

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Expressão do gene codificador da proteína HP1 em *Drosophila melanogaster*

Natália Marques Vieira

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Expressão do gene codificador da proteína HP1 em *Drosophila melanogaster*

Natália Marques Vieira

Orientador: Prof.^a. Dr.^a Ana Maria Bonetti

Co-Orientador: Prof.^a. Dr.^a Rute Magalhães Brito

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Expressão do gene codificador da proteína HP1 em *Drosophila melanogaster*

Natália Marques Vieira

Orientador: Prof.^a. Dr.^a Ana Maria Bonetti
Instituto de Biotecnologia / IBTEC

Co-Orientador: Prof.^a. Dr.^a Rute Magalhães Brito
Instituto de Biotecnologia / IBTEC

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
Coordenador do Curso de Graduação em Biotecnologia / Bacharelado

Uberlândia – MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Expressão do gene codificador da proteína HP1 em *Drosophila melanogaster*

Natália Marques Vieira

Aprovado pela Banca Examinadora em: / /

Nota: _____

Prof.^a. Dr.^a Ana Maria Bonetti

Uberlândia, 13 de julho de 2018

Dedico este trabalho a minha família, especialmente aos meus pais e as minhas professoras orientadora e co-orientadora por todo o apoio e ensinamentos proporcionados, os quais são essenciais ao meu crescimento como pessoa e como futura profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Fabiana e William, por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionaram ao longo de toda a minha trajetória.

À Prof.^a Dr.^a Ana Maria Bonetti, por ter aceitado me orientar durante a minha graduação e por toda a paciência e dedicação em me ensinar e me auxiliar todas as vezes em que tive dúvidas e inseguranças.

À minha Co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Rute Magalhães Brito, por ter sempre estado presente, compartilhando seus conhecimentos e me acompanhando durante as práticas laboratoriais.

À Tamiris, que nunca mediu esforços para me auxiliar durante todo o meu trabalho, sempre muito paciente durante os experimentos e estudos.

À Beatriz e ao Florentino, pela parceria no laboratório.

À Luiza e à Jéssica do LABGEN, por todos os conselhos.

Aos meus colegas de turma, pelas risadas, companheirismo e por todo o trabalho em conjunto que é fazer um curso de graduação, compartilhando ansiedades e alegrias durante esses quatro anos.

RESUMO

No organismo modelo *Drosophila melanogaster*, os telômeros são formados por três retrotransposons, HeT-A, TART e TAHRE. A expressão desses retrotransposons é regulada pela proteína *Heterochromatin Protein 1* (HP1) pela formação de heterocromatina. Em *D. melanogaster*, não há gene que codifica a enzima telomerase. O objetivo desse trabalho foi investigar e comparar a expressão de transcritos do gene *Su(var)2-5* codificador da proteína HP1, em *D. melanogaster* da linhagem Wts, portadora de Tumor Epitelial, em presença de Mitomicina C (MMC), indutor de tumor, nas concentrações 0,1; 0,05 e 0,025mM. Larvas obtidas do cruzamento de linhagem *wts/TM3, Sb¹* com linhagem Canton-S (selvagem), foram tratadas com MMC e moscas *wts/+* foram selecionadas. A expressão do gene *Su(var)2-5* aumentou na concentração 0,025mM e foi reduzida na concentração de 0,05mM em comparação com controle negativo. O aumento pode ser devido à ação da HP1 em reparo de lesões oxidativas e para a redução, a hipótese é de que o organismo foi afetado pela toxicidade de MMC e consequente regulação da expressão do gene *Su(var)2-5*.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*; *Heterochromatin Protein 1* (HP1); Telômero.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	1
1.2 Linhagem Wts de <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.3 Telômero e Telomerase	7
1.4 <i>Heterochromatin Protein 1</i> (HP1)	10
1.5 Câncer x Telomerase	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Material biológico	17
3.2 Expressão gênica	18
3.2.1 Extração de RNA.....	18
3.2.2 Síntese de cDNA	19
3.2.3 Reação quantitativa da polimerase em cadeia (qPCR)	19
3.2.4 Análise dos dados	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Drosophila melanogaster, conhecida popularmente como “mosca-das-frutas”, é um inseto de aproximadamente 3mm, cujo ciclo de vida tem duração de 10 a 12 dias, holometábolo, com estágios de desenvolvimento de embrião, larva, pupa e adulto (Figura 1). Vive de 90 a 120 dias e as fêmeas põem de 30 a 50 ovos por dia. Possuem quatro pares de cromossomos e um genoma de 180 milhões de pares de base (PANCHAL; TIWARI, 2017; PANDEY; NICHOLS, 2011).

Durante a fase adulta, ocorre o acasalamento, a fertilização é interna e o esperma é armazenado no corpo da fêmea no receptáculo seminal, ligado ao útero. As fêmeas alcançam o pico da produção de ovos entre o quarto e sétimo dia de vida (TYLER, 2000).

As larvas eclodem após 22-24 horas sob temperatura de 25°C e são chamadas de larvas de primeiro estágio (L1). Alimentam-se e crescem rapidamente e, 25 horas depois, chegam ao segundo estágio larval (L2) que dura, aproximadamente, 24 horas. As larvas L2 chegam ao terceiro estágio larval (L3) quando apresentam maior tamanho e maior taxa de alimentação. Após 30 h, começam a escalar o frasco onde são mantidas, afastando-se do meio onde se alimentaram e dão início à fase de pupa. Nesta fase, que dura de 3 a 4 dias, a larva está passando pelo processo de metamorfose para se tornar uma mosca adulta, a qual eclode do casulo. Após aproximadamente 12 horas, as moscas atingem a maturidade sexual (GOMES, 2001; TYLER, 2000).

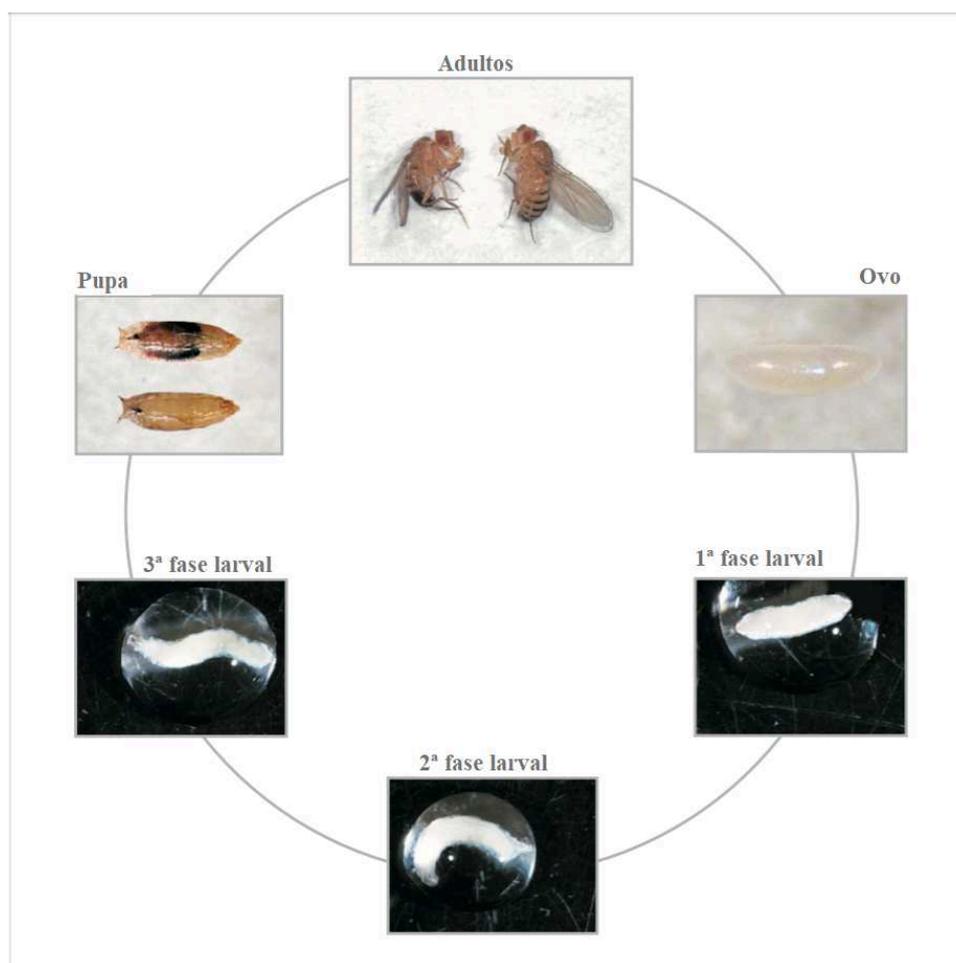


Figura 1: Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. Modificado de: IBMC.INEB, 2008.

Drosophila melanogaster é um inseto comumente encontrado ao redor de frutas e legumes utilizados nas atividades humanas. Sua alimentação é baseada, principalmente, nas leveduras presentes nesses alimentos. Em laboratório, as moscas são mantidas em garrafas contendo meio alimentício de diferentes composições, sendo os meios mais comuns os de banana e de fubá, aos quais as leveduras são adicionadas. A receita deve gerar um meio consistente para garantir que as moscas não fiquem presas, mas também, deve possibilitar a entrada e alimentação das larvas (JENNINGS, 2011; KELLER, 2007).

