

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO**

KARINE APARECIDA FELIX RIBEIRO

**INSERÇÃO DO RETROTRANSPOSON *roo{793* EM *Drosophila melanogaster*
(Meigen, 1830): EFEITOS ADAPTATIVOS SOBRE A VIABILIDADE DE LARVAS E
TEMPO DE DESENVOLVIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA**

CRICIÚMA

2013

KARINE APARECIDA FELIX RIBEIRO

**INSERÇÃO DO RETROTRANSPOSON *roo{793* EM *Drosophila melanogaster*
(Meigen, 1830): EFEITOS ADAPTATIVOS SOBRE A VIABILIDADE DE LARVAS E
TEMPO DE DESENVOLVIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para
obtenção do grau de bacharel no curso de Ciências
Biológicas da Universidade do Extremo Sul
Catarinense – UNESC.

Orientador: Prof. Msc. Tiago Moreti
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Josefa Perez González

CRICIÚMA

2013

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Funcional e Evolutiva, do Instituto de Biologia Evolutiva da Universidade Pompeu Fabra – UPF (Barcelona, Espanha). Portanto, agradeço imensamente à minha supervisora, Prof^a. Dr^a. Josefa González, por ter permitido minha estadia no laboratório, onde obtive conhecimentos imensuráveis;

Ao Prof. Msc. Tiago Moreti pela excelente orientação e por ter ajudado brilhantemente a transformar os dados do meu “caderno de experimentos” neste trabalho. Foram valiosos os conhecimentos transmitidos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de graduação sanduíche concedida, através do Programa Ciência sem Fronteiras;

Aos meus colegas de laboratório: Miriam, Laín, Lidia e Anna, pelo companheirismo, sugestões de pesquisa, pela ajuda nas técnicas moleculares e paciência com o meu “portunhol”;

Aos meus melhores amigos do curso: Roger, Riti, Kris e Renato, com os quais compartilhei minha paixão pela biologia e todos os momentos durante os quatro anos de graduação, desejo uma brilhante carreira a todos;

À minha família, pelo respeito, apoio, incentivo e amor. Aos meus pais, Nena e Sérgio, devo todas as conquistas que já tive e que virão. Às minhas irmãs, Daiane, Dani e Karol, devo o companheirismo e a lealdade, com um agradecimento especial à Karol por toda a ajuda durante a graduação e por compartilhar comigo a paixão pela ciência, especialmente a biologia. Aos cunhados, Edu e Cristian, devo a amizade de todas as horas.

Vocês são maravilhosos.

“A vida é a exuberância evolutiva; é o que acontece quando populações crescentes de organismos sensíveis e atuantes esbarram umas nas outras e elaboram as coisas. A vida é a brincadeira dos animais.”

(trecho retirado do livro: “O que é vida?” – Lynn Margulis & Dorion Sagan)

RESUMO

Os elementos de transposição (TEs) são sequências de DNA capazes de se mover diretamente de um locus para outro do genoma hospedeiro. Apesar de serem vistos inicialmente como “genes egoístas”, ou seja, que utilizam o genoma hospedeiro apenas como seu veículo de propagação, um acúmulo de evidências moleculares tem demonstrado que as mutações que os TEs geram no genoma podem afetar a adaptação e evolução dos organismos nos quais eles residem. O TE *roo*{793 é um retrotransposon presente em *Drosophila melanogaster* com uma frequência de 2,78% na África, local de origem da espécie e com um clima tropical, e uma frequência de 20,67% nos EUA, para onde a espécie migrou a milhares de anos atrás, cujo clima é temperado. Portanto, o foco deste estudo foi analisar o possível papel adaptativo desta inserção sobre a resistência ao frio, uma adaptação que possivelmente aumentou sua frequência com a imigração das populações de *D. melanogaster* para ambientes fora da África. Para isto, embriões de *D. melanogaster* de duas linhagens distintas, uma com o TE presente (RAL-810) e outra sem a inserção (RAL-783), foram expostos a 1°C durante um período de 14 horas (com grupos controles não expostos), e então as taxas de viabilidade e desenvolvimento foram medidas. Nos grupos controles, a viabilidade das larvas foi a mesma em ambas as linhagens, ou seja, em condições normais tanto a linhagem com o TE presente como a linhagem sem a inserção apresentam a mesma taxa de sobrevivência. Porém, em condições normais, a linhagem com o TE presente apresentou uma taxa de desenvolvimento maior em relação à linhagem sem a inserção. Já nos grupos tratados, ou seja, que foram expostos ao experimento de resistência ao frio, a linhagem com o TE presente em seu genótipo apresentou uma taxa de desenvolvimento mais elevada, além de uma maior resistência ao frio, tendo um número significativamente maior de indivíduos nascidos ao final do experimento. Estes resultados demonstram que o TE *roo*{793 pode estar contribuindo para a adaptação ao frio em populações de *D. melanogaster* em ambientes fora da África.

Palavras-chaves: Elementos de transposição. Adaptação. Resistência ao frio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representando o cromossomo 2, e as posições aproximadas do gene CG18446 e o TE <i>roo</i> {493}.....	13
Figura 2. Tubos dos estoques com meio de cultura.....	17
Figura 3. Representação das posições do TE <i>roo</i> {793}, CG18446, e os primers FL, L e R....	18
Figura 4. (a) caixa de posta e (b) meio do ovoposição.	21
Figura 5. PCR amplificação utilizando os primers FL, L e R e DNA genômico da linhagem RAL-810 de <i>D. melanogaster</i>	22
Figura 6. PCR amplificação utilizando os primers FL, L e R e DNA genômico da linhagem RAL-783 de <i>D. melanogaster</i>	23
Figura 7. Número total de indivíduos nascidos em cada tratamento.	26
Figura 8. Progressão dos nascimentos nas linhagens que não foram expostas ao frio, RAL-810 (TE+) e RAL-783 (TE-), durante os nove dias de desenvolvimento.....	28
Figura 9. Progressão dos nascimentos nas linhagens expostas ao frio, RAL-810 (TE+) e RAL-783 (TE-), durante os nove dias de desenvolvimento.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ddNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

kb – quilobase

ORF(s) – do inglês *open reading frames* (fases abertas de leitura)

pb – pares de base

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction* (reação de polimerização em cadeia)

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

TE(s) – do inglês *transposable element* (elemento de transposição)

TBE – tris-borato-EDTA

T_m – temperatura de anelamento

Trp – enzima transposase

UTR – do inglês *untranslated regions* (região não traduzida)

χ^2 – teste estatístico Qui-Quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivos Específicos	15
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 LINHAGENS, OBTENÇÃO, E MANUTENÇÃO DOS ESTOQUES.....	16
2.2 COMPROVAÇÃO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO ELEMENTO MÓVEL NAS LINHAGENS	17
2.2.1 Obtenção do DNA genômico	17
2.2.2 Quantificação do DNA genômico	17
2.2.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	18
2.2.4 Sequenciamento	19
2.3 ENSAIO FENOTÍPICO	20
2.3.1 Meio de ovoposição	20
2.3.2 Ensaio de resistência ao frio	20
2.4 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS	21
3 RESULTADOS	22
3.1 PRESENÇA E AUSÊNCIA DO ELEMENTO MÓVEL	22
3.2 SEQUÊNCIAS OBTIDAS	23
3.3 ENSAIO FENOTÍPICO	24
3.3.1 Teste de homogeneidade das amostras	24
3.3.2 Descrição da viabilidade e desenvolvimento em condições normais e de exposição ao frio	25
3.3.3 Viabilidade das larvas	26
3.3.4 Tempo de desenvolvimento	27
4 DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

A adaptação biológica é o processo pelo qual o *fitness* médio de uma população aumenta com o tempo, ou seja, os indivíduos que possuem um conjunto de características que condicionem vantagem às respostas ambientais, melhoram a sua reprodução e sobrevivência. Estas diferenças no genótipo individual que afetam a aptidão afeta as frequências dos genótipos que irão mudar ao longo das gerações; os genótipos com maior aptidão e os alelos que os condicionam serão mais comuns, portanto.

Nos últimos anos, muitos estudos iniciaram uma busca pelas assinaturas da adaptação genética em uma variedade de organismos, incluindo populações naturais, plantas e animais domesticados. Estes estudos sugerem que o valor adaptativo médio da população tende a aumentar ao longo do tempo. Entretanto, muitas questões fundamentais, como a contribuição relativa da codificação *versus* mudanças regulatórias, mutação pontual *versus* mudanças estruturais, ou diferentes classes de genes funcionais na adaptação, permanecem em grande parte sem resposta. Apesar de sua importância central para a biologia, a genética da adaptação permanece pouco compreendida (GONZÁLEZ, et al. 2008).

