquisas toxicológico/genéticas, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de modelos alternativos *in vivo* (SIDDIQUE et al., 2005). A *Drosophila melanogaster* é um inseto modelo muito bem estabelecido, que tem sido utilizado extensivamente em estudos genéticos e de biologia do desenvolvimento. Existem inúmeras vantagens em se trabalhar com modelos experimentais envolvendo organismos como *Drosophila*, ao invés de vertebrados (JENNINGS, 2011). *D. melanogaster* é um organismo eucarioto com tempo de geração curto, prole numerosa, de fácil manutenção e baixo custo em laboratório. Além disso, suas características morfológicas e genéticas são amplamente conhecidas (GRAF et al., 1996).

Após o sequenciamento do genoma de *D. melanogaster*, foi verificada homologia com cerca de 77% dos genes relacionados a doenças em humanos (REITER et al., 2001). Além

disso, é possível constatar alta conservação evolutiva, que pode ser corroborada por dados obtidos a partir de análises genômicas e proteômicas (TICKOO & RUSSELL, 2002).

Tais descobertas, somadas aos mais de 100 anos de contribuição deste organismo à pesquisa genética, colocam *Drosophila* como um modelo promissor não apenas para o estudo de doenças humanas, mas também para a obtenção de produtos que possam ser efetivamente utilizados no tratamento de diversas doenças (JENNINGS, 2011).

O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test*) em células de asa de *D. melanogaster* foi desenvolvido por Graf *et al.* (1984) e aprimorado por Graf e Van Schaik (1992) e, desde então, empregado na avaliação mutagênica de centenas de substâncias químicas (DE REZENDE *et al.*, 2013; DEMIR *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013; SPANO *et al.*, 2001; FROLICH & WURGLER, 1990; GRAF *et al.*, 1989). Na análise da superfície dorsal e ventral das asas, são considerados o número e o tipo de manchas encontradas, fornecendo dados quantitativos e qualitativos, permitindo a elucidação do evento mutagênico induzido (SPANÓ & GRAF, 1998).

Alguns dos genes de *D. melanogaster* já estão identificados como diretamente relacionados a mutações e desenvolvimento anormal de disco da asa, podendo ser os responsáveis pelas mutações observadas pelo SMART. Estes incluem os genes Broule, Karst, Rala, Wingless, Dichaete, Domina, Moesin, HR46, APC2, Dopadecarboxylase, Buffy, entre outros (REN *et al.*, 2005).

1.1. O gene Buffy

O gene Buffy codifica para uma proteína do tipo Bcl-2 (reguladoras chave da apoptose) em *D. melanogaster*, sendo o único homólogo pró-sobrevivência observado neste organismo (M'ANGALE & STAVELEY, 2016). Buffy é necessário para a sobrevivência da célula e pode prevenir a morte celular induzida pelo desenvolvimento ou por radiação. A superexpressão de Buffy evita a progressão do ciclo celular e resulta no acúmulo de células

em G1, tal como seu homólogo em mamíferos Bcl-2 (O'REILLY et al., 1996; QUINN et al., 2003). Sendo pró-sobrevivência, se ela não está expressa, a célula direciona para apoptose e se Buffy está expressando, o ciclo celular prossegue e não ocorre a apoptose.

A apoptose é um programa de morte celular finamente regulado e de grande eficiência, e requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas são decorrentes de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente orquestrados. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (BORGES et al., 2008).

A apoptose ocorre graças às caspases, enzimas responsáveis pela ativação desse processo. As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das cisteíno proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo), que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (GRIVICICH et al., 2007; ANITA et al., 2014; M'ANGALE & STAVELEY, 2016).

Após a ativação das caspases, os corpos apoptóticos surgem rapidamente e são reconhecidos e fagocitados por macrófagos. O reconhecimento acontece devido à translocação causada pela apresentação da fosfatidilserina (um fosfolipídeo) do folheto interno para o folheto externo da membrana celular (GRIVICICH et al., 2007; ANITA et al., 2014).