A *Drosophila* é um organismo utilizado como modelo em laboratórios de pesquisa devido a fatores como: facilidade de manipulação, baixo custo de manutenção, grande número de indivíduos que podem ser obtidos em um espaço pequeno, curto ciclo de vida, que permite o

estudo de doenças neurodegenerativas e outras. Além disso, tem pequeno número de cromossomos, genoma totalmente sequenciado e características fenotípicas que refletem visivelmente modificações genéticas como, cor e tamanho do olho, tamanho e formato dos pelos, presença de manchas, formato das asas (JENNINGS, 2011; PANCHAL; TIWARI, 2017).

Esse inseto tem sido utilizado como material biológico para estudos genéticos, análises de desenvolvimento embrionário, de envelhecimento, ensaios comportamentais, além de outras pesquisas. Cerca de 75% dos genes humanos relacionados a doenças apresentam ortólogos funcionais na *D. melanogaster*. A homologia com a sequência desses genes é de cerca de 40% de identidade, com 80% a 90% em domínios funcionais conservados. Por esse motivo, esses insetos passaram a ser utilizados no estudo de doenças humanas como Alzheimer, Parkinson, Epilepsia e tumores (JEIBMANN; PAULUS, 2009; JENNINGS, 2011).

D. melanogaster apresenta, na fase de larva, estruturas chamadas discos imaginais, que são tecidos de células epiteliais especializadas, de camada única, que darão origem à maioria das estruturas na mosca adulta, como asas, pernas, olhos, estrutura bucal e ductos genitais. Essas células epiteliais que vão proliferar e se diferenciar apresentam semelhanças com as células epiteliais de mamíferos, já que são diploides e têm seu ciclo celular dividido nas fases G1, S, G2 e M. Além disso, existem semelhanças a nível molecular, havendo ortólogos de componentes regulatórios do ciclo celular humano em *Drosophila* e de oncogenes e genes supressores de tumor (POTTER; TURENCHALK; XU, 2000; TYLER, 2000).

Os tumores em humanos podem ocorrer devido a fatores como ativação de oncogenes e perda ou inativação de genes supressores de tumor. Existem linhagens de *Drosophila melanogaster* que apresentam mutação para gene supressor de tumor, como é o caso da linhagem mutante para o gene *wts*, presente no cromossomo 3, que é ortólogo ao gene LATS1 em mamíferos (EKEN et al., 2002; JUSTICE et al., 1995). Essa linhagem foi utilizada em

nossa investigação para análise do gene codificador da proteína HP1 em comparação com a linhagem selvagem de *D. melanogaster*.

1.2. Linhagem *Wts* de *Drosophila melanogaster*

Em *Drosophila melanogaster*, o gene *wts* age como um supressor de tumor e codifica uma proteína que contém um domínio serina/treonina quinase importante à progressão do ciclo celular, controlando a proliferação e morfogênese das células. A deleção do gene *wts* leva à formação, em todo corpo da mosca, de clones celulares arredondados, denominados de verrugas (*warts*, Figura 2) que podem ser identificadas com o auxílio de estereomicroscópio (FURTADO; NEPOMUCENO, 2012; NISHIYAMA et al., 1999).



Figura 2: Expressão de tumor epitelial na forma de verrugas (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. Tumor na cabeça (A), tumor no olho (B), tumor no corpo (C), tumor na asa (D), tumor na pata (E) e tumor no halter (F).
Fonte: MORAIS, 2015.

O marcador *wts* em homozigose é uma mutação recessiva letal, que leva à perda de função do gene. Devido à letalidade, o cromossomo contendo o alelo mutado deve estar balanceado pelo cromossomo *TM3, Sb¹*. Para seleção fenotípica de moscas com o genótipo heterozigoto *wts/+*, a linhagem *wts/TM3, Sb¹* é cruzada com uma linhagem selvagem (Canton-S). Células dos discos imaginais em larvas *wts/+* podem sofrer perda de heterozigose devido a mutação,

perda ou recombinação cromossômica, levando à inativação do alelo selvagem do gene *wts*. Como esse evento ocorre em células isoladas, a permanência do marcador *wts* é viável e acarreta o aparecimento de tumores (verrugas) pelo corpo da mosca adulta (EEKEN et al., 2002; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012; VASCONCELOS et al., 2017).

O cruzamento de fêmea *wts/TM3, Sb¹* com macho *+/+* (Figura 3) gera descendentes de *D. melanogaster* com dois genótipos diferentes *wts/+* e *+/TM3, Sb¹*. Moscas com o genótipo *wts/+* são as de interesse para nosso estudo e são identificadas pela característica de pelos longos e menos espessos na cabeça e região torácica (Figura 4A). O cromossomo balanceador produz o genótipo *+/TM3, Sb¹*, que tem o efeito de reduzir a expressão gênica do alelo selvagem, devido à presença da mutação dominante *Sb*. As moscas com genótipo *+/TM3, Sb¹* são identificadas por pelos curtos e grossos no tórax e são descartadas (Figura 4B) (ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012; VASCONCELOS et al., 2017).

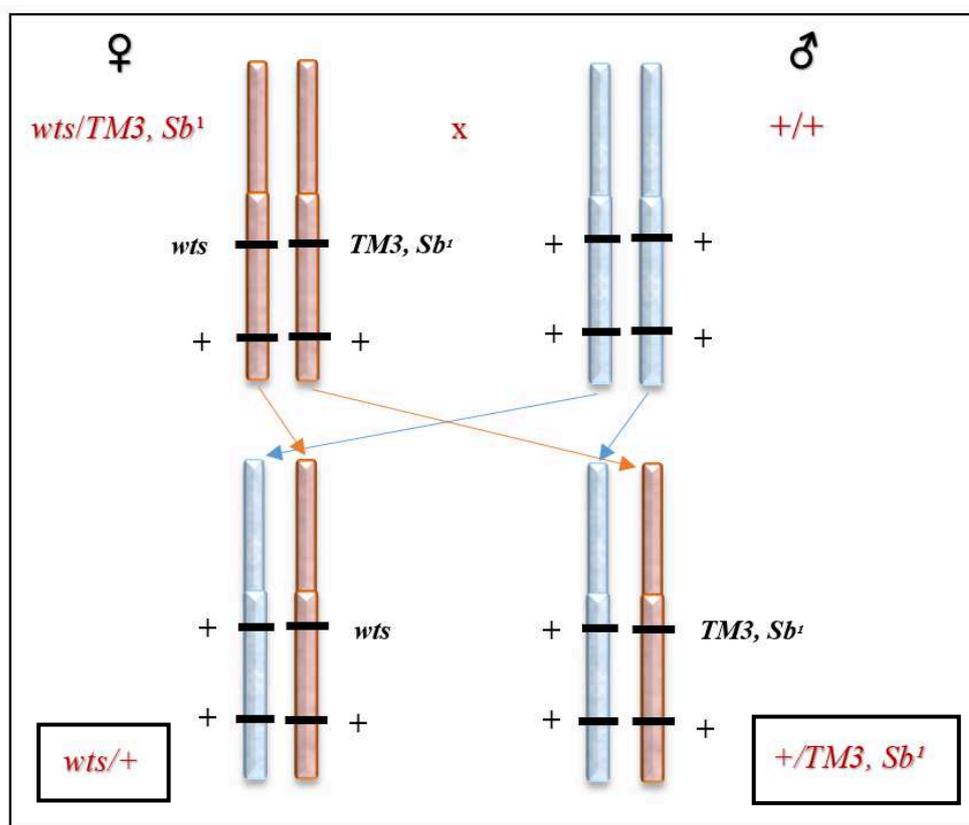


Figura 3: Cruzamento entre fêmeas da linhagem Wts (*wts/TM3, Sb¹*) e machos da linhagem Canton-S (*+/+*) para Teste de Detecção de Tumor Epitelial em *Drosophila melanogaster*.

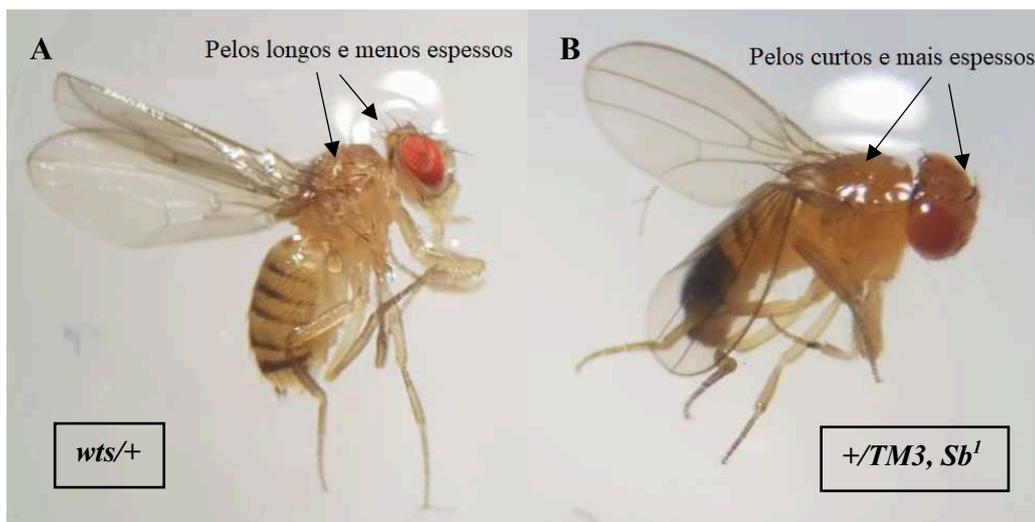


Figura 4: Fenótipo dos pelos no corpo da mosca *Drosophila melanogaster* nos genótipos *wts/+* e *+/TM3, Sb¹* da progênie obtida no cruzamento entre fêmeas da linhagem Wts (*wts/TM3, Sb¹*) e machos da linhagem Canton-S (*+/+*).