Muitos mecanismos estão envolvidos na modificação do genoma e adaptação genética ao longo do tempo, e a busca do entendimento destes mecanismos se intensificou nos últimos anos devido ao melhor entendimento em biologia molecular e o melhoramento de técnicas moleculares. Um dos alvos destes estudos são os elementos de transposição do DNA (*TEs – transposable elements*), que vêm mostrando uma significativa influência na evolução dos genomas, através de diversos mecanismos.

Elementos de transposição

Os elementos de transposição foram descobertos inicialmente no milho, por Bárbara McClintock na década de 50, a partir da observação de que o padrão de pigmentação variado dos grãos de milho era resultado da ação de elementos genéticos que tinham capacidade de mover-se dentro do genoma (REZENDE-TEIXEIRA, 2007). Como esses elementos se moviam quando as células se dividiam e proliferavam, eles alteravam o material genético em apenas algumas células e essas mudanças na coloração eram devido ao efeito desses “elementos controladores” nos genes de pigmentação. A principal conclusão de Barbara McClintock foi de que esses elementos influenciariam de maneira importante o desenvolvimento dos organismos (VIDAL, 2007).

Na década de 1970, outros experimentos levaram a descoberta de elementos de DNA com a capacidade de sair de um local e se inserir em outro local do genoma, gerando mutações em células somáticas e germinativas. Esses experimentos identificaram os “elementos controladores” sugeridos por Bárbara McClintock, agora chamados de elementos transponíveis, como importantes constituintes dos genomas (BIÉMONT; VIEIRA, 2006; VIDAL, 2007). Os TEs são, portanto, sequências de DNA com tipicamente entre 1-10kb de comprimento, capazes de se mover diretamente de um local para outro do genoma hospedeiro. Sua transposição não depende de qualquer relação entre as sequências dos sítios doadores e receptores, diferente da maioria dos outros processos de reestruturação genômica. Além de mover a si mesmos, algumas vezes sequências adicionais podem ser levadas para novas locais dentro do mesmo genoma (REZENDE-TEIXEIRA, 2007; GONZÁLEZ; PETROV, 2009).

Os TEs são componentes antigos, abundantes e diversos de genomas procarióticos e eucarióticos. Eles estão presentes em praticamente todas as espécies eucarióticas estudadas até hoje, onde representam de 3% a 80% do DNA total (BIÉMONT; VIEIRA, 2006). A origem destes elementos em uma espécie pode ser resultado de transmissão vertical de cópias presentes em uma espécie ancestral durante o processo de especiação, ou ainda através de transmissão horizontal que pode ser definida como o processo nos quais genes podem se mover entre espécies isoladas reprodutivamente. No entanto, os mecanismos pelos quais a transmissão horizontal ocorre ainda permanecem incompreendidos (RUBIN, 2008; LORETO; CARARETO; CAPY, 2008).

Em virtude da grande diversidade de TEs descobertos, com características e mecanismos diferentes, houve a necessidade de agrupá-los e classificá-los. Ainda não há um consenso no sistema de classificação dos TEs (BIÉMONT; VIEIRA, 2006), porém, a mais usual, os classifica da seguinte maneira: os elementos de classe I, que se transpõem via um RNA intermediário, também chamados de retrotransposons, e os elementos de classe II, que se transpõem via mecanismo DNA excisão e reparo, chamados de transposons (GONZÁLEZ; PETROV, 2009).

Tanto os TEs de classe I, como os de classe II, também podem ser classificados de acordo com a autonomia ou não para realização da transposição. Nesta, eles são chamados de autônomo ou não-autônomos, sendo que os autônomos possuem as fases abertas de leitura (*ORFs – open reading frames*), que codificam os produtos necessários para realização da transposição, e os não-autônomos que não as possuem, dependendo diretamente da atividade da transcriptase reversa (RT) ou transposase (Trp) fornecida pelos autônomos para realizar sua transposição (VIDAL, 2007; KIDWELL; LISCH, 1997). Por fim, ainda são classificados

em superfamílias e famílias, de acordo com a conservação da sequência de DNA (GONZÁLEZ; PETROV, 2009).

TEs classe I – retrotransposons

Os retrotransposons dependem de uma fase replicativa via RNA para se inserir no genoma. Ou seja, a partir de um RNA inicialmente transcrito e com o auxílio da RT codificada pelo próprio retrotransposon, se faz a fita dupla que então é inserida no genoma. Nesta classe, o RNA codifica as enzimas responsáveis pela transposição ao mesmo tempo em que é usado como molde para a síntese da fita de DNA que é inserida no genoma. (BLAUTH, 2005; REZENDE-TEIXEIRA, 2007). Estes retroelementos são divididos em duas categorias: os que possuem uma longa sequência de repetição terminal (*LTR – long terminal repeat*) e os que não a possuem (*non-LTR – non-long terminal repeat*), sendo estes últimos, ainda subdivididos em LINEs (*long interspersed nuclear elements*) e SINEs (*short interspersed nuclear elements*). (GONZÁLEZ; PETROV, 2009; BIÉMONT; VIEIRA, 2006).

TEs classe II – transposons

Os transposons são elementos que possuem sequências nucleotídicas muito similares nas extremidades (repetições terminais invertidas) com cerca de 31 pb, carregam genes que codificam enzimas capazes de transportá-los (Trp), criam ao se inserir no DNA pequenas duplicações no sítio alvo de inserção (repetições diretas) e existem em cópias múltiplas no genoma hospedeiro. Muitos transposons movem-se através do mecanismo corta-e-cola, onde as extremidades do elemento são desconectadas do DNA por reação de clivagem expondo a extremidade 3'-OH, e essas extremidades são unidas ao DNA alvo por uma reação de transferência, que envolve transesterificações, onde as extremidades 3'-OH atacam diretamente o DNA. Estas reações ocorrem no interior de um complexo nucleoprotéico (CRAIG, 1995).

Os MITEs (*Miniature inverted-repeat transposable elements*), descobertos primeiramente em plantas, são TEs pertencentes a uma família primitiva caracterizada por suas sequências curtas e repetições invertidas terminais ou subterminais (TIRs) flanqueadas por repetições diretas curtas. Sua principal característica, que inicialmente dificultou o entendimento de suas origens e relações filogenéticas, é a ausência de potencial codificador. Entretanto, análises recentes demonstraram que eles estão distribuídos ubiquamente e

possuem relação direta com os transposons (BIÉMONT; VIEIRA, 2006; FESCHOTTE; ZHANG; WESSLER, 2002).

TEs e adaptação biológica

Muitas evidências moleculares vêm demonstrando uma grande quantidade de maneiras pelas quais os TEs podem afetar a adaptação e evolução dos organismos nos quais eles residem (KIDWELL; LISCH, 1997; GONZÁLEZ, et al. 2008; XING, et al. 2009). Sua capacidade de alterar o genoma hospedeiro se dá de diversas maneiras: através da sua inserção em genes ou nos elementos reguladores de genes, podendo alterar potencialmente sua função; podendo provocar rearranjos cromossômicos, contribuindo para o surgimento de novas mutações no genoma; e alterando o controle epigenético. Apesar dos seus efeitos serem em muitos casos neutros devido a grande parte dos saltos serem frequentes nas proximidades dos genes e não inseridos propriamente dentro dos mesmos, a diversidade genética gerada pode ser uma fonte positiva de inovação genética no organismo (BIÉMONT; VIEIRA, 2006).

As inserções de TEs geram uma ampla variedade de mutações que possuem frequentemente efeitos fenotípicos de uma complexidade que não seria possível alcançar com um pequeno número de mutações pontuais. Além disso, a presença de sequências intercaladas repetitivas introduzidas pela atividade do TE, é uma das principais fontes de rearranjos genômicos estruturais, tais como as inversões cromossômicas, deleções, duplicações e translocações. Esta grande capacidade mutagênica dos TEs os torna, portanto, componente chave na função e evolução dos genomas (BIÉMONT; VIEIRA, 2006; GONZÁLEZ; PETROV, 2009).