1.2. Cloridrato de Doxorrubicina

A adriamicina (CAS 23214-92-8), também conhecida como cloridrato de doxorrubicina (DXR) é um antibiótico antineoplásico da classe das antraciclina, isolado de

culturas de *Streptomyces peucetius*, variedade *caesius*, comumente usados para tratar uma ampla gama de patologias (ASHIKAWA et al., 2004).

Essa droga é indicada para diversos tratamentos oncológicos, como câncer de mama, câncer de cabeça, ovário, bexiga, estômago, linfoma, neuroblastoma, sarcoma, tumor de Wilms, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, entre outros. Atua alterando o funcionamento celular, evitando a multiplicação de células malignas e cancerígenas. O mecanismo de ação da doxorubicina inclui interação com a enzima Topoisomerase II, além de geração de radicais livres dentro da célula (THORN et al., 2011; YANG et al., 2014).

É capaz de induzir apoptose através da ativação de caspases e ruptura do potencial de membrana mitocondrial por cascatas de sinalização anti-proliferativas e indutoras de morte (ainda não totalmente compreendidas), o que não restringe seu uso clínico generalizado (GAMEN et al., 2000; EOM et al., 2005).

A ocorrência de resistência à utilização desta droga é comum, representando um obstáculo ao tratamento bem-sucedido. A identificação de mecanismos moleculares que direcionam a célula à resistência frente ao uso deste fármaco pode auxiliar no entendimento da seletividade de sua eficácia em diferentes tumores (NOBILI et al., 2006; HOUSMAN et al., 2014; DATTA et al., 2015).

Em *D. melanogaster*, os danos induzidos por DXR são reparados, preferencialmente, por recombinação homóloga (LEHMAN et al., 2003; VALADARES et al., 2008; DE REZENDE et al., 2009; DE REZENDE et al., 2013).

1.3. Splicing constitutivo e splicing alternativo

O *splicing* constitutivo é um processo regular da célula que consiste na retirada de íntrons de um RNA precursor (pré-mRNA), originando um mRNA maduro e funcional. Para o *splicing* acontecer, é necessária a presença de um complexo proteico denominado spliceossomo, composto por um conjunto de proteínas em interações moleculares complexas

com pequenos RNAs, sendo os mais importantes U1, U2, U4, U5 e U6. O spliceossomo é responsável por retirar os íntrons do mRNA e ligar os éxons e, para que isso aconteça, são necessários sinalizadores (os sítios de clivagem e de ramificação), que são sequências dentro dos íntrons que indicam onde o spliceossomo deve cortar e onde deve ligar-se (STALEY & WOOLFORD, 2009; WILL & LÜHRMANN, 2011).

O *splicing* alternativo do pré-mRNA é um processo altamente regulado, crítico na modulação das vias de expressão gênica em eucariotos. Afeta a forma como os éxons de um gene podem ser combinados durante o processamento do pré-mRNA, fazendo com que um único gene possa originar diferentes proteínas e, com isso, aumentando a complexidade do genoma, que será composto por diferentes seleções de éxons e/ou retenção de íntrons. Quanto mais íntrons interrompem o genoma, mais complexo ele é (HUANG et al., 2005; LEE & RIO, 2015; REHMAN et al., 2015).

Os eventos moleculares de *splicing* constitutivo e alternativo são o objeto de estudo do presente trabalho, tendo sido proposta a avaliação do processamento de pré-mRNA em *D. melanogaster* após tratamento com a droga DXR.

2. OBJETIVO

2.1. *Objetivo Geral*

Verificar a ocorrência de eventos de processamento alternativo no gene Buffy, associado à morfogênese e diferenciação da asa de *Drosophila melanogaster* por RT-PCR após exposição a diferentes concentrações da droga doxorubicina (DXR).