A moscas de genótipo *wts/+* são susceptíveis ao efeito de substâncias carcinogênicas e, por isso, é utilizada para estudos envolvendo a identificação delas. A Mitomicina C (MMC, Figura 5) é uma das substâncias utilizadas em estudos que envolvem tumores.

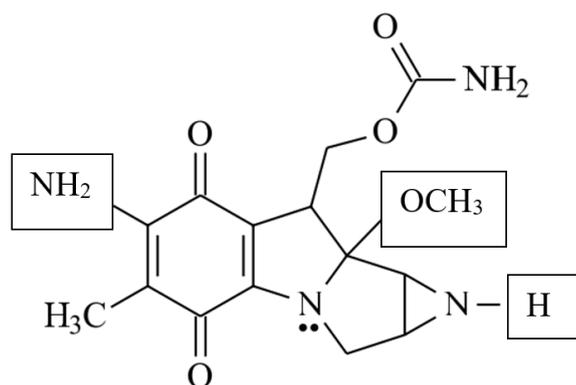


Figura 5: Estrutura da Mitomicina C. Regiões delimitadas por quadrado representam grupos mutáveis entre os tipos de Mitomicinas. Fonte: Modificado de OLIVEIRA; ALVES, 2002.

A MMC é um antibiótico que atua como antimetabólito alquilante que liga-se de forma cruzada ao DNA, acarretando ligações anômalas entre as fitas e quebras em sua estrutura, inibindo a mitose, a síntese protéica e levando à morte celular. Geralmente, é utilizada como agente antitumoral. A MMC é da classe das quinonas, agentes antineoplásicos biorredutíveis, que são substâncias inativas denominadas de pró-fármacos, que são ativadas após redução por enzimas do metabolismo de células em hipóxia. Durante o processo de ativação da MMC também ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem gerar lesões oxidativas no DNA e afetar outras biomoléculas (CRONEMBERGER et al., 2004; OLIVEIRA; ALVES, 2002; RJIBA-TOUATI et al., 2015).

A MMC é utilizada no tratamento quimioterápico de tumores sólidos, sendo que as células tumorais hipóxicas são as mais suscetíveis se comparadas às células tumorais oxigenadas e às normais. O uso dessa substância provoca diversos efeitos colaterais, como danos gastrointestinais, devido a citotoxicidade decorrente de fatores como produção de ROS (CHU; SARTORELLI, 2006; OLIVEIRA; ALVES, 2002).

Em nossos experimentos, a MMC foi utilizada como indutor de tumor na linhagem Wts (genótipo *wts/+*) de *D. melanogaster*. Em linhagem com genótipo *wts/+* as células ficam suscetíveis aos danos no DNA causados pela MMC e, conseqüentemente, a frequência de tumores se eleva comparado à linhagem selvagem.

1.3 Telômero e Telomerase

Os telômeros, extremidades dos cromossomos lineares, são estruturas importantes devido à proteção que conferem contra a perda de material genético a cada divisão celular e, também, por garantir a estabilidade dos cromossomos. Na maioria dos eucariotos, são constituídos por repetições de sequências de nucleotídeos ricas em guanina e timina (MAESTRONI; MATMATI; COULON, 2017; ZVEREVA; SHCHERBAKOVA; DONTSOVA, 2010).

Em eucariotos, o filamento do DNA duplex que é replicado de forma descontínua (fita *lagging*) fica com um segmento não replicado quando o último *primer* é retirado na extremidade 3' e isso impede a replicação convencional desse trecho, que se mantém unifilamentar. Quando o cromossomo com a lacuna for novamente replicado, será encurtado e, ao serem atingidos genes essenciais, ocorre a erosão do material genético. Para que isso não ocorra, a célula utiliza a enzima telomerase. Essa enzima liga-se à extremidade 3' da cadeia de DNA e, utilizando seu molde de RNA e transcriptase reversa, sintetiza nucleotídeos de DNA, que são adicionados a essa extremidade. O prolongamento sintetizado é utilizado como molde para a DNA polimerase replicar o trecho (GRIFFITHS et al., 2016).

No mecanismo de manutenção dos telômeros em *Drosophila melanogaster* não foi, até o momento, detectada enzima correspondente à telomerase. As sequências que compõem as pontas dos cromossomos nesse inseto são adicionadas por retrotransposição.

Os principais elementos envolvidos com os telômeros em *D. melanogaster* são os retrotransposons não-LTR (*Long Terminal Repeat*) específicos, *Healing Transposon* (HeT-A), que é o mais abundante, *Telomere Associated Retrotransposon* (TART) e *Telomere Associated and HeT-A Related* (TAHRE), sendo os dois primeiros os de maior frequência.

O mRNA transcrito a partir dos retrotransposons vai para o citoplasma, onde será traduzido nas proteínas Gag, codificada na sequência da ORF1 e Pol, codificada na ORF2 (Figura 6) (CASACUBERTA, 2017; PARDUE; DEBARYSHE, 2008; TEIXEIRA, 2007).

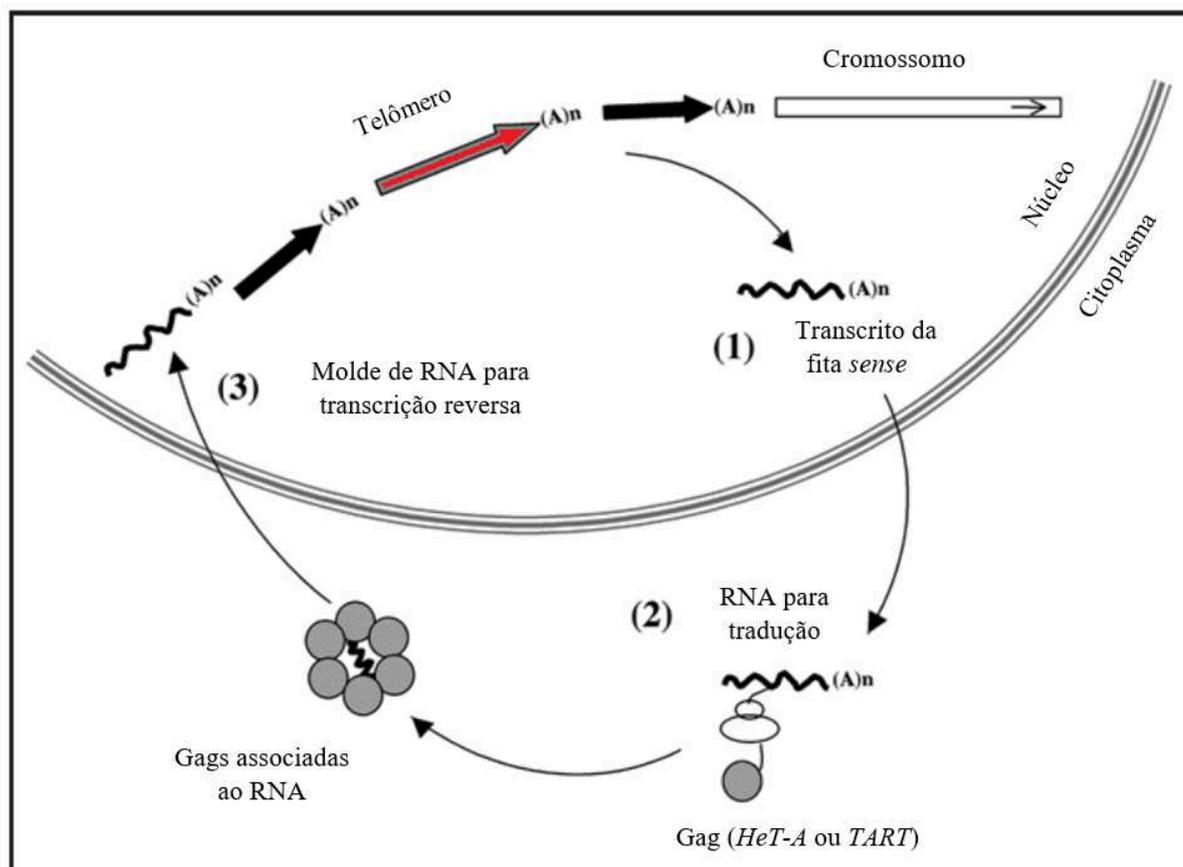


Figura 6: Modelo dos retrotransposons teloméricos sendo adicionados ao final dos cromossomos. Setas pretas representam HeT-A e seta vermelha, TART; círculos cinzas representam Gag. No passo (1), RNA transcrito da fita sense de um dos retrotransposons. Em (2) a fita de RNA é traduzida em proteínas Gag que se associam ao RNA que será utilizado como molde para transcrição reversa (3). Fonte: Modificado de PARDUE; DEBARYSHE, 2008.