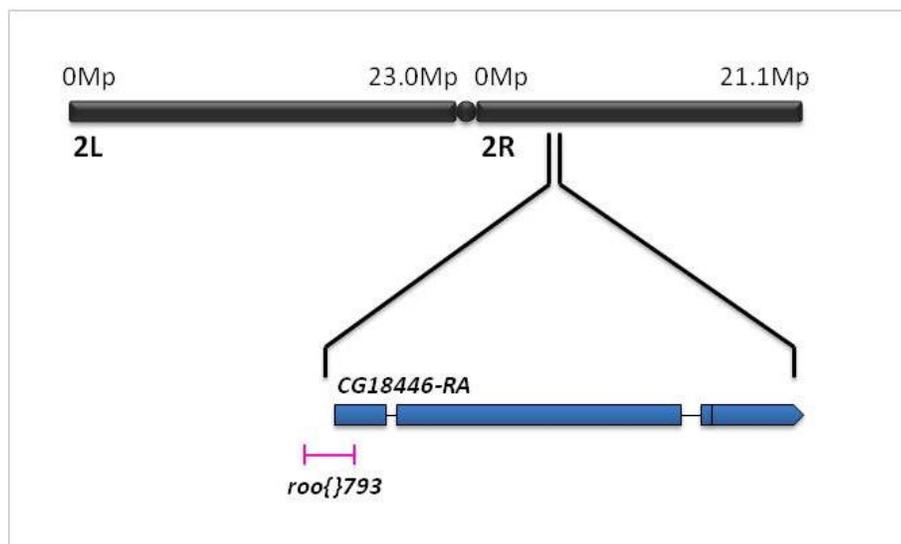
TE roo{1793 e o gene CG18446 em D. melanogaster

O sequenciamento completo do genoma de *D. melanogaster* (Meigen, 1830), popularmente conhecida como mosca-das-frutas, em 2000, simplificou e acelerou significativamente a busca de inserções de TEs relacionados à adaptação. O uso predominante dessa espécie, principalmente em estudos de genética se deve à sua fácil manutenção em laboratório, ciclo de vida curto, descendência de número elevado e cariótipo com apenas quatro pares de cromossomos, três autossomos: 2 (braço 2L e braço 2R), 3 (braço 3L e braço 3R) e 4; e os cromossomos sexuais: X e Y.

A proporção de TEs no genoma de *D. melanogaster* é de 15-22%, e cerca de 50-80% das mutações ocorridas no DNA são devido a essas inserções, isso se deve, provavelmente, às altas taxas de transposição destes elementos nesta espécie (BIÉMONT; VIEIRA, 2006). Além disso, a constatação de que os TEs são componentes de regiões reguladoras e/ou codificadoras de um número surpreendentemente grande de genes em diferentes organismos, levou alguns pesquisadores à análise da associação entre os elementos transponíveis e genes (TE-gene) em diversos estudos sobre adaptação genética. (GONZÁLEZ; PETROV, 2009).

O TE *roo}{793* (Fbti0019985 no banco de dados FlyBase) é um TE pertencente à família *roo*, com um comprimento de 433pb, localizado no cromossomo 2, braço 2R (esquema mostrado na figura 1). Este elemento pertence à classe I, sendo um retrotransposon do tipo LTR com uma longa repetição terminal em sua sequência (FlyBase). Esses elementos caracterizam-se por possuírem *ORFs* para o gene *gag*, para partículas semelhantes a proteínas de estrutura viral e para o gene *pol* (*polymerase*). O gene *pol* codifica as proteínas necessárias para a transposição: proteinase aspártica (AP), RT, RNase H (RH) e integrase (INT) (RUBIN, 2008).

Figura 1. Esquema representando o cromossomo 2, e as posições aproximadas do gene CG18446 e o TE *roo}{793*.



Fonte: Do autor.

O elemento *roo}{793* está na região flanqueadora do gene CG18446, como se observa na figura acima, possuindo 54 nucleotídeos em sua região 5'-UTR. Este fato torna possível a hipótese de que este elemento esteja envolvido na regulação do gene. O gene

CG18446 é um gene codificador de proteína, com 2115pb (Anexo A), que tem como função molecular a ligação iônica de zinco, entretanto, os processos biológicos envolvidos permanecem ainda desconhecidos. O seu pico de expressão é observado entre 4-10 horas do estágio embrionário (FlyBase). Ainda de acordo com o banco de dados Flybase, o único transcrito do gene CG18446 (CG18446-RA) tem sua transcrição iniciada no TE. Dessa forma, o retrotransposon não estaria vinculado à produção de um RNA mensageiro diferente, mas sim associado à criação de um novo padrão de expressão fenotípica ao se inserir na região regulatória deste gene.

Dando sustentação a estes resultados, González et al. (2008) realizaram um estudo de seleção genômica ampla (*GWS - genome-wide screen*) para recentes adaptações induzidas por TEs em *D. melanogaster*. O objetivo do trabalho foi identificar TEs que poderiam ter contribuído para a adaptação da espécie em ambientes fora da África, local de origem da espécie (DAVID; CAPY, 1988; LACHAISE, et al. 1988), principalmente em relação às mudanças climáticas e de temperatura. Dos TEs pesquisados, o TE *roo}{793* apresentou uma alta frequência estando presente em 20,67% das *D. melanogaster* capturadas na Carolina do Norte nos Estados Unidos, cujo clima é temperado, mas na África, local de origem da espécie e possui clima tropical, ele possui uma frequência de somente 2,78%.

Portanto, o foco deste estudo foi analisar a relação TE-gene (*roo}{793*-CG18446), e relacionar a presença e ausência desta inserção sobre a resistência ao frio, uma adaptação que possivelmente aumentou sua frequência com a imigração das populações de *D. melanogaster* para ambientes fora da África.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a possível associação entre seleção térmica de resistência ao frio e a presença do retrotransposon *roo}{793* em *D. melanogaster*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as variações na viabilidade de larvas de *D. melanogaster* em função da temperatura e presença do retrotransposon *roo{}*793 em seu genótipo;
- Estimar as variações no tempo de desenvolvimento de larvas de *D. melanogaster* em função da temperatura e presença do retrotransposon *roo{}*793 em seu genótipo;
- Discutir sobre a presença do elemento *roo{}*793 na composição genética de *D. melanogaster* em diferentes partes do mundo, e seu possível mecanismo na adaptação de populações da espécie após a migração para fora da África.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LINHAGENS, OBTENÇÃO, E MANUTENÇÃO DOS ESTOQUES

As linhagens de *D. melanogaster* utilizadas neste estudo, sua classificação de acordo com a presença ou ausência do elemento móvel *roo{}*793, e sua origem, estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Descrição das linhagens.

Linhagens	TE <i>roo{}</i>793	Origem
RAL-810	Presente (TE+)	Raleigh, Carolina do Norte
RAL-783	Ausente (TE-)	Raleigh, Carolina do Norte

Antes de iniciar os experimentos, as moscas foram mantidas em tubos com meio de cultura (figura 2) e a temperatura constante de 22°C. A cada três dias as moscas eram transferidas a tubos novos e os tubos contendo o meio de cultura com os ovos e larvas eram mantidos até o nascimento de novas moscas.

O procedimento se dava da seguinte maneira: os tubos eram agitados sobre a bancada algumas vezes para que as moscas ficassem na parte inferior do tubo, a rolha de algodão era retirada e rapidamente o tubo era colocado sobre o funil localizado na abertura do novo tubo, fazendo com que as moscas se depositassem no seu interior. Esse processo de amplificação das linhagens foi realizado até que o número suficiente de moscas para a realização dos experimentos fosse atingido.

O meio de cultura é feito com 86,462g de glicose, 115,385g de levedura, 13,615g de ágar e 57,69g de farinha. Primeiramente, a levedura é diluída em 920ml de água deionizada e a solução é aquecida por 15 min em forno micro-ondas. Em uma panela, a glicose, o ágar e a farinha, diluídos em 1L de água deionizada são cozinhados até atingir o ponto de fervura, sempre agitando a mistura com o auxílio de uma batedeira. Quando atinge o ponto de fervura, adiciona-se a mistura de levedura à panela, cozinhando por mais 1 min. Em seguida, o meio é retirado do fogo e, quando atinge 65°C, adiciona-se 8,077ml de ácido propiônico, 2,3g de nipagin e água suficiente para completar 2 litros de meio. O meio, então, é distribuído nos tubos de cultura, que podem ser usados após o resfriamento e solidificação do meio.

Figura 2. Tubos dos estoques com meio de cultura.



Fonte: Do autor.

2.2 COMPROVAÇÃO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO ELEMENTO MÓVEL NAS LINHAGENS

2.2.1 Obtenção do DNA genômico

O DNA genômico das linhagens RAL-810 e RAL-783 foi extraído de 30 fêmeas pela técnica Trizol Extraction DNA (invitrogen™ life technologies). Primeiramente, as moscas foram submetidas a anestesia com gás carbônico (CO₂) e, quando totalmente imóveis, eram dispostas sobre uma placa para sua seleção, que baseou-se na diferença da coloração da extremidade do abdômen, escura em machos e típica de listas claras e escuras em fêmeas. Este processo de seleção é realizado com o auxílio de um microscópio estereoscópico para evitar que a amostra esteja contaminada por ácaros. As moscas selecionadas são colocadas em um microtubo de 1,5mL que permanece a 0°C durante os procedimentos subsequentes. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do Kit Comercial Trizol Extraction DNA (invitrogen™ life technologies).