2.2. *Estratégias*

- Desenho de oligonucleotídeos específicos para o gene Buffy de *D. melanogaster*, flanqueando regiões de íntrons, para verificar a ocorrência de retenções após exposição a diferentes concentrações da droga DXR.
- Análise por RT-PCR de processamento alternativo do gene Buffy, verificando a ocorrência por eletroforese em gel de agarose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

Três linhagens de *D. melanogaster* foram utilizadas: (i) machos “multiple wing hairs” (mwh); (ii) fêmeas “flare-3 (flr^3), com constituição genética $flr^3/In(3LR)TM3, ri pp sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S$; e (iii) fêmeas ORR; flare-3”, com constituição genética $ORR;flr^3/In(3LR)TM3, ri pp sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S$. As linhagens foram cedidas pelo Prof. Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxicologia, ETH, Universidade de Zürich (Schwerzenbach, Suíça).

3.2. SMART e tratamento

Foram empregados dois tipos de cruzamentos: padrão (standard - ST), entre machos mwh e fêmeas flr^3 (GRAF et al., 1989), caracterizado por nível basal de metabolização de enzimas citocromo P-450, e o cruzamento aprimorado (Hight Bioactivation - HB), que utiliza machos mwh e fêmeas ORR; flr^3 (GRAF & VAN SCHAIK, 1992), caracterizado por alto nível de metabolização de enzimas citocromo P-450. Tanto o cruzamento ST quanto o HB produzem dois tipos de descendentes: moscas trans-heterozigotas marcadas (MH – $mwh+/+flr^3$) e moscas heterozigotas balanceadas (BH – $mwh+/+TM3, Bd^S$). Larvas de terceiro estágio (72h + 4h) provenientes de ambos os cruzamentos foram submetidas a tratamento crônico (aproximadamente 48h) com diferentes concentrações de DXR: 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 ou 0,125mM, além de um controle positivo, resultado do tratamento das larvas com Etilcarbamato (Uretano) a 10mM e um controle negativo (não tratado).

3.3. Obtenção de RNA e cDNA

O RNA total obtido nos cultivos foi extraído utilizando TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), a qualidade das amostras de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) sob condições desnaturantes, e o cDNA sintetizado utilizando

iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) de acordo com os protocolos dos fabricantes.

3.4. RT-PCR e oligonucleotídeos utilizados nas reações

A verificação dos eventos de *splicing* alternativo foi realizada empregando-se a técnica de RT-PCR, tendo sido selecionado o gene Buffy, que codifica para uma proteína do tipo Bcl-2. Cada reação foi feita utilizando 1,0µL de oligonucleotídeos R e F (10pmol/µL), 5µL de cDNA (concentração de 800ng), 12,5µL de GoTaq® DNA Polymerase (Promega Corporation, WI, USA, #M3005), com volume final de 25µL, completado com água ultra pura. Utilizamos o ciclo mostrado na Figura 1 para a amplificação dos fragmentos.

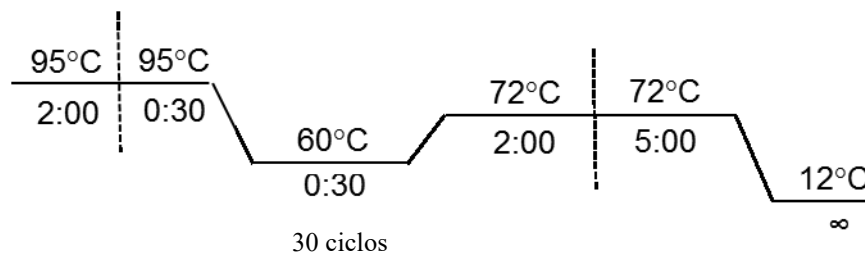


Figura 1. Parâmetros de temperatura e tempo da reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para verificação da ocorrência de processamento alternativo do gene Buffy de *D. melanogaster*.

Os oligonucleotídeos utilizados nas análises por PCR foram desenhados partindo do genoma de *D. melanogaster* disponível em <http://flybase.org>, utilizando o software Primer 3 disponível online (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), sendo as sequências F: CCTCGTATCCCACGAATAACTC e R: GGCCAAAACTACGCCTATAAC.

Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo em tampão TAE (40mM de Tris base; 40mM de ácido acético e 1mM de EDTA - solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C durante 20min, e pH ajustado em 8,0). Os experimentos foram feitos ao menos em triplicata.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da sequência do gene *Buffy*

A região referente ao gene *Buffy* foi selecionada no genoma de *D. melanogaster* utilizando o site flybase (<http://flybase.org/>). A sequência foi copiada e colada em um arquivo texto para o desenho dos oligonucleotídeos.

Esta sequência, correspondente ao gene completo, contém tanto os éxons quanto os íntrons. As regiões referentes aos íntrons foram identificadas, utilizando ferramentas disponíveis no site flybase. A posição de cada íntron foi identificada em verde (Figura 2, abaixo), permitindo a seleção das regiões no desenho dos oligonucleotídeos, flanqueando as regiões intrônicas.

```
GATAATTGCGATTTCCTCAGGATCTCGAACGATATCGGTTGCGCGAAACATGCC
GGCACTCGTATCCACGAATAACTCAGCAACGGATTTCGATGGCCACCACACA
AAGTGAGCGCCTCTTGCAGGCCAGAATCGAAGAAAGTTCAGTTTTCCAGCCAC
ACTACATTCCGCATCACTACTGGAGGTTGGTGGTGGTCCCAAGGAGACCACGAGG
CGTAGGTTGAGTAATGTCAGCGATGCCGTCACCAGGAACTCTCCTACACGATTG
GCTGGAAGGCGGCACAGATTCCAGCGCAGGATATCATTCTCAGgtgagctgtagac
gaggaattccttgacaaacatataatatcgcctgattccaaaaatcataaaaaaccgaagGGTCGTT
GCCTGTGCGGTCATTATATCAAGAGACGCCTCAGAAGATCTGGTTTGTTCACAAA
AAGCTGGGACTGCAGCGCATACTAGCATACTGGGCTCCACCTCCATGGGCATTG
TGCGCGATGTGTTCCAGCGGTCCAAGTGtaagcaaaaaataacgctttattttattatatta
atcattttacacaccttgcccaagCTGGGCGATGAACTGGAGCGCATGCCCGGATAT
ACAACGGAGTAGCTCGTCAGATTTGCCGGAATCCGGGTGGTGGTCCATACTCC
GGATGCTGTGAGCTTGCTTTTGGGAGCCGTTGGTCGCGAGCTCTTCCGGGTGGA
GATTACGTGGAGCAAGGTGATCTCTCTGTTCCGATCGCCGGTGGGCTGTCCGTT
GATTGTGTACGCCAAGGACATCCGGAATACTGCCCAAGTTGATGGAGAGCGTTT
CCGAGGTGATCGAAGATGAGCTGGTTCGTTGATTAACGAGAATGGTGGTTGGgt
gagtttctccgatcatttcataattgtcgaggtttcatttcaatgatttccatttagAGTGGCATCAACA
CACAGTTTTACCACTACCAACAGCCTGAATCCTTTAGAGTGGACCACTTTGGTT
ATAGGCGTAGTTTTTGGCCTAATTCTAGTTTTTATGATTCTG
```

Figura 2. Sequência referente ao gene *Buffy* de *D. melanogaster*. Em verde identificadas as regiões de íntrons e em amarelo, os oligonucleotídeos desenhados. Fonte: Flybase (<http://flybase.org/>).

4.2. Desenho dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos desenhados (em amarelo, Figura 2) flanqueiam três íntrons e amplificam um fragmento que correspondem a uma banda de 803 pb em gel de agarose (259pb + 147pb + 309pb + 88pb, Figura 3), após ocorrência de *splicing* consitiutivo. Um amplicon de 1000pb seria visualizado em gel de agarose caso todos os íntrons fossem retidos após evento de *splicing* alternativo.