As proteínas Gag e Pol ligam-se ao RNA mensageiro, voltam para o núcleo e se ligam ao sítio alvo de transposição no telômero. A ponta 3'OH do DNA é utilizada pela enzima Pol para a transcrição reversa. O fragmento de DNA sintetizado se liga à extremidade 3' do cromossomo, completando a molécula de DNA com o retrotransposon, segundo modelos de Pardue e Debaryshe (2008), Teixeira (2007) e Zhang e Rong (2012).

O retrotransposon adicionado possui uma longa sequência não codificante 3'UTR, que se liga à extremidade 5'UTR do próximo retrotransposon. A cauda poli-A desses retrotransposons,

adicionada após a transcrição, fica direcionada para o centrômero e a transcrição ocorre no sentido *sense* ou *antisense* (CASACUBERTA, 2017).

Após o alongamento, o telômero se liga a complexos protéicos formando uma estrutura denominada *cap* que, em *Drosophila*, é formado pela interação direta da proteína ***Heterochromatin Protein 1 (HP1)*** com o DNA. A *cap* protege as pontas dos cromossomos evitando que a célula as reconheça como quebras unifilamentares e que ocorram fusões cromossômicas, o que levaria a diferentes processos relacionados ao envelhecimento e a doenças (FRYDRYCHOVA; MASON; ARCHER, 2008; GRIFFITHS et al., 2016; PERRINI et al., 2004).

1.4 *Heterochromatin Protein 1 (HP1)*

A *Heterochromatin Protein 1 (HP1)* é uma proteína cromossomal, conservada durante a evolução e que apresenta, dentre suas principais funções, o papel de estabelecer e manter a estrutura de heterocromatina nos cromossomos. Foi descoberta, inicialmente, em *Drosophila*, mas proteínas pertencentes a essa família já foram verificadas em grande número de eucariotos, como leveduras, plantas e humanos. A similaridade da sequência de aminoácidos entre proteínas HP1 de mamíferos e de *Drosophila* é de 50% (DIALYNAS; VITALINI; WALLRATH, 2008; LOMBERK; WALLRATH; URRUTIA, 2006).

A HP1 apresenta uma estrutura dividida em domínio *chromo*, na porção amino-terminal, região ligante (*hinge*) e domínio *chromoshadow*, na porção carboxi-terminal. A família HP1 faz parte de uma superfamília de proteínas que apresenta o domínio *chromo* com 30 a 60 aminoácidos e todas essas proteínas estão relacionadas à formação da heterocromatina. O que separa as porções amino e carboxi-terminal é uma região ligante, pouco conservada, que apresenta uma sequência de aminoácidos variável entre uma proteína HP1 e outra, dentro ou

entre espécies. O domínio *chromoshadow* tem função relacionada à dimerização da HP1 e sua interação com outras proteínas (LOMBERK; WALLRATH; URRUTIA, 2006).

A HP1 é codificada pelo gene supressor de variação *Su(var)2-5* que, quando mutado, reduz o processo de dispersão da heterocromatina, que ocorre na chamada variação do efeito de posição (PEV). A PEV promove silenciamento de genes que estão perto das regiões heterocromáticas. Quanto maior a quantidade de proteínas HP1 produzida, mais intenso é esse efeito (DIALYNAS; VITALINI; WALLRATH, 2008)

A HP1 atua na heterocromatina, primeiramente, pela interação do domínio *chromo* com a histona 3 metilada na lisina 9 (H3-MeK9). Essa metilação acontece pela ação de enzimas metiltransferases de histonas (HMTases) as quais são recrutadas pela ligação da HP1 à histona, gerando mais metilação e, conseqüentemente, mais sítios de ligação para novas proteínas HP1 (LOMBERK; WALLRATH; URRUTIA, 2006; WANG; JIA; JIA; 2016).

Já foi verificado que a HP1, além de apresentar um controle negativo na expressão gênica, pode funcionar ativando a transcrição (controle positivo) de alguns genes em situações específicas, dependendo da associação com outras proteínas. Ela pode ser requerida na ativação apropriada de genes que residem em regiões de heterocromatina e já foi encontrada ligada a genes em regiões de eucromatina (KWON; WORKMAN, 2011).

A HP1 é um componente formador de *cap*. Neste caso, a HP1 interage com a proteína HOAP (*Heterochromatin Protein 1 / origin recognition complex-associated Protein*) por meio do domínio *chromoshadow*. Outras proteínas, como HipHop, Moi (Modigliani) e Ver (Verrocchio) também fazem parte da formação dessa estrutura. Ver e Moi estão presentes exclusivamente na ponta 3' no final do cromossomo na fita simples de DNA, enquanto que HipHop, juntamente com HOAP e HP1, ocupa não apenas a extremidade, mas também uma região terminal relativamente maior, de aproximadamente 10 kb (BADUGU; SHAREEF;

KELLUM, 2003; DUBRUILLE; LOPPIN, 2015; FRYDRYCHOVA; MASON; ARCHER, 2008).

A *cap* independe da sequência de DNA presente na ponta onde será formada, ou seja, não é necessária a presença dos retrotransposons teloméricos, já que HP1 se liga diretamente à ponta do DNA por meio do domínio *hinge*. Este fato foi verificado em experimentos nos quais os cromossomos tiveram suas sequências terminais deletadas e, mesmo assim, a HP1 se mostrou presente na *cap*. A HP1 é capaz de se ligar tanto ao DNA de fita dupla quando ao de fita simples, tendo maior afinidade com esta última (FANTI et al., 1998; FRYDRYCHOVA; BIESSMANN; MASON, 2008; FRYDRYCHOVA; MASON; ARCHER, 2008).

Além do *capping*, a HP1 promove a formação da heterocromatina pericêntrica e telomérica em *Drosophila*. Nos telômeros, ela regula o alongamento silenciando os retrotransposons. Esse evento é esquematizado pelo modelo mostrado na Figura 7: a HP1 liga-se diretamente ao DNA telomérico na região da *cap* e recruta a enzima metiltransferase de histonas (HMTases) que metila a lisina 9 da histona H3 (H3-MeK9). Assim como no modelo descrito anteriormente para a formação da heterocromatina, a HP1 interage com a histona metilada, que recruta novamente a HMTase e promove a repetição desse ciclo, ocorrendo novas interações entre HP1 e as histonas. É formada, assim, a cromatina telomérica repressiva (FANTI et al., 1998; PERRINI et al., 2004).

Foi verificado que mutação no gene *Su(var)2-5* que afeta o domínio *chromo* leva ao aumento na expressão dos transposons HeT-A e TART e no arranjo deles na extremidade dos cromossomos. Esse domínio é dispensável para a formação do *cap*, já que a HP1 se liga diretamente ao DNA, mas é necessário para os processos de silenciamento e alongamento do telômero, pois é por meio dele que ocorre a ligação da HP1 com H3-MeK9. Foi visto que

mutações que levam à ausência de HP1 são responsáveis por fusões teloméricas, devido a não estruturação do *cap* (PERRINI et al., 2004; SHPIZ; KALMYKOVA, 2012).

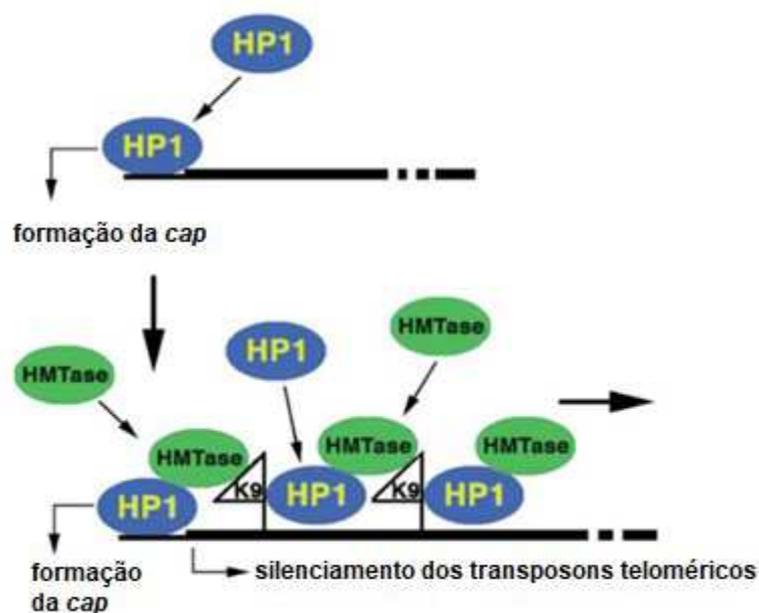


Figura 7: Modelo de atuação da proteína HP1 no *capping* e no silenciamento dos transposons teloméricos. A HP1 se liga diretamente ao DNA no telômero para formação da *cap*, então recruta HMTases que irão metilar histonas H3 na lisina 9 (H3-MeK9) criando sítios de ligação para o domínio *chromo* da HP1. Com isso, é feito o silenciamento dos transposons teloméricos. Fonte: Modificado de PERRINI et al., 2004.