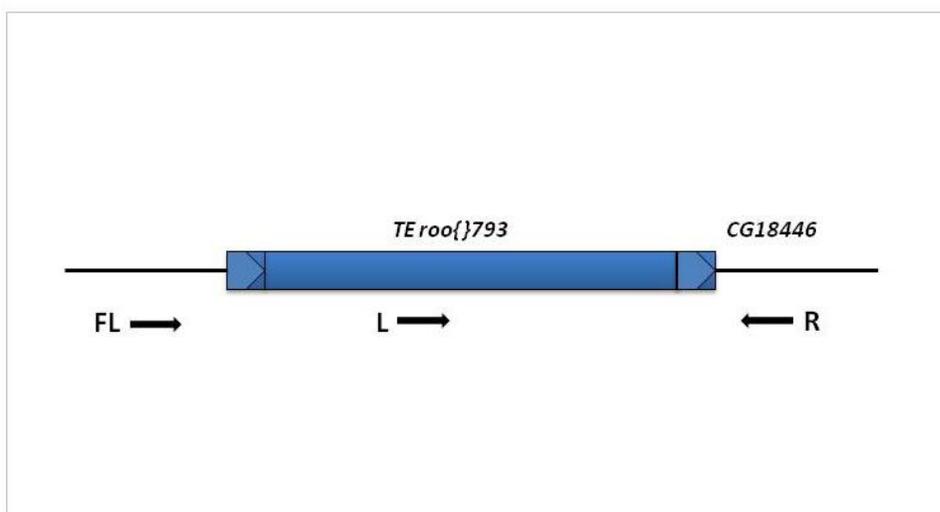
2.2.2 Quantificação do DNA genômico

A fim de verificar a eficiência da extração de DNA genômico, foi realizada a quantificação das amostras utilizando o aparelho NanoDrop ND100 Spectrophotometer.

2.2.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Para verificar a presença ou ausência do elemento móvel nas linhagens RAL-810 e RAL-783, cada amostra de DNA genômico de 0,8µL, com uma diluição prévia em água MilliQ de 1:10, é adicionada à solução I x1: [0,4µL de primer R, 0,4µL de primer L, 5µL de Taq DNA polimerase (invitrogen™ life technologies) e 5µL de água MilliQ para 10,8µL final de reação] e à solução II 1x: [0,4µL de primer R, 0,4µL de primer FL, 5µL de Taq DNA polimerase (invitrogen™ life technologies) e 5µL de água MilliQ para 10,8µL final de reação]. Obtendo, ao final, duas soluções de reação para cada amostra: 810 R-L; 810 FL-R; 783 R-L; 783 FL-R. Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer-BLAST e foram provados quanto à formação de estruturas secundárias e dímeros utilizando o programa Oligo-Analyzer. A figura 3 representa o TE *roo{}793* e a posições dos primers utilizados.

Figura 3. Representação das posições do TE *roo{}793*, gene CG18446, e os primers FL, L e R, desenhados para verificar a presença e ausência do TE nas linhagens RAL-810 e RAL-783.



Fonte: Do autor.

O modelo do termociclador usado foi o BIO-RAD S1000 Thermal Cycler, para microtubos de reação de 0,2mL, e o programa utilizado seguiu as condições: [94°C por 3 min, 28 ciclos [96°C por 10 seg; 65°C por 5 seg; 72°C por 1 min], 4°C ∞. As sequências dos primers e temperaturas de anelamento são mostradas na tabela 2.

O DNA obtido foi analisado em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1x corado com SyberSafe®. O marcador molecular utilizado (Invitrogen™ DNA Ladder) foi de 250pb. A visualização dos resultados nos géis de agarose foram fotografados sob iluminação ultravioleta por uma câmera acoplada. Tendo o elemento móvel 433 pb, espera-se fragmentos

com os seguintes comprimentos: em FL-R sem a presença do elemento móvel 638 pb; em FL-R com a presença do elemento móvel 1066 pb; em R-L com a presença do elemento móvel 616 pb; em R-L sem a presença do elemento móvel não há produto.

Tabela 2. Primers utilizados e temperatura de anelamento.

Primers (Sigma®)	T _m
FL - 5' GGCATCATAAAACCGTTGAACAC 3'	66,1°C
L - 5' AGTCCCTTAGTGGGAGACCACAG 3'	66,5°C
R - 5' CGTAGGATCAGTGGGTGAAAATG 3'	66,3°C

2.2.4 Sequenciamento

Para realizar o protocolo de sequenciamento, 2µL das amostras de DNA genômico com diluição prévia em água MilliQ de 1:10, (obtidas como descreve o item 2.2.1 deste trabalho) são adicionados na seguinte reação de sequenciamento 1x: [1,4µL de BigDye, 1µL de primer de sequenciamento com concentração de 10µM e 5,6µL de água MilliQ para 8µL final da reação].

O modelo do termociclador usado foi o BIO-RAD S1000 Thermal Cycler, para microtubos de reação de 0,2mL, e o programa utilizado seguiu as condições: 94°C por 3 min, 30 ciclos [96°C por 10 seg; 55°C por 5 seg; 60°C por 4 min], 4°C ∞.

Para a purificação dos ddNTPs não incorporados durante a reação de sequenciamento seguiu-se o protocolo subsequente: preparar a solução I de sequência em um tubo de microcentrífuga de 1,5mL 1x: [10µL de reação de sequenciamento e 10µL de água]. Adicionar os 20µL da solução I na solução II 1x: [2µL de EDTA 125mM, 2µL de NaDAc+ 3M e 50µL de etanol 100%]. A solução final de 74µL é mesclada por inversão e permanece por 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a solução durante 20 min a 14000 rpm a 4°C. Cuidadosamente, eliminar o sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta e adicionar 200µL de etanol 70%. Centrifugar novamente durante 2 minutos a 14000 rpm a 4°C. Por fim, eliminar o sobrenadante e secar as amostras com os tubos abertos a 57°C durante 10 minutos. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do sequenciamento, que foi realizado pelo Serviço de Genômica da Universidade Pompeu Fabra (Barcelona). A análise e o alinhamento das sequências foram feitos por meio do Programa Sequencher 4.7.

2.3 ENSAIO FENOTÍPICO

Um modelo experimental fenotípico de resistência ao frio foi desenhado para verificar se há diferença entre as linhagens (TE+/TE-) na viabilidade de moscas após um período de exposição ao frio. Como o gene CG18446 apresenta seu pico de expressão máxima em embriões de 4-10 horas de vida (FlyBase), os experimentos foram realizados com embriões e não com indivíduos adultos.

2.3.1 Meio de ovoposição

O meio de ovoposição é feito com suco de maçã comercial DIA® e 2% de ágar, fervido em forno micro-ondas por aproximadamente 2 minutos, até que esteja completamente translúcido e sem bolhas. Durante o tempo necessário para atingir a fervura, recomenda-se que o frasco seja agitado algumas vezes. Foi adicionado corante azul ao meio, para a melhor visualização dos embriões no momento da coleta. O meio, então, é distribuído em placas de petri de 13mL, atingindo aproximadamente 10mL de meio por placa. Após a solidificação do meio, as placas podem ser armazenadas a 4°C até o momento do uso.

Instantes antes da utilização, as placas devem ser brevemente aquecidas em forno micro-ondas e uma pequena quantidade de fermento biológico é adicionada no meio da placa, a fim de estimular ainda mais a ovoposição.

2.3.2 Ensaio de resistência ao frio

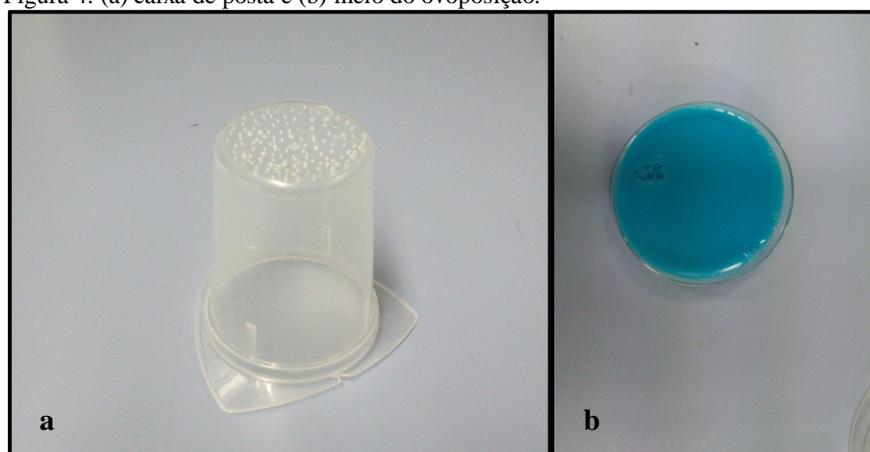
Dois dias antes do experimento, as moscas foram transferidas do meio de cultura para caixas de posta (figura 4, a), sendo colocadas dez caixas por linhagem. Essas 48h de adaptação são necessárias para que haja a acomodação ao novo ambiente. As moscas então permaneceram a 18°C durante as 48h para a aclimação, e também durante todo o restante do protocolo experimental.