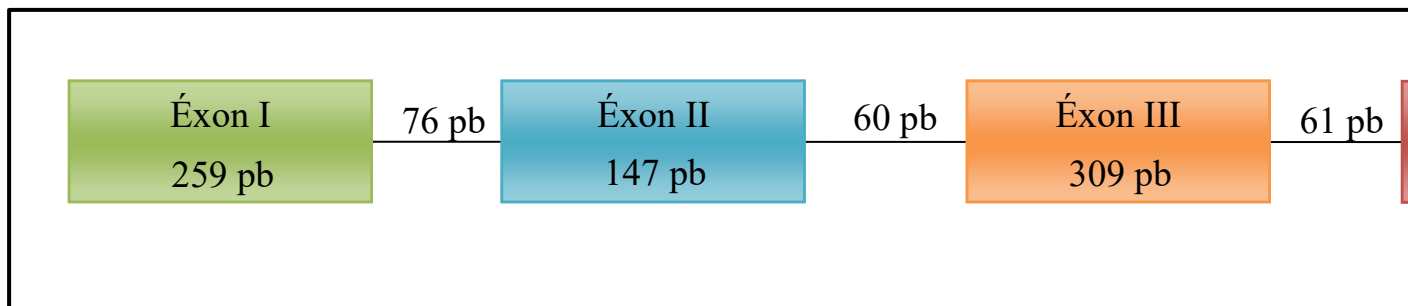


Figura 3. Representação esquemática dos éxons e íntrons do gene Buffy. As caixas correspondem às regiões de éxons, enquanto os traços correspondem às porções intrônicas. Os tamanhos de cada região estão indicados em número de pares de base.

Os parâmetros para desenho dos oligonucleotídeos foram então definidos no programa de escolha, sendo: tamanho do oligonucleotídeo entre 20 a 24 bases - mínimo de 20, tamanho ótimo 22 e máximo 24; temperatura do oligonucleotídeo variando entre 58 e 62° C - mínima de 58° C e temperatura ótima de 60° C (temperatura de anelamento). Conteúdo de GC (Guanina e Citosina) com mínimo de 45%, 50% como proporção ótima e 55% como máximo - quanto mais citosina e guanina o oligonucleotídeo contiver, maior a probabilidade de se anelar em si mesmo, formando uma estrutura circular que não se abre com facilidade.

O tamanho da sequência proposta para o desenho dos oligonucleotídeos sendo suficiente, o programa gera, em ordem, os melhores oligonucleotídeos direto (F) e reverso (R) para essa região.

4.3. Análise da ocorrência de processamento alternativo por RT-PCR

Nos testes iniciais com os oligonucleotídeos desenhados, as amostras propostas para análise de ocorrência de *splicing* alternativo não apresentaram resultados de amplificação (Figura 4).

Poucas reações de PCR foram realizadas até o momento e novos ciclos de PCR serão testados, alterando-se os padrões de concentração dos reagentes até que se obtenha a amplificação dos produtos gênicos esperados, ao menos para o *splicing* constitutivo.