O telômero de *D. melanogaster* ainda apresenta uma outra região subterminal denominada “sequência associada ao telômero” (TAS) localizada adjacente ao conjunto de retrotransposons, na porção terminal. O telômero fica dividido, então, em *cap*, retrotransposons e TAS (Figura 8).

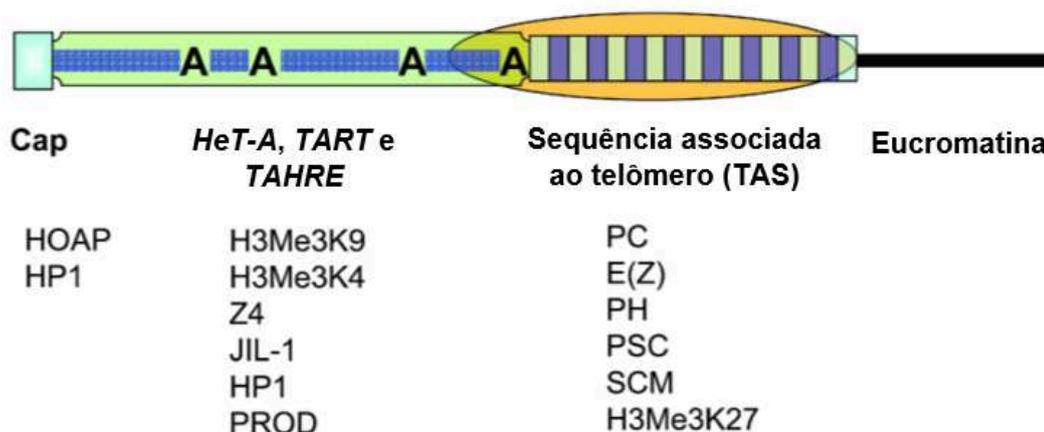


Figura 8: Modelo da estrutura do telômero em *D. melanogaster*. Em negrito, o nome de cada região e abaixo as proteínas correspondentes. Fonte: Modificado de MASON; FRYDRYCHOVA; BIESSMANN, 2008.

A região TAS se assemelha a uma região de heterocromatina e induz a inativação de genes próximos a ela. Esse processo é denominado efeito de posição telomérica (TPE), controlado por outras proteínas distintas da HP1. Os retrotransposons teloméricos apresentam características que os associa a cromatina descondensada, já que a inserção de transgenes dentro dessa região, a 10 kb de distância de TAS, apresenta expressão semelhante às regiões de eucromatina (FRYDRYCHOVA; MASON; ARCHER, 2008).

1.5 Câncer x Telomerase

O câncer é uma neoplasia maligna, caracterizado pelo crescimento desordenado do número de células que tiveram seu material genético alterado. Em estágio avançado, células se desprendem do tumor de origem e se espalham, por meio da corrente sanguínea ou por vasos linfáticos, pelo corpo do indivíduo em um processo denominado metástase, causando uma série de consequências. A carcinogênese, ou seja, formação do câncer, pode ocorrer devido a

alterações cumulativas no DNA, como mutações e ampliações gênicas, mecanismos epigenéticos, instabilidade genômica, perdas e quebras nos cromossomos (ALMEIDA et al., 2005; DANTAS et al., 2009).

Durante o ciclo celular existem etapas de *checkpoint*, em que mecanismos regulatórios controlam a divisão celular evitando e reparando erros. Esses mecanismos envolvem genes que codificam proteínas específicas que fazem reparos no DNA quando ocorrem mutações. Porém, quando os genes responsáveis pelos reparos também se encontram mutados, eles passam não funcionar normalmente, acarretando em uma série de alterações no material genético da célula que apresentará anormalidades. Estas poderão ser passadas para as células-filha, favorecendo assim o surgimento do câncer (SCHNEIDER, 2001).

Os genes reguladores podem ser de dois tipos: supressores de tumor, reguladores negativos e proto-oncogenes, reguladores positivos. Os primeiros interrompem o ciclo para que o DNA seja reparado ou sinalizam para apoptose, morte celular programada. Os segundos aceleram o crescimento celular e inibem apoptose, produzindo proteínas que agem em cascata e levam sinal ao núcleo celular para estimular a divisão. Quando os proto-oncogenes sofrem alterações eles se tornam oncogenes, o que descontrola o processo de divisão. Esse descontrole é acentuado com a inativação dos genes supressores de tumor, que não conseguem mais inibir o crescimento e divisão celulares (SCHNEIDER, 2001).

O encurtamento dos telômeros, por diminuição da telomerase, conforme ocorrem divisões celulares é uma barreira para a progressão do tumor. Além de alterações como rápida e descontrolada divisão celular e perda da capacidade de apoptose, nas células cancerígenas ocorre o aumento da expressão da enzima telomerase. Ela estabiliza as pontas dos cromossomos impedindo perda de material genético durante as replicações e evitando a morte da célula, o que favorece sua proliferação (FERNANDES; MELLO, 2008; SHAY; WRIGHT, 2011).

Acredita-se que, seguindo o modelo de formação dos telômeros pelo aumento da expressão da enzima telomerase em câncer humano, possa haver diferenças no nível de expressão do gene *Su(var)2-5* codificador da proteína HP1 na presença de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*. A hipótese é de que, na presença de tumor, a expressão do gene *Su(var)2-5* seja reduzida, havendo menos proteína HP1 e, conseqüentemente, menos heterocromatina sendo formada na região telomérica, o que aumenta a expressão dos retrotransposons havendo o alongamento dos telômeros.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar e comparar a expressão de transcritos do gene *Su(var)2-5*, codificador da proteína HP1, em *Drosophila melanogaster* portadora de tumor epitelial (linhagem Wts) tratadas com diferentes concentrações de Mitomicina C.

2.2 Objetivos Específicos

- Induzir tumores em *D. melanogaster* por meio da Mitomicina C (MMC);
- Analisar os níveis de expressão dos transcritos do gene *Su(var)2-5*, codificador da proteína HP1, em *D. melanogaster* portadora de tumor epitelial, em diferentes concentrações de MMC ;
- Verificar se é possível associar a expressão de *Su(var)2-5* com a presença de tumor epitelial em *D. melanogaster*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Foram utilizadas linhagens de *Drosophila melanogaster* Canton-S (selvagem) e portadoras de tumor epitelial (*wts/TM3, Sb^r*). As moscas foram mantidas em incubadoras com condições controladas de luz (12 horas claro:12 horas escuro), temperatura de 25°C e 60% de umidade de acordo com Lemos, Branco e Hartl (2010).

Foram coletadas fêmeas virgens da linhagem Wts (*wts/TM3, Sb^r*) durante 4 dias, a cada 2 horas. Os machos foram obtidos da linhagem Canton-S. As moscas foram mantidas separadas em frascos contendo meio à base de fubá (93,59mL de água; 0,6g de ágar; 7,3g de fubá; 1,0g de farinha de soja; 1,7g de levedura; 6,4mL de xarope de glicose; 0,5mL de solução ácida obtida de preparado de 28,63mL de ácido propiônico, 2,88mL de ácido fosfórico 85% e 68,49 mL de água destilada; e 0,9mL de solução de Nipagin, obtida de solução preparada contendo 12g de Nipagin, 0,24mL de ácido fosfórico 85% e etanol suficiente para completar 120mL) até se obter a quantidade de indivíduos suficiente (50 fêmeas e 50 machos). As fêmeas foram, então, transferidas para o frasco contendo machos para o cruzamento. Após 20 horas, as moscas foram colocadas no meio de postura (50g de fermento biológico; 2g de ágar; 50 mL de água destilada; açúcar refinado), sendo retiradas após 8 horas para que ficassem apenas ovos no frasco.

Após 72 horas, o meio de postura foi lavado com água MilliQ autoclavada e as larvas L3 foram coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina. Foram, então, submetidas a tratamento crônico (72 horas) em meio com purê de batata Yoki® Alimentos S.A. (2g em cada *vial*) dissolvido em solvente, indutor de tumor ou não, como segue:

- Água destilada – controle negativo
- Mitomicina C (MMC) – indutor de tumor

A Mitomicina C (CAS 50-07-7) foi diluída em água ultrapura (Direct-Q MILLIPORE) autoclavada para a obtenção das concentrações 0,1; 0,05 e 0,025mM segundo Silva e Nepumuceno (2011).

Vials de cultivo para cada concentração e controle negativo foram preparados em duplicata, um para o teste de sobrevivência e outro para obtenção de moscas para as demais etapas. Para o teste de sobrevivência, foram colocadas 20 larvas em cada *vial*. Ao longo dos dias, foi registrado o número de pupas e adultos obtidos.

Adultos machos e fêmeas foram anestesiados com éter etílico e observados sob estereomicroscópio (BEL® Photonics) para seleção de indivíduos com genótipo *wts*/+, os quais possuem fenótipo selvagem (pelos longos e menos espessos no tórax). Eles foram mantidos em freezer -80°C para posterior extração de RNA.