No dia da coleta dos embriões, às 12h00min, a placa de ovoposição (figura 4, b) é colocada no lugar da placa com meio de cultura. Para realizar a troca das placas, as moscas são submetidas brevemente a anestesia com gás carbônico (CO₂). Após 4 horas de ovoposição, as placas são retiradas e inicia-se a coleta. Em virtude de a sala de coleta estar a 22°C, quatro tubos são preenchidos com os embriões por vez, e o restante permanecia a 18°C.

A coleta dos embriões é feita com o auxílio de um microscópio estereoscópico e os indivíduos são manipulados cuidadosamente com pincel fino, evitando ao máximo provocar danos em sua integridade física. Os embriões são contados e transferidos das placas para tubos com meio de cultura (feito conforme o item 2.1 deste trabalho), totalizando 50 indivíduos por tubo, oito tubos por linhagem e tratamento (exposição ao frio e controle). Às 20h00min, tendo os embriões entre 4-8 horas de vida, os oito tubos de cada linhagem são transferidos a 1°C (grupo tratado) e os outros oito tubos de cada linhagem permanecem a 18°C (grupo controle). O tempo de exposição ao frio nos grupos tratados é de 14 horas, sendo que, após esse período, os tubos são retirados e mantidos a temperatura de 18°C juntamente com os grupos controles.

Os tubos são monitorados todos os dias e a contagem dos indivíduos nascidos inicia no dia do primeiro nascimento. A cada contagem, as moscas são anestesiadas com gás carbônico (CO₂) e posteriormente mortas em etanol 100%, a fim de evitar erros nas contagens subsequentes.

Figura 4. (a) caixa de posta e (b) meio do ovoposição.



Fonte: Do autor.

2.4 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS

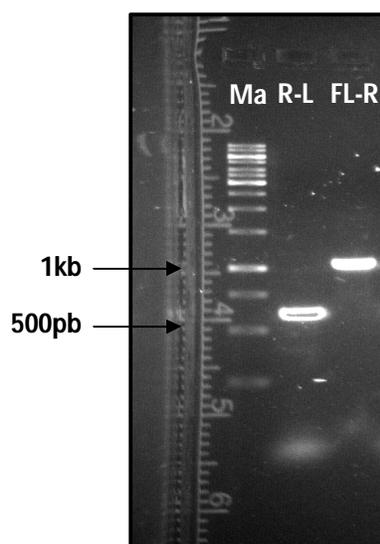
O número dos indivíduos foi obtido por contagem direta. Foi realizado o teste do Qui-Quadrado (χ^2), uma vez que os dados obtidos são dados de frequência exigindo assim um teste estatístico não-paramétrico para sua avaliação. O valor de p foi determinado com o auxílio do programa BioEstat[®] versão 5.3, sendo 0,05 adotado como limite de significância.

3 RESULTADOS

3.1 PRESENÇA E AUSÊNCIA DO ELEMENTO MÓVEL

Na figura 5, observa-se o padrão de amplificação genômica de acordo com o esperado para a linhagem RAL-810, ou seja, com o TE presente no genótipo.

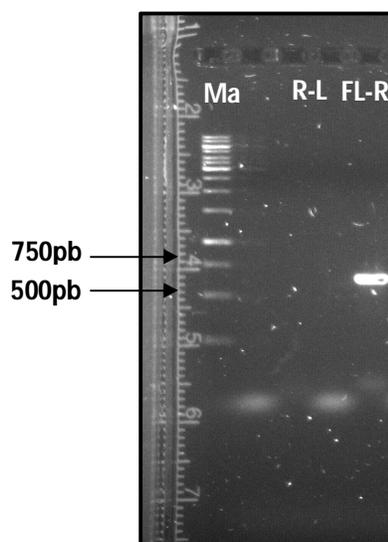
Figura 5. PCR amplificação utilizando os primers FL, L e R e DNA genômico da linhagem RAL-810 de *D. melanogaster*.



Na amostra contendo o conjunto de primers R-L, há um fragmento entre 500 e 750pb, sendo que o esperado quando o TE está presente é de um fragmento de 616pb; já na amostra contendo o conjunto de primers FL-R o fragmento possui pouco mais de 1kb, sendo que o esperado quando o TE está presente é de um fragmento de 1066pb. Portanto, os resultados confirmam a presença do TE *roo{ }793* na linhagem RAL-810 de *D. melanogaster* cultivadas no laboratório.

Na figura 6, observa-se o padrão de amplificação genômica de acordo com o esperado para a linhagem RAL-783, sem a presença do TE em seu genótipo.

Figura 6. PCR amplificação utilizando os primers FL, L e R e DNA genômico da linhagem RAL-783 de *D. melanogaster*.



Em R-L não há formação de produto, o que se espera quando o TE está ausente; já em FL-R há um fragmento entre 500 e 750pb, sendo que o esperado quando o TE está ausente é de um fragmento de 638pb. Portanto, os resultados confirmam que a linhagem RAL-783 de *D. melanogaster* cultivadas no laboratório não possuem o TE *roo}{793* em seu genótipo.

3.2 SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Os fragmentos foram então sequenciados e as sequências caracterizadas e alinhadas. As sequências obtidas são mostradas a seguir.

Sequência obtida da linhagem RAL-810.

```
TCTGATTCTTAAACGTACTTCTAAACAAACGAGAAGACAGCGTAGATCGCATAAATAGAAATGTGTTCACACATGA
ACACGAATATATTTAAAGACTTACAATTTTGGGCTCCGTTTCATATCTTATGTAAATGAATCGAGAGCGATAAATT
ATATTTAGGATTTTGTATCTAAGGCGACATGGGTGCATTGCTCAAAAACATGTAATTTAAGTTGCACACTACAT
GAGTCAGTCACTTGAGATCGTTCCTCCCGCCTCCTAAAATAGTCCCTTAGTGGGAGACCACAGATAAGGTCTCGCC
GCTCAAGATAGGCAGATGTGCCCGAGCGTGGGACCTCGATAAGGCGGGGACTATTTACTTAGGCCTCTGCGTAGG
CCATTTACTTTAAGATGCGATTCTCATGTCACCTATTTAAACCGAAGATATTTCCAAATAAA (A) TCAGTTTCTT
ACAAAAACTCAACGAGTAAAGTCTTCTTATTTGGGATTTTACA#GAATGCGATCGCCTTTTCTCTTTTAGTCCG
CAGAGAAACGTGAGCTGCGCAGTTGTGAGCT
```

Região sombreada - elemento "*roo}{793*", com 434 nucleotídeos.

A - 1º nucleotídeo do elemento "*roo}{793*", localizado a montante do gene (posição -381).

(A) - 1º nucleotídeo do gene CG18446 (posição +1)

3.3.2 Descrição da viabilidade e desenvolvimento em condições normais e de exposição ao frio

A tabela abaixo apresenta os resultados do ensaio, que foi realizado a fim de verificar se a presença ou ausência do TE possivelmente influencia a viabilidade e desenvolvimento das larvas de *D. melanogaster*.

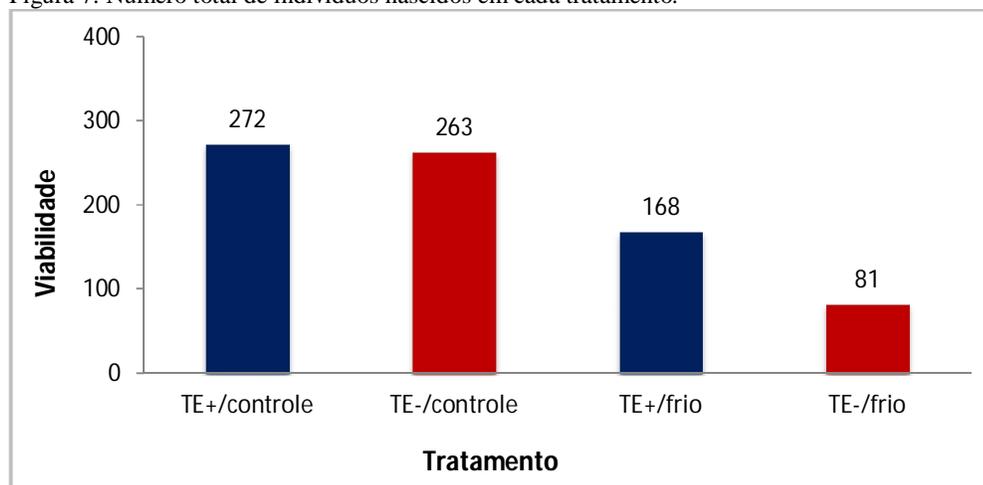
Tabela 3. Número de indivíduos nascidos nos oito tubos de cada tratamento. Os números apresentados em cada contagem (coluna) já estão somados ao saldo anterior.