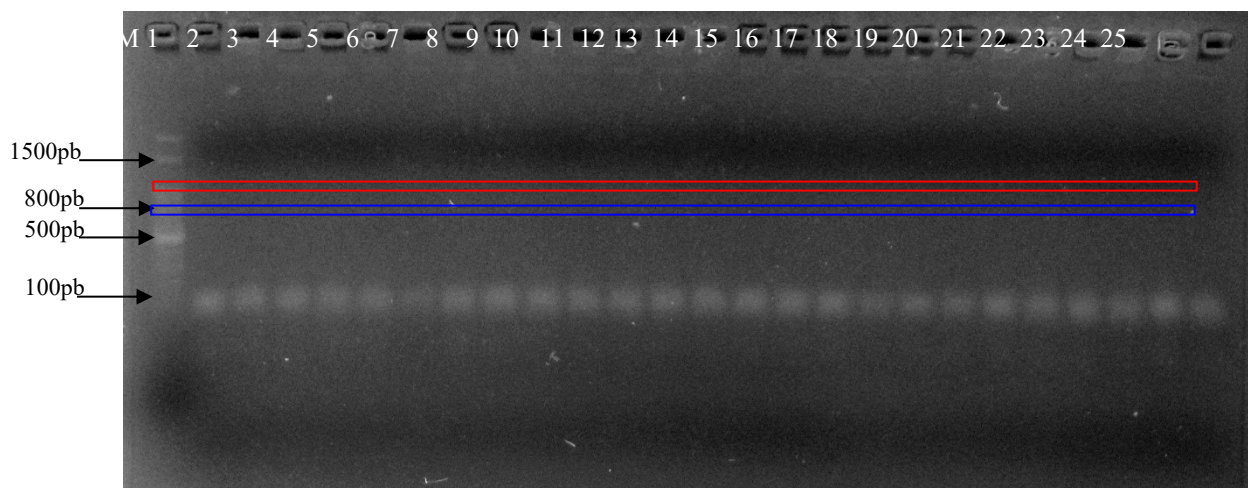


Figura 4. M: Marcador de Peso Molecular (Ladder 100 PB, Ludwig Biotecnologia LTDA, RS, Brasil); 1: HB DXR 1mM; 2: HB DXR 0,75mM; 3: HB DXR 0,5mM; 4: HB DXR 0,25mM; 5: HB DXR 0,125mM; 6: HB controle negativo (água); 7: HB uretano 10mM; 8: HB DXR 1mM (réplica); 9: HB DXR 0,75mM (réplica); 10: HB DXR 0,5mM (réplica); 11: HB DXR 0,25mM (réplica); 12: HB DXR 0,125mM (réplica); 13: HB controle negativo (água - réplica); 14: HB uretano 10mM (réplica); 15: ST DXR 1mM; 16: ST DXR 0,75mM; 17: ST DXR 0,5mM; 18: ST DXR 0,25mM; 19: ST DXR 0,125mM; 20: ST controle negativo (água); 21: ST uretano 10mM; 22: ST DXR 1mM (réplica); 23: ST DXR 0,75mM (réplica); 24: ST DXR 0,5mM (réplica); 25: ST DXR 0,25mM (réplica). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

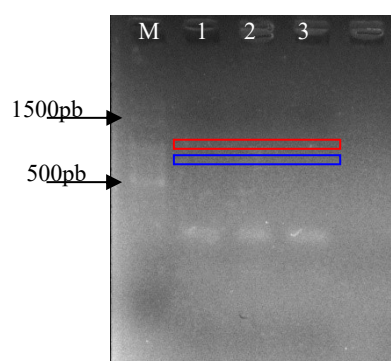


Figura 5. M: Marcador de Peso Molecular (Ladder 100 PB, Ludwig Biotecnologia LTDA, RS, Brasil); 1: ST DXR 0,125mM (réplica); 2: ST controle negativo (água - réplica); 3: ST uretano 10mM (réplica). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Nas Figuras 4 e 5, o retângulo azul representa a posição de amplicon esperada para a ocorrência de *splicing* constitutivo do pré-mRNA, e o retângulo vermelho corresponde à

ocorrência de retenção de todos os íntrons deste pre-mRNA deste gene, um evento possível de *splicing* alternativo.

5. DISCUSSÃO

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos que flanqueiam a porção do genoma referente ao gene *Buffy*, que codifica para uma proteína com funções anti-apoptóticas e inibitórias do ciclo celular. Essa proteína é necessária para a sobrevivência da célula e pode prevenir a morte celular induzida pelo desenvolvimento e pela irradiação. As funções de pró-sobrevivência e ciclo celular de Bcl-2 foram conservadas evolutivamente em *Buffy*, sugerindo que *Buffy* é o homólogo de *Drosophila* das proteínas Bcl-2 pró-sobrevivência.