3.2 Expressão gênica

3.2.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de *pool* de 05 moscas fêmeas obtidas do tratamento com 0,05; 0,025 ou 0 (controle negativo) mM de MMC e *pool* de 03 machos do tratamento com 0,05 ou 0 (controle negativo) mM de MMC. As moscas foram colocadas em microtubos e maceradas em 500 mL de Trizol (Ambion Life Technologies 15596-018). Os microtubos foram *vortexados* e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionados 100 µL de clorofórmio e *vortexados* por 15 segundos e incubados por 2 minutos a temperatura ambiente. Foi feita a centrifugação em MiniSpin® (Eppendorf) a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida a novos microtubos, onde foram adicionados 250 µL de isopropanol e mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugados novamente a 12000g por 10 minutos a

4°C. Os *pellets* foram lavados com etanol 75%, centrifugados a 7500g por 5 minutos a 4°C e secos ao ar durante 20 minutos. Ressuspendidos em 20 µL de água livre de nucleases.

A qualidade e a concentração das amostras de RNA foram verificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

3.2.2 Síntese de cDNA

O cDNA de cada amostra foi preparado utilizando-se Platus Transcriber RNase H - cDNA First Strand Kit (Sinapse Inc). O RNA foi inicialmente tratado com RQ1 DNase Promega (M6101) (1 µL de tampão; 1,0 µL DNase; 1 µg de RNA; água livre de nucleases para completar 10 µL) e incubado a 37 °C por 30 minutos. Foi adicionado 1,0 µL de RQ1 *STOP solution* Promega (M6101) para inativar a DNase e a solução foi incubada a 65 °C por 10 minutos. O cDNA foi preparado com 1µL (0,5 µg/µL) de *primers* oligo dT; 4µL de tampão; 1µL de inibidor de RNase; 2µL (10mM) de mistura de dNTP; 1µL (200U/uL) de H Minus Transcriptase Reversa e 1µg de RNA tratado com DNase, totalizando 20µL de reação. Os tubos foram incubados por 60 minutos a 42 °C seguido por 5 minutos a 70 °C. Foram obtidos 20µL de cDNA para cada amostra. O cDNA foi diluído para 50ng/µL para ser usado como molde em reações de qPCR.

3.2.3 Reação quantitativa da polimerase em cadeia (qPCR)

Perfis de PCR em tempo real foram obtidos usando-se 10 pmol/µL *primer* (Tabela 1) em mistura de proporções iguais de *forward* (F) e *reverse* (R) para o gene *Su(var)2-5* codificador da proteína HP1. O gene codificador da proteína RP49 (GenBank accession number AF441189) foi usado como gene de controle endógeno. As reações foram realizadas usando-se 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (4µL de EvaGreen®; 1µL *primer* F + R; 1µL de

cDNA; 14µL de água ultrapura livre de nucleases) em equipamento Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher). Nas reações controle não foi adicionado cDNA. Análises de dissociação de produtos de PCR foram realizadas para a verificação de ampliações inespecíficas e para presença de dímeros de *primers*.

Tabela 1: Sequência dos *primers* para o gene avaliado e de controle endógeno.

Gene/ Proteína	ID	Primer	Tamanho (pb)	TA (°C)	Referência
<i>Heterochromatin Protein 1</i>	HP1	F: GCCCTCTGGCAATAAATCAA R: ACCATTTCTGCTTGGTCCAC	150	56	GRACHEVA; DUS; ELGIN, 2009
Ribossomal 49	rp49	F: AGATCGTGAAGAAGCGCACCAAG R: CACCAGGAACTTCTTGAATCCGG	150	56	LOURENÇO et al., 2008

ID: abreviatura arbitrária do nome dos genes; TA: temperatura de anelamento em graus Celsius (°C); pb: pares de base.

3.2.4 Análise dos dados

As diferenças de expressão normalizadas contra o gene de controle endógeno foram analisadas utilizando o método de quantificação relativa delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Para cada reação foi obtido o valor de *cycle-threshold* (Ct), número de ciclos necessário para que o sinal de fluorescência seja reconhecido como estatisticamente significativo. Para cada amostra, foi calculada a média dos valores de Ct que é aplicada no cálculo de ΔCt , em que se subtrai o valor médio de Ct do gene de controle endógeno (*rp49*) do Ct do gene alvo (*Su(var)2-5*) para as diferentes concentrações de Mitomicina C (tratamento) e para o controle negativo. O cálculo de $\Delta\Delta Ct$ emprega a fórmula: [ΔCt (tratamento) – ΔCt (controle negativo)]. O valor da expressão gênica relativa é obtido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A análise da expressão foi realizada utilizando-se o *software* Rest (Relative Expression Software Tool) 2009 (LOBO; LOBO, 2014; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de pupas e moscas de *Drosophila melanogaster* obtidas no teste de sobrevivência, de acordo com a concentração de Mitomicina C (MMC), está representada na Tabela 2.

Tabela 2: Número de pupas e moscas obtidas no teste de sobrevivência.

Mitomicina C (mM)	Pupas	Adultos
CN	14	10
0,1	12	1
0,05	13	7
0,025	11	7

Quantidade de pupas e moscas obtidas a partir de 20 larvas L3 (*wts/+* e *+TM3, Sb^l*) em cada concentração de Mitomicina C. CN - controle negativo.

A partir da contagem foi calculada a porcentagem de sobrevivência nas diferentes concentrações de MMC com relação ao número inicial de 20 larvas, como mostrado no gráfico da Figura 9.

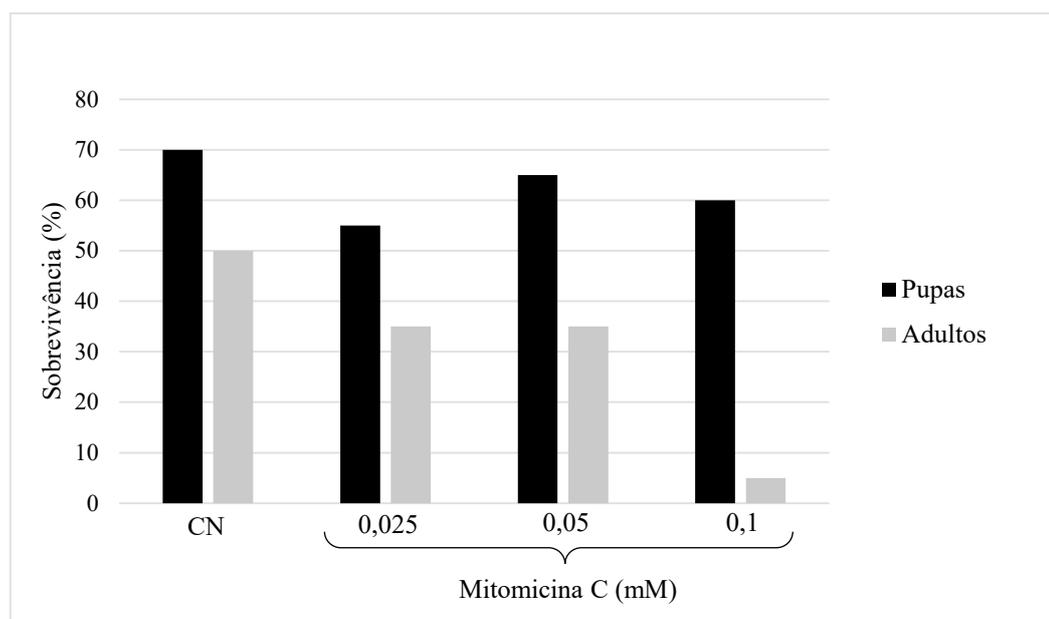


Figura 9: Gráfico da sobrevivência em porcentagem (%) de pupas (coluna preta) e adultos (coluna cinza) em relação ao total de larvas, de *Drosophila melanogaster* das linhagens *wts/+* e *+/TM3, Sb^I* em meio contendo Mitomicina C nas concentrações 0,1mM, 0,05mM, 0,025mM e controle negativo (CN).

A porcentagem de sobreviventes em comparação com controle negativo foi reduzida para o meio contendo MMC tanto em pupas quanto em adultos. A citotoxicidade dessa substância explica esse resultado. Dessa forma, as concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1mM de MMC afetaram o processo de metamorfose, interferindo na taxa de sobrevivência das moscas.

A Figura 9 mostra que o número de pupas sobreviventes foi maior na concentração de 0,05mM do que em 0,025mM e o número de adultos nessas duas concentrações foi mantido. Porém, houve maior prejuízo de sobrevivência na concentração 0,05mM, pois com relação ao número de pupas, a emergência de adultos foi reduzida (53,84%) quando se compara com a concentração de 0,025mM (63,63%). Na concentração de 0,1mM, apenas 8,33% de pupas eclodiram em adultos.

Devido ao número reduzido de moscas adultas da linhagem *wts/+* na concentração 0,1mM de MMC, apenas as moscas *wts/+* das demais concentrações foram utilizadas para obtenção de material genético. Fêmeas foram avaliadas para as concentrações de 0,05mM, 0,025mM e controle negativo e machos, somente para a concentração de 0,05mM e controle negativo, pois não nasceram na concentração 0,025mM.