	Dia 1	Dia 2	Dia 2	Dia 3	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9
	17:30	13:00	20:00	14:00	18:00	13:30	13:30	16:30	14:00	16:00	14:50
T+ C 1	0	13	22	26	32	34	35	36	36	36	36
T+ C 2	0	17	24	26	30	30	32	32	34	35	35
T+ C 3	4	9	18	28	30	31	31	31	32	32	32
T+ C 4	2	14	18	26	26	26	27	27	28	29	30
T+ C 5	0	18	24	35	36	36	36	36	36	36	36
T+ C 6	0	3	3	16	22	31	34	34	35	35	35
T+ C 7	1	3	5	20	23	30	30	30	32	32	32
T+ C 8	0	6	9	31	31	33	34	34	36	36	36
T- C 1	0	4	12	23	25	34	34	35	35	35	35
T- C 2	1	5	11	23	25	27	29	29	30	31	31
T- C 3	2	7	19	27	30	34	34	34	35	35	35
T- C 4	0	4	15	27	31	31	31	31	31	31	31
T- C 5	0	0	4	19	25	25	28	28	28	28	28
T- C 6	0	0	1	9	11	33	38	38	39	40	40
T- C 7	0	0	0	6	9	17	24	29	29	29	29
T- C 8	0	0	1	7	13	24	31	32	32	33	34
TE+ T 1	0	0	0	4	7	16	17	18	18	18	18
TE+ T 2	0	2	2	9	9	23	29	30	30	30	30
TE+ T 3	0	2	5	12	16	18	19	19	20	23	23
TE+ T 4	0	3	3	9	9	14	17	19	19	19	19
TE+ T 5	0	0	1	14	14	19	20	20	21	21	21
TE+ T 6	0	2	6	16	16	19	19	19	20	20	20
TE+ T 7	0	2	3	12	16	19	20	20	20	20	20
TE+ T 8	0	0	5	11	13	14	15	15	16	17	17
TE- T 1	0	0	0	0	0	0	3	9	9	9	9
TE- T 2	0	0	0	0	0	6	10	15	15	15	15
TE- T 3	0	0	0	1	1	6	10	14	14	14	14
TE- T 4	0	0	0	0	0	0	2	8	8	8	8
TE- T 5	0	0	2	8	8	12	13	13	14	14	14
TE- T 6	0	0	0	2	2	4	5	5	5	5	5
TE- T 7	0	0	0	3	3	6	6	6	6	6	6
TE- T 8	0	0	0	3	3	7	10	10	10	10	10

3.3.3 Viabilidade das larvas

Todos os indivíduos nasceram dentro do período de nove dias, como se pode observar na tabela 4. Os números totais de indivíduos nascidos para cada tratamento são mostrados a seguir na figura 7.

Figura 7. Número total de indivíduos nascidos em cada tratamento.



Para verificar se houve diferença na viabilidade das larvas entre os grupos testados, foi realizado o teste χ^2 cujos resultados são os seguintes: a análise geral entre os quatro grupos (TE+/controle; TE-/controle; TE+/frio; TE-/frio) mostra que houve diferença significativa ($\chi^2_{(3)} = 242,836$; $P < 0,0001$) entre a viabilidade das larvas, ou seja, do número total de indivíduos nascidos entre todos os grupos.

Na análise que compara os grupos controles e os grupos expostos ao frio, observa-se uma diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 204,572$; $P < 0,0001$) na viabilidade das larvas. Esse resultado comprova que a temperatura é um fator limitante no desenvolvimento das larvas dessa espécie.

A análise entre os grupos controles (TE+/controle; TE-/controle), mostra que não há diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 0,457$; $P < 0,4990$) na viabilidade das larvas, indicando que, quando não há exposição ao frio, a presença ou ausência do TE no genótipo das linhagens analisadas não influencia na viabilidade das larvas.

Já no teste que comparou os grupos tratados, ou seja, expostos ao frio (TE+/frio; TE-/frio), houve diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 44,134$; $P < 0,0001$) na viabilidade das larvas. Isto é, a linhagem RAL-810 (que possui a inserção) apresentou um número mais elevado de indivíduos nascidos após os embriões serem expostos à temperatura de 1°C por 14 horas.

Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que o elemento de transposição *roo*{793 pode estar contribuindo para a adaptação a temperaturas frias em *D. melanogaster*.

3.3.4 Tempo de desenvolvimento

Além de avaliar se a presença do TE *roo*{793 pode estar contribuindo para adaptação ao frio em *D. melanogaster* através do teste de viabilidade das larvas após submetê-las ao evento estressor, também foi analisado se a presença desta inserção possivelmente altera o tempo de desenvolvimento das larvas. Para isto, o número total de indivíduos nascidos em cada um dos quatro grupos era mensurado a cada contagem.

Foi realizado então o teste χ^2 comparando o tempo de desenvolvimento, entre os dois grupos controles e entre os dois grupos expostos ao frio, cujos resultados são apresentados nas figuras 8 e 9 respectivamente.

Como se pode observar na figura 8 abaixo, temos ao total 272 indivíduos nascidos na linhagem controle RAL-810 (TE+) e 263 indivíduos nascidos na linhagem controle RAL-783 (TE-), não havendo diferença significativa na viabilidade das larvas entre as duas linhagens (como já foi mostrado no teste de viabilidade). Entretanto, de modo interessante, há uma diferença significativa (valores mostrados na tabela 4) no tempo de desenvolvimento das larvas nas linhagens (TE+ e TE-), sendo que a linhagem com o TE presente em seu genótipo, apresenta um número significativamente maior de indivíduos nos dois primeiros dias subsequentes ao primeiro dia de nascimentos, ou seja, as larvas da linhagem RAL-810 (TE+) apresentam uma taxa de desenvolvimento mais acelerada.

Figura 8. Progressão dos nascimentos nas linhagens que não foram expostas ao frio, RAL-810 (TE+) e RAL-783 (TE-), durante os nove dias de desenvolvimento.

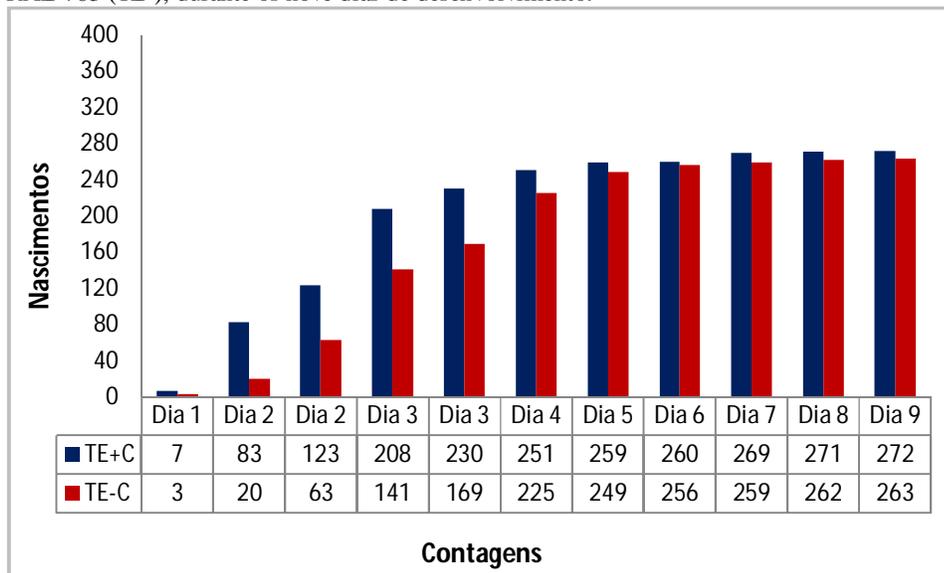


Tabela 4. Valores de X^2 e p obtidos.

Dias	Dia 1	Dia 2	Dia 2	Dia 3	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9
Hora	17:30	13:00	20:00	14:00	18:00	13:30	13:30	16:30	14:00	16:00	14:50
$X^2 =$	1,62	44,228	25,218	22,816	18,605	3,507	0,539	0,087	0,557	0,455	0,457
p =	0,2031	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0,0611	0,4627	0,7676	0,4555	0,4998	0,4990

*Considerado como primeiro dia: aquele em que foi observado o primeiro nascimento, em qualquer um dos grupos (TE+C; TE-C; TE+T; TE-T).

Na figura 9 mostrada abaixo, observamos um total de 168 indivíduos nascidos na linhagem exposta ao frio RAL-810 (TE+) e 81 indivíduos nascidos na linhagem exposta ao frio RAL-783 (TE-), havendo diferença significativa na viabilidade das larvas entre duas linhagens (como já foi mostrado no teste de viabilidade).

Também há uma diferença significativa (valores mostrados na tabela 5) no tempo de desenvolvimento das larvas entre as linhagens TE+ e TE-, sendo que a linhagem com o TE presente em seu genótipo, apresenta uma taxa de desenvolvimento mais elevada durante todo o período dos nascimentos, como já era esperado devido ao fato de que a viabilidade na linhagem TE- foi significativamente menor.