Nesse estudo, foi realizada a indução de mutação via SMART, técnica de escolha para o tratamento das moscas com a droga DXR. O desenho dos oligonucleotídeos flanqueou todos os íntrons do gene em análise, a fim de permitir a verificação de todas as possíveis ocorrências de retenções de íntrons em resposta à exposição a DXR, ou nos controles positivo e negativo do teste SMART realizado.

A retenção de íntrons é um dos eventos mais comuns de *splicing* alternativo observados (CHEN & MANLEY, 2009). O sítio escolhido para desenho dos primers também permitiria a verificação de perda de éxons, o que poderia ser validado pela verificação do pelo número de pares de bases observados em gel de agarose.

Os parâmetros utilizados para desenhar os primers respeitaram os parâmetros gerais da literatura para obtenção de uma boa amplificação, sem interferência de produtos inespecíficos. O que aparenta ser um amplicon observado nos géis de agarose na posição próxima a 100 pb (Figura 4 e 5) corresponde, provavelmente, aos subprodutos da reação que não amplificaram a região do cDNA que os oligonucleotídeos flanqueiam. Podemos sugerir, desta observação, que a reação ocorreu e que, provavelmente, foi a quantidade de material genético o fator limitante para a ausência de amplificação do gene *Buffy*.

A ausência de fragmentos do gene amplificados pela técnica de RT-PCR não representa a ausência da ocorrência de evento de *splicing* alternativo. O fato pode ser justificado por pouca quantidade de cDNA na reação de PCR, ou ainda o oligonucleotídeo pode não ter sido bem sintetizado. A PCR será refeita, modificando os padrões da reação, incluindo mais cDNA, mudando concentrações dos demais reagentes ou mudando a Taq polimerase e, por último, se ainda dessa forma não se obtiver sucesso, será realizado um novo pedido de par de oligonucleotídeos para a região de interesse.

A reação seguiu os padrões pré-estabelecidos pelo grupo de pesquisa para as quantidades de reagentes adicionados na reação, porém, frequentemente, é necessária a adaptação do protocolo para cada reação de PCR.

D. melanogaster possui um banco de dados específico para predição de eventos de *splicing* alternativo, baseado nas sequências de DNA disponíveis no banco de dados Flybase (DEDB database). De acordo com este banco de dados, não foi classificado evento de *splicing* alternativo para o gene Buffy de *D. melanogaster* (LEE et al., 2004). Por serem resultados preditos em sequências de DNA, sem relação com dados de transcrito ou outros testes de análise de mRNA, estes não invalidam a possibilidade da ocorrência de *splicing* no gene Buffy.

Os eventos de *splicing* alternativo dependem de fatores como condições de cultivo, exposições à drogas; em caso de câncer, ao tipo de câncer associado. Em cada um destes casos, um ou mais íntrons podem ficar retidos, da mesma forma que um ou mais éxons podem ser perdidos. Nem sempre os íntrons são removidos e nem sempre os éxons são preservados, aumentando assim a complexidade do genoma e a diversidade de proteínas produzidas. Por tal motivo, os métodos de predição de ocorrência de eventos de *splicing* podem não representar o processamento do pré-mRNA *in vivo*.

Através dos resultados que foram obtidos até o momento, nada se pode afirmar a respeito da ocorrência de *splicing* alternativo para o gene em análise, nas condições testadas.

6. CONCLUSÃO

Através dos resultados que foram obtidos até o momento no presente trabalho pode-se concluir que:

- Não foi observada amplificação na região proposta para a análise (gene Buffy de *D. melanogaster*).
- A ocorrência de *splicing* alternativo nas condições testadas não pode ser afirmada ou refutada.
- As concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR podem ser os determinantes na não ocorrência da amplificação das regiões propostas para as reações de PCR.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANITA, H. P. SHARMA, P. J.; PATNAIK A. Apoptosis (programmed cell death) – a review. *World Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 3, Issue 4, p. 1854-1872, 2014.
- ASHIKAWA, K. et al. Evidence that activation of nuclear factor-kappa B is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. *Biochem Pharmacol*, v.67, n. 2, p.353-64. 2004.
- BORGES, H.L; LINDEN, R.;WANG, J. Y. DNA Damaged-induced cell death: lessons from the central nervous system. *Cell Research*, v. 18, n. 1, p. 17–26, 2008.
- CHEN, M; MANLEY, J. L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 10, n. 11, p. 741-754, 2009.
- DATTA, A. et al. Selective targeting of FAK–Pyk2 axis by alpha-naphthoflavone abrogates doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Cancer letters*, v. 362, n. 1, p. 25-35, 2015.
- DE REZENDE, A. A. A. et al. A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. *Food Chem Toxicol*, v. 55, p. 645-652. 2013.
- DE REZENDE, A. A. A. et al. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitisvinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, v. 47, n. 7, p. 1466-72. 2009.
- EOM, Y. et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene*, v. 24, n. 30, p. 4765-4777, 2005.
- GAMEN, S. et al. Doxorubicin Treatment Activates a Z-VAD-Sensitive Caspase, Which Causes $\Delta\Psi_m$ Loss, Caspase-9 Activity, and Apoptosis in Jurkat Cells. *Exp. Cell Res.*, 258, 223–235. 2000.
- GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 6, n. 2, p. 153-188, 1984.
- GRAF, U. et al. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, v. 222, n. 4, p. 359-373, 1989.
- GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* v. 271, n. 1, p. 59-67, 1992.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*. V.53, 3, p.335-343, 2007.

- HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, v. 6, n. 3, p. 1769-1792, 2014.
- HUANG, H. et al. Splice Info: an information repository for mRNA alternative splicing in human genome. *Nucleic acids research*, v. 33, n. suppl_1, p. D80-D85, 2005.
- JENNINGS, B. H. *Drosophila*—a versatile model in biology& medicine. *Materials today*, v. 14, n. 5, p. 190-195, 2011.
- LEHMANN, M. et al. Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin, and aclarubicin in the *Drosophila* Somatic Mutation and Recombination Test. *Environ Mol Mutagen*, v. 43, n. 4, p. 250-7. 2004.
- LEE, B. T. K; TAN, T W.; RANGANATHAN, S. DEDB: a database of *Drosophila melanogaster* exons in splicing graph form. *BMC bioinformatics*, v. 5, n. 1, p. 189, 2004.
- LEE, Y; RIO, D. C. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annual review of biochemistry*, v. 84, p. 291-323, 2015.
- M'ANGALE, P. G.; STAVELEY, B. E. Inhibition of Atg6 and Pi3K59F autophagy genes in neurons decreases lifespan and locomotor ability in *Drosophila melanogaster*. *Gen Mol Res*, v. 15, 2016.
- NOBILI, S. et al. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Current drug targets*, v. 7, n. 7, p. 861-879, 2006.
- O'REILLY, L. A.; HUANG, D. C.; STRASSER, A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *The EMBO journal*, v. 15, n. 24, p. 6979, 1996.
- PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, v. 63, n. 2, p. 411-436, 2011.
- QUINN, L. et al. Buffy, a *Drosophila* Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. *The EMBO journal*, v. 22, n. 14, p. 3568-3579, 2003.
- REHMAN, S. U. et al. Modulation of alternative splicing by anticancer drugs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, v. 6, n. 4, p. 369-379, 2015.
- REN, N. et al. Gene expression during *Drosophila* wing morphogenesis and differentiation. *Genetics*, v. 171, n. 2, p. 625-638, 2005.
- STALEY, J. P.; WOOLFORD, J. L. Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Current opinion in cell biology*, v. 21, n. 1, p. 109-118, 2009.
- THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, v. 21, n. 7, p. 440, 2011.

VALADARES, B. L. B. et al. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, v. 46, n. 3, p. 1103-10, 2008.

WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 3, n. 7, p. a003707, 2011.

YANG, F. et al. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviewson Cancer*, v. 1845, n. 1, p. 84-89, 2014.