A expressão relativa do gene *Su(var)2-5* foi verificada em qPCR, a partir do teste estatístico delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) e está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de Ct, delta Ct (ΔCt) e delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) para cada concentração de Mitomicina C.

Fêmeas					
Mitomicina C (mM)	Ct (<i>Su(var)2-5</i>)	Ct (<i>rp49</i>)	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
0,05	12,85	12,51	0,34	0,29	0,82
0,025	11,45	11,59	-0,14	-0,19	1,14
CN	7,61	7,56	0,05	0	1
Machos					
Mitomicina C (mM)	Ct (<i>Su(var)2-5</i>)	Ct (<i>rp49</i>)	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
0,05	12,34	12,44	-0,1	0,25	0,84
CN	11,84	12,19	-0,35	0	1

CN – controle negativo

A análise estatística da expressão relativa do gene *Su(var)2-5* foi realizada por meio do *software* Rest (Relative Expression Software Tool) 2009, o qual aplica o teste “t” de Student ($p < 0,05$) sobre os valores de Ct. O valor de **p** é a probabilidade de se rejeitar a hipótese nula, de que não há diferença estatística entre as amostras. Se esse valor for menor do que 0,05 a hipótese nula é rejeitada.

Para a concentração de 0,05mM, correspondente às fêmeas, o valor de p foi igual a 0, o que significa que houve diferença na expressão do gene *Su(var)2-5* se comparado ao controle negativo, sendo que, pelo valor de $2^{-\Delta\Delta CT} < 1$, a expressão nessa concentração foi reduzida. Para a concentração de 0,025mM, $p = 0$ e o valor de $2^{-\Delta\Delta CT} > 1$, a expressão aumentou comparado ao controle negativo.

Na concentração de 0,05mM, para os machos, o valor de p foi 0,505, sendo a hipótese nula verdadeira, ou seja, não houve diferença estatística entre o grupo tratado com MMC e o controle negativo. O $2^{-\Delta\Delta CT} < 1$ significa que, numericamente, a expressão relativa foi reduzida se comparada ao controle.

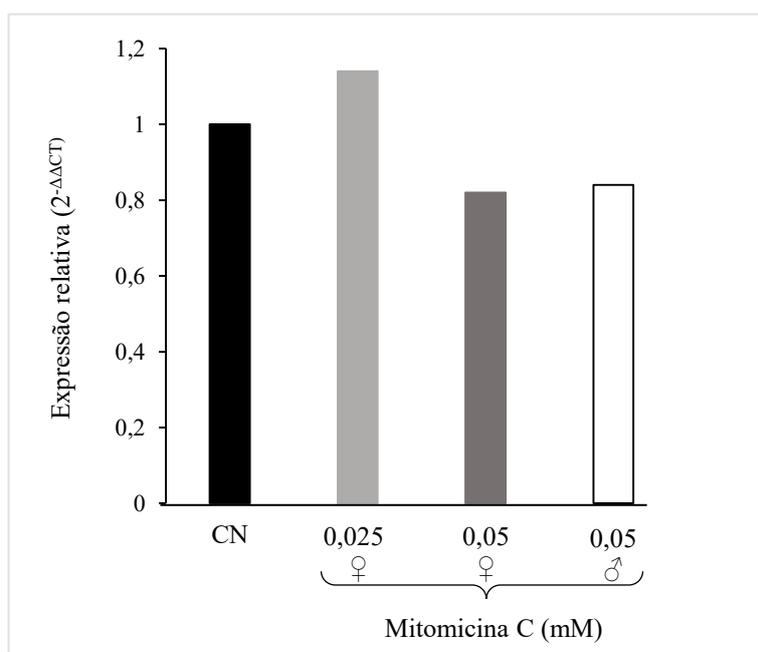


Figura 10: Gráfico da expressão relativa do gene *Su(var)2-5* para controle negativo (CN) e concentrações de Mitomicina C. A barra de preenchimento branco corresponde à amostra de machos na concentração 0,05mM.

O gráfico da Figura 10 mostra que a expressão relativa do gene *Su(var)2-5*, codificador da HP1, foi reduzida na concentração 0,05mM quando comparada ao controle negativo. Esse

resultado está em concordância com a hipótese formulada, de que na presença de tumor ocorre a redução de HP1, levando ao aumento de telômero, já que esta região do DNA terá menos heterocromatina e mais eucromatina, o que aumenta a transcrição e a obtenção de novos moldes de retrotransposons a serem inseridos (PERRINI et al., 2004).

Em câncer humano é verificada intensa atividade da enzima telomerase para garantir o alongamento dos telômeros e, conseqüentemente, a integridade do material genético durante o ciclo celular (FERNANDES; MELLO, 2008). Isso faz com que a célula se mantenha em processo de divisão continuamente.

Analisando-se o gráfico da Figura 10, em machos, a expressão de *Su(var)2-5* em 0,05mM foi maior (0,84) do que de fêmeas (0,82). Para uma comparação mais detalhada entre os gêneros, foi feito o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando-se o controle negativo das fêmeas. A fórmula aplicada foi $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct (\text{machos em } 0,05\text{mM}) - \Delta Ct (\text{controle negativo de fêmeas})]$. O valor de $2^{-\Delta\Delta CT} = 1,11$ e a análise estatística realizada pelo *software* Rest (Relative Expression Software Tool) 2009 apresentou $p < 0,05$, ou seja, a expressão em machos foi 11% maior que em fêmeas para 0,05mM.

Uma possível explicação é a presença, em maior quantidade, de HP1 ao longo de todo o cromossomo X em machos, mas não em fêmeas. Isso seria devido ao papel da HP1 em manter o equilíbrio no complexo de dosagem compensatória, em que a transcrição de genes do único cromossomo X do macho seria mais intensa para compensar o fato de eles possuírem apenas uma cópia desse cromossomo. Esse resultado seria independente do tratamento utilizado (DE WIT; GREIL; VAN STEENSEL, 2005).

Na concentração 0,025mM, houve aumento na expressão do gene *Su(var)2-5* comparado às demais concentrações. Esperava-se, entretanto, que o valor de expressão relativa fosse intermediário ao controle negativo e à concentração de 0,05mM devido à menor toxicidade.

Para esse resultado é possível levantar a hipótese de ação da HP1 em vias de reparo do DNA, nos casos de lesões oxidativas. Uma segunda hipótese seria a de alteração da expressão de genes envolvidos na progressão de tumor por meio da formação de heterocromatina.

A primeira hipótese está relacionada com o papel da HP1 no reparo de lesões oxidativas no DNA causadas por agentes alquilantes, como Mitomicina C. De acordo com Dinant e Luijsterburg (2009), foi verificado que a HP1 é recrutada em sítios de DNA eucromático que sofreram danos oxidativos, juntamente com outras proteínas de reparo, havendo um aumento na concentração de HP1 nesses locais. Na concentração de 0,025mM, a MMC estaria atuando no DNA provocando alterações nos processos de replicação e transcrição, porém, devido à menor toxicidade comparada a concentração 0,05mM, alguns genes poderiam manter sua atividade como tentativa de produzir proteínas, como HP1, que auxiliem nas vias de reparo nas lesões causadas por essa substância.

Quanto à segunda hipótese, de acordo com Dialynas, Vitalini e Wallrath (2008), estudos em humanos envolvendo câncer de mama mostraram que a HP1 pode apresentar atividade reguladora na invasão celular. Em câncer de mama com elevada capacidade invasiva e metastática, há redução na expressão da proteína HP1 comparado ao câncer menos invasivo e não metastático. Em testes *in vitro*, a inativação do gene codificador da HP1 aumentou a taxa de invasão do câncer menos invasivo em 50% enquanto que a expressão dessa proteína exógena, na forma de câncer mais invasiva, reduziu a taxa de invasão em 30% se comparada ao controle (células com taxas normais de crescimento). A HP1 funcionaria, dessa forma, como supressor de metástase e o mecanismo envolvido está relacionado com a regulação da expressão gênica por formação de heterocromatina.

No nosso estudo, a expressão do gene codificador de HP1 foi elevada em 0,025mM, possivelmente, devido a tentativa das células de combater a progressão tumoral. Quando

aumentamos a concentração para 0,05mM, a taxa de formação de tumores provavelmente se intensificou de modo que a expressão do gene *Su(var)2-5* foi afetada, não havendo produção de HP1 suficiente para inibir a expressão de genes envolvidos na metástase.

Pelo papel que os elementos de transposição desempenham nos telômeros dos cromossomos de *Drosophila*, é sugerido que eles passaram por um processo de “domesticação”, apresentando funções celulares essenciais para a sobrevivência do organismo. Essa hipótese contradiz a visão dos transposons como elementos presentes em grande número de cópias nos genomas e, frequentemente, associados a efeitos prejudiciais no hospedeiro, por provocarem alterações nos genes, nos promotores ou em sua vizinhança. Além de participarem da constituição dos telômeros, os transposons podem desempenhar outros papéis importantes, como proteção do hospedeiro contra parasitas (ZHANG; RONG, 2012).