Figura 9. Progressão dos nascimentos nas linhagens expostas ao frio, RAL-810 (TE+) e RAL-783 (TE-), durante os nove dias de desenvolvimento.

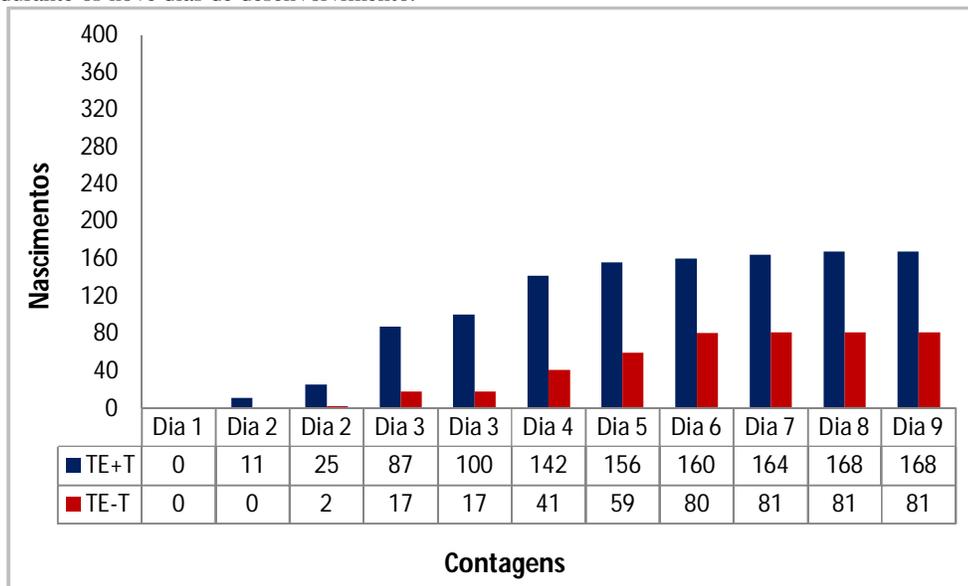


Tabela 5. Valores de X^2 e p obtidos.

Dias	Dia 1	Dia 2	Dia 2	Dia 3	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9
Hora	17:30	13:00	20:00	14:00	18:00	13:30	13:30	16:30	14:00	16:00	14:50
$X^2 =$	0	11,153	20,277	54.156	68.697	42.323	59.487	38.095	40,531	44.134	44.134
p =		0,0008	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

*Considerado como primeiro dia: aquele em que foi observado o primeiro nascimento, em qualquer um dos grupos (TE+C; TE-C; TE+T; TE-T).

Deste modo, podemos afirmar de maneira resumida que nos grupos controles a viabilidade das larvas em ambas as linhagens foi a mesma, ou seja, em condições normais tanto a linhagem TE+ como a linhagem TE- apresentam a mesma taxa de sobrevivência. Porém, em condições normais, a linhagem TE+ apresentou uma taxa de desenvolvimento maior em relação à linhagem TE-. Já nos grupos tratados, ou seja, que foram expostos ao experimento de resistência ao frio, além da taxa de desenvolvimento mais elevada, a linhagem TE+ também apresentou uma maior resistência, tendo um número significativamente maior de indivíduos nascidos ao final do experimento.

4 DISCUSSÃO

A espécie *D. melanogaster* foi descrita primeiramente por Johann Wihelm Meigen em 1830 e existe um consenso de que a mesma é nativa da África tropical (DAVID; CAPY, 1988) e que poderia ter alcançado a Europa há vários milênios atrás, independentemente do transporte humano moderno (LACHAISE, et al. 1988). Assim, a espécie colonizou primeiramente o continente Eurasiático após a última Era Glacial (10.000-15.000 anos atrás), mais tarde irradiando-se pelos continentes Australiano e Americano, provavelmente junto com o tráfico de escravos (LACHAISE, et al. 1988).

Para as espécies ectotérmicas, como *D. melanogaster*, a temperatura é reconhecida como um importante fator ambiental responsável pela abundância de espécies e distribuição geográfica (AYRINHAC, et al. 2004). Tolerar e se adaptar a mudanças ambientais são capacidades cruciais para a persistência das populações (KLOK; CHOWN, 2003), e a temperatura de um ambiente varia de acordo com a hora do dia e a estação, sendo um importante fator que expõe frequentemente as populações naturais a estresse de calor ou frio (GIBBS; PERKINS; MARKOW, 2003).

A *D. melanogaster* é uma espécie cosmopolita, e sua ampla gama geográfica é acompanhada pela variação genética em uma diversidade de traços, os quais, em muitos casos, variam progressivamente com a latitude (DAVID; CAPY, 1988). Este padrão sugere que o clima local e especialmente a temperatura é um fator seletivo. Traços relacionados ao *fitness*, como viabilidade, taxa de desenvolvimento, habilidade competitiva larval, produção de ovos e tolerância ao estresse (calor, frio, dessecação, falta de alimento), foram relacionados a clines latitudinais (HOFFMANN; SORENSEN; LOESCHCKE, 2003).

Um bom exemplo desta variação fenotípica adaptativa, relacionada com a variação progressiva do ambiente, é demonstrada por Gibert et al. (2001), que compararam o tempo de recuperação após a indução do “coma pelo frio” (*chill coma*, em inglês) entre diferentes espécies de *Drosophila*. Como resultado, as espécies que vivem em habitats tropicais são mais sensíveis ao frio e se recuperam mais lentamente, enquanto que espécies de ambientes temperados se recuperam mais rapidamente, ao desenvolverem uma diversidade de mecanismos adaptativos para isto (GRAHAM; WALKER; DAVIES, 2000).

Neste estudo, constatamos que as linhagens de *D. melanogaster* não expostas ao frio mostraram uma sobrevivência significativamente maior em relação às linhagens expostas. Isto reforça o fato de que a temperatura é um fator limitante na sobrevivência e desenvolvimento da espécie. Certamente, segundo Ayrinhac, et al. (2004), a habilidade de

tolerar exposição a baixas temperaturas evoluiu muitas vezes independentemente em *Drosophila*, e muitos estudos buscam um melhor entendimento sobre a base molecular da adaptação e resistência a essa condição. Além disso, a adaptação ao frio visto em populações temperadas pode ser a consequência de uma seleção direcional de longa duração.

Dessa forma, os resultados significativos encontrados nas diferentes linhagens submetidas ao tratamento de exposição ao frio, neste trabalho, fortalecem a hipótese que a associação TE-gene (*roo*{793-CG18446) pode ter sido uma novidade evolutiva que possivelmente possibilitou a adaptação das população *D. melanogaster* após a sua imigração para ambientes fora da África, em climas temperados.

A abundância e a diversidade dos TEs em genomas hospedeiros são relacionadas com a história de vida da espécie. Um exemplo que pode proporcionar a invasão, a proliferação e/ou a ativação de alguns TEs, é a colonização de novos ambientes, em virtude de a espécie encontrar novas condições ambientais, e isto permitir o “despertar” (do inglês: *wake-up*) de alguns TEs (VIEIRA, et al. 1999). Portanto a proliferação e a ativação do TE *roo*{793} seriam esperadas nas linhagens provenientes de climas temperados, e um estudo de expressão gênica em diferentes linhagens expostas a diferentes temperaturas viria a complementar as evidências encontradas neste estudo.

Ainda de acordo com Vieira et al. (1999), populações africanas de *D. melanogaster* abrigam menor quantidade de TEs comparadas às populações dos outros continentes, sugerindo-se que um processo de aquisição e acúmulo de TEs tenha ocorrido após o processo de colonização, através do mecanismo *wake-up*. Além disso, *D. melanogaster* e *D. simulans* constituem um bom modelo para a hipótese do *wake-up*, pois a primeira espécie abriga cerca de três vezes mais TEs do que a segunda, e isso pode ser explicado pelo fato de que, apesar de ambas nativas da África, acredita-se que *D. simulans*, tenha imigrado em um período mais recente que *D. melanogaster* (VIEIRA; BIÉMONT, 1996).

Corroborando os resultados obtidos neste trabalho, Telonis-Scott et al. (2009) em seu estudo sobre a mudança nos níveis de expressão basal em linhas idênticas de *D. melanogaster* após seleção artificial para o aumento da resistência ao frio, encontraram diversos genes com seus níveis de expressão alterados nas linhas selecionadas, em relação ao grupo controle. Dentre os genes listados, está o CG18446, que apresentou seus níveis de expressão aumentados nas linhas de *D. melanogaster* selecionadas para maior resistência ao frio. A lista dos genes diferencialmente expressos, fornecida neste trabalho, aumentou o número de genes candidatos para investigar a variação na tolerância ao frio em populações naturais.