5. CONCLUSÃO

A análise da expressão do gene codificador da proteína HP1 em *Drosophila melanogaster* permitiu concluir que:

- *Drosophila melanogaster* obtida em meio contendo as concentrações 0,025; 0,05 e 0,1mM de Mitomicina C (MMC) teve seu desenvolvimento afetado, com redução da taxa de sobrevivência, quando comparado ao controle negativo (água destilada);
- O número de adultos obtidos em relação ao número de pupas foi menor com o aumento da concentração de MMC, o que demonstra o efeito citotóxico da substância;
- A expressão do gene *Su(var)2-5*, codificador da proteína HP1, na linhagem *wts/+*, aumentou na concentração 0,025mM de MMC, se comparado ao controle negativo, e

reduziu na concentração 0,05mM (significativo para fêmeas e não significativo para machos). O teste estatístico aplicado foi o delta delta Ct, tendo-se como referência o gene de controle endógeno *rp49* e $p < 0,05$;

- A proteína HP1, em *D. melanogaster*, pode ter ação no reparo de lesões oxidativas causadas pela MMC, acumulando-se em locais com essas lesões;
- O aumento na produção e expressão da proteína HP1, provocando heterocromatização da região, seria uma tentativa de regular a expressão gênica e conter a proliferação dos tumores;
- A toxicidade da MMC, com o aumento de concentração, seria suficiente para prejudicar a expressão de genes envolvidos no reparo de lesões no DNA, como *Su(var)2-5* e impedir que a HP1 seja produzida em quantidade suficiente para regular a expressão gênica, por formação de heterocromatina.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

BADUGU, R. K.; SHAREEF, M. M.; KELLUM, R. Novel Drosophila Heterochromatin Protein I (HP1)/Origin Recognition Complex-associated Protein (HOAP) Repeat Motif in HP1/HOAP Interactions and Chromocenter Associations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 34491–34498, 2003.

CASACUBERTA, E. Drosophila: Retrotransposons making up telomeres. **Viruses**, v. 9, n. 7, 2017.

CHU, E; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.55, p.751-829, 2006.

CRONEMBERGER, S. et al. Trabeculectomia com Mitomicina C em pacientes com glaucoma congênito refratário. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 3, p. 475–479, 2004.

DANTAS, É. L. R. et al. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2009.

DE WIT, E.; GREIL, F.; VAN STEENSEL, B. Genome-wide HP1 binding in Drosophila: Developmental plasticity and genomic targeting signals. **Genome Research**, v. 15, n. 9, p. 1265–1273, 2005.

DIALYNAS, G. K.; VITALINI, M. W.; WALLRATH, L. L. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 647, n. 1–2, p. 13–20, 2008.

DINANT, C.; LUIJSTERBURG, M. S. The Emerging Role of HP1 in the DNA Damage Response. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 24, p. 6335–6340, 2009.

DUBRUILLE, R.; LOPPIN, B. Protection of Drosophila chromosome ends through minimal telomere capping. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 10, p. 1969–1981, 2015.

EEKEN, J. C. J. et al. Induction of epithelial tumors in Drosophila melanogaster heterozygous for the tumor suppressor gene wts. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 40, n. 4, p. 277–282, 2002.

FANTI, L. et al. The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in Drosophila. **Mol Cell**, v. 2, n. 5, p. 527–538, 1998.

FERNANDES, I. C.; MELLO, A. A. Entendendo e combatendo o câncer. **Revista Tem@**, v. 7, n. 10/11, p. 2–11, 2008.

FRYDRYCHOVA, R. C.; MASON, J. M.; ARCHER, T. K. HP1 is distributed within distinct chromatin domains at Drosophila telomeres. **Genetics**, v. 180, n. 1, p. 121–131, 2008.

FRYDRYCHOVA, R. C.; BIESSMANN, H.; MASON, J. M. Regulation of telomere length in Drosophila. **Cytogenet Genome Res**, v. 122, n. 3–4, p. 356–364, 2008.

FURTADO, S. G.; NEPOMUCENO, J. C. Redução de tumor epitelial em Drosophila melanogaster, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente Bothrops pauloensis, por meio de teste wts (warts). **Perquirere**, v. 9, n. 1, p. 224–240, 2012.

GRACHEVA, E.; DUS, M.; ELGIN, S. C. R. Drosophila RISC component VIG and its homolog Vig2 impact heterochromatin formation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. 1–11, 2009.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

GOMES, R. A. P. L. Protocolo: utilização de *Drosophila* em Genética: 1ª Parte. **Biologias**, Lisboa, v.1, 2001.

IBMC.INEB. Estaleiro da Ciência: Guia Prático. Porto: Universidade do Porto, IBMC, INEB, p. 25, 2008.

JEIBMANN, A.; PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 2, p. 407–440, 2009.

JENNINGS, B. H. *Drosophila* - a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, v. 14, n. 5, p. 190–195, 2011.

JUSTICE, R. W. et al. The *Drosophila* tumor-suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic-dystrophy kinase and is required for the control of cell-shape and proliferation. **Genes & Development**, v. 9, n. 5, p. 534–546, 1995.

KELLER, A. *Drosophila melanogaster*'s history as a human commensal. **Current Biology**, v. 17, n. 3, p. 77–81, 2007.

KWON, S. H.; WORKMAN, J. L. The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression: HP1 acts as a positive regulator of transcription. **BioEssays**, v. 33, n. 4, p. 280–289, 2011.

LEMOS, B.; BRANCO, A. T.; HARTL, D. L. Epigenetic effects of polymorphic Y chromosomes modulate chromatin components, immune response, and sexual conflict. **PNAS**, v. 107, n. 36, p. 15826–15831, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. Considerações Estatísticas na Análise de Dados de Expressão Gênica Gerados pela Técnica de RT-qPCR. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Documentos (INFOTECA-E)**. Sobral, 2014.

LOMBERK, G.; WALLRATH, L. L.; URRUTIA, R. The Heterochromatin Protein 1 family. **Genome Biology**, v. 7, n. 7, p. 1–8, 2006.

LOURENÇO, A. P. et al. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. **Apidologie**, v. 39, p. 372–385, 2008.

MAESTRONI, L.; MATMATI, S.; COULON, S. Solving the Telomere Replication Problem. **Genes**, v. 8, n. 2, p. 55, 2017.

MASON, J. M.; FRYDRYCHOVA, R. C.; BIESSMANN, H. Drosophila telomeres: An exception providing new insights. **BioEssays**, v. 30, n. 1, p. 25-37, 2008.

MORAIS, C. R. *Fipronil: avaliação da mutagenicidade e carcinogenicidade em Drosophila melanogaster (Diptera, Drosophilidae) e do efeito no comportamento de Melipona scutellaris (Hymenoptera, Apidae)*. 2015. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

NISHIYAMA, Y. et al. A human homolog of Drosophila warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **FEBS Letters**, v. 459, n. 2, p. 159–165, 1999.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quim Nova**, v. 25, n. 6 A, p. 976–984, 2002.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2598–2604, 2012.

PANCHAL, K.; TIWARI, A. K. *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1331–1345, 2017.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 2, p. 411–436, 2011.

PARDUE, M; DEBARYSHE, P. G. *Drosophila* telomeres: A variation on the telomerase theme. **Fly**, v. 2, n. 3, p. 101–110, 2008.

PERRINI, B. et al. HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. **Molecular Cell**, v. 15, n. 3, p. 467–476, 2004.

POTTER, C. J.; TURENCHALK, G. S.; XU, T. *Drosophila* in cancer research: an expanding role. **TIG**, v. 16, n. 1, p. 33–39, 2000.

RJIBA-TOUATI, K. et al. Effect of recombinant human erythropoietin on mitomycin C-induced oxidative stress and genotoxicity in rat kidney and heart tissues. **Human and Experimental Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 53–62, 2015.

SCHNEIDER, K. Cell Biology and Cancer. **Counseling about cancer: strategies for genetic counseling**, p. 1–17, 2001.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. **Semin Cancer Biol.** v. 21, n. 6, p. 349–353, 2011.

SILVA, L. M.; NEPOMUCENO, J. C. Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da Mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, v. 1, n. 8, p. 80–94, 2011.

SHPIZ, S.; KALMYKOVA, A. Control of Telomere Length in *Drosophila*. **Reviews on Selected Topics of Telomere Biology**, p. 31–56, 2012.

TEIXEIRA, P. R. *Identificação e caracterização de elementos de transposição no genoma de Rhynchosciara*. 2007. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

TYLER, M. S. Development of the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. **Developmental Biology, A Guide for Experimental Study**, p. 85–106, 2000.

VASCONCELOS, M. A. et al. Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 101, p. 1–7, 2017.

WANG, J.; JIA, S. T.; JIA, S. New Insights into the Regulation of Heterochromatin. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 5, p. 284–294, 2016.

ZHANG, L.; RONG, Y. S. Retrotransposons at *Drosophila* telomeres: Host domestication of a selfish element for the maintenance of genome integrity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, n. 7, p. 771–775, 2012.

ZVEREVA, M. I.; SHCHERBAKOVA, D. M.; DONTSOVA, O. A. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 13, p. 1563–1583, 2010.