Alguns genes já foram bem caracterizados quanto ao seu papel no mecanismo de resistência a baixas temperaturas, como *Frost*, *Stv*, *Dca* e *regucalcin* (COLINET; FAI-LEE; HOFFMANN, 2010; COLINET; HOFFMANN, 2010; REIS, et al. 2011). Entretanto, estudos que avaliem genes associados à TEs ainda não são encontrados com frequência na literatura, enfatizando, assim, a necessidade de mais estudos sobre o papel dos TEs na adaptação dos organismos ao frio.

O argumento para os estudos pioneiros de genética adaptativa e os TEs, é de que, se uma determinada inserção de um TE havia contribuído para a evolução adaptativa da espécie e/ou população, tal inserção era esperada estar fixada ou presente em altas frequências neste grupo. González et al. (2008) em seu estudo sobre quais os TEs que podem ter contribuído para a adaptação de populações de *D. melanogaster* após ou durante a imigração para ambientes fora da África, encontrou supostas inserções adaptativas que apresentam altas frequência em populações não africanas em contraste com as populações africanas. Neste mesmo estudo, observou-se que o TE *roo}{793* apresenta uma alta frequência estando presente em 20,67% em populações da Carolina do Norte nos Estados Unidos, entretanto possui uma frequência de somente 2,78% em populações africanas, indicando seu possível caráter adaptativo.

Os TEs atuam como geradores de novos alelos e novas redes regulatórias, que constituem as maiores forças que dirigem a diversificação das espécies. Os padrões de expressão transcricional de TEs observados até agora sugerem que esses elementos podem interagir com genes do desenvolvimento ou mesmo estar sob controle de algum destes (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). Portanto, pode-se afirmar que o gene CG18446, estudado neste trabalho, demonstra exatamente isso. Por se expressar entre 4-10h do estágio embrionário, a associação TE-gene pôde ter influenciado adaptativamente no momento em que os indivíduos foram expostos ao frio (1°C durante 14h), afetando dessa forma, todo o desenvolvimento subsequente dos indivíduos.

A inserção de um TE na região codificadora de determinado gene pode levar a alteração da sequência inibindo a geração de produtos gênicos viáveis. Já inserções em regiões promotoras, íntrons, ou regiões não codificadoras de um gene, podem gerar os mais diversos fenótipos, desde alterações regulatórias até a perda completa da função gênica (KIDWELL; LISCH, 2001). Outras evidências de que os TEs podem adquirir funções regulatórias nos genomas vêm da observação de que esses elementos tendem a se agrupar ao redor de genes envolvidos no desenvolvimento e regulação transcricional (LOWE; BEJERANO; HAUSSLER, 2007). Além disso, a localização destes transcritos vem sendo

observada nos mais diversos tecidos e padrões em embriões de *Drosophila*, estando muito representados dentro de sítios preditos como regiões cis-reguladoras (GENTLES, et al. 2007).

As regiões cis-reguladoras são segmentos de DNA que controlam a transcrição gênica. Estas unidades reguladoras, algumas vezes referidas como módulos cis-reguladores (*CRMs – cis-regulatory modules*), podem conter sítios de ligação para diversos fatores de transcrição (*TFBS – transcription factor binding sites*) e normalmente são localizadas antes do sítio de início da transcrição. Segmentos cis-reguladores individuais podem residir dentro de íntrons, em regiões 5' e 3'-UTRs ou mesmo dezenas de kb em qualquer um dos dois lados do gene que regulam (GILBERT, 2003). Mutações nessas regiões podem ter consequências na morfologia, fisiologia e comportamento (WRAY, 2007). No caso deste estudo, como já mencionado, o TE *roo{}793* possui 54 nucleotídeos na região 5'-UTR do gene CG18446, reforçando assim a ideia que este TE possa estar envolvido na regulação gênica e consequentemente provocando alterações fenotípicas adaptativas nas populações que o possuem.

Diferentes estudos demonstram que os saltos de TEs, frequentes nas proximidades de genes, muitas vezes aumentam sua atividade e tornam os indivíduos potenciais a responder às diversas condições de adversidade como calor, umidade, estresse oxidativo e frio (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). Assim, a inserção do retrotransposon *roo{}793* na região flanqueadora do gene CG18446 pode ter aumentado sua frequência através da seleção natural, sendo esta adaptação transmitida de geração em geração em uma frequência alta, média, ou baixa, dependendo do ambiente em que a espécie se encontra em seu local de origem (clima tropical) e após suas imigrações (clima temperado).

5 CONCLUSÃO

- Através da análise do efeito decorrente da exposição ao frio sobre a viabilidade das larvas de *D. melanogaster*, foi possível observar que a baixa temperatura de 1°C durante 14h de exposição afeta significativamente a sobrevivência dos indivíduos. As linhagens não expostas ao frio apresentam uma sobrevivência maior em relação às linhagens expostas. Ou seja, o frio é um fator ambiental importante durante o ciclo de vida da espécie, e populações com indivíduos mais tolerantes a estas mudanças de temperatura apresentam uma maior sobrevivência, e teoricamente chegam à maturidade sexual possibilitando um maior sucesso reprodutivo;

- A inserção do *TE roo{}*793 no genótipo da linhagem RAL-810 não influenciou na viabilidade das larvas quando esta permaneceu a temperatura ambiente, entretanto, quando se comparada a taxa de desenvolvimento das linhagens RAL-810 e RAL-783 que permaneceram à temperatura ambiente, nota-se uma taxa mais acelerada na linhagem RAL-810. Nos dois primeiros dias subsequentes ao primeiro dia de nascimentos, a linhagem com o TE presente apresentou um número significativamente maior de indivíduos nascidos. Este resultado indica que a presença do retrotransposon pode estar beneficiando os indivíduos através de algum mecanismo molecular, mesmo sem a exposição ao frio;

- Nas linhagens que foram expostas ao frio (1°C durante 14h), pôde-se observar que a linhagem com a presença do retrotransposon, RAL-810, apresentou não só uma taxa de desenvolvimento mais acelerada, como também uma viabilidade significativamente maior. Isto indica que *TE roo{}*793 pode estar contribuindo para a adaptação das populações ao frio;

- A análise da expressão gênica de CG18446, o qual pode estar tendo sua atividade afetada pela presença do TE nas populações que o possuem, é um estudo importante para corroborar com os dados apresentados neste estudo, caso a expressão esteja diferencialmente alterada entre linhagens com e sem a presença do retrotransposon expostas a diferentes gradientes de temperaturas.

REFERÊNCIAS

- AYRINHAC, A.; et al. Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: phenotypic plasticity is more important than genetic variability. **Functional Ecology**, v. 18, p. 700-706, 2004.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, n. 5, p. 521-524, 2006.
- BLAUTH, M. L. **Expressão de Elementos Transponíveis em *Drosophila willistoni***. 2005. 168p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.
- COLINET, H.; FAI-LEE, S.; HOFFMANN, A. Functional Characterization of the *Frost* Gene in *Drosophila melanogaster*: Importance for Recovery from Chill Coma. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1-7, 2010.
- COLINET, H.; HOFFMANN, A. Gene and protein expression of *Drosophila* Starvin during cold stress and recovery from chill coma. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 425-428, 2010.
- CRAIG, N. L. Unity in Transposition Reactions. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 253-254, 1995.
- DAVID, J. R.; P. CAPY. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. **Trends in Genetics**, v. 4, n. 4, p.106–111, 1988.
- FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 331-368, 2007.
- FESCHOTTE, C.; ZHANG, X.; WESSLER, S. R. Miniature Inverted-repeat Transposable Elements (MITEs) and their Relationship with Established DNA Transposons. In: CRAIG, N. L. et al. **Mobile DNA II**. Washington: ASM Press, 2002. p. 1147-1158.
- FLYBASE. Base de dados The FlyBase Consortium – A Database of *Drosophila* Genes and Genomes. Cambridge: The FlyBase Consortium. Disponível em:<
<http://flybase.org/>>. Acesso em: 1 mar. 2013.
- GENBANK. Base de dados National Center for Biotechnology Information. Bethesda: GenBank Home - National Center for Biotechnology Information. Disponível em:<
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 5 mar. 2013.
- GENTLES, A. J.; et al. Evolutionary dynamics of transposable elements in the short-tailed opossum *Monodelphis domestica*. **Genome Research**, v. 17, n. 7, p. 992-1004, 2007.
- GIBBS, A. G.; PERKINS, M. C.; MARKOW, T. A. No place to hide: microclimates of Sonoran Desert *Drosophila*. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 353–362, 2003.
- GIBERT, P.; et al. Chill-coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. **Evolution**, v. 55, n. 2, p. 1063-1068, 2001.

GILBERT, S. F. *Biologia do Desenvolvimento*. 5ª Edição. Ribeirão Preto, SP: Editora FUNPEC, 2003. 912 p.

GONZÁLEZ, J.; et al. High Rate of Recent Transposable Element–Induced Adaptation in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Biology**, v. 6, n. 10, p. 2109-2129, 2008.

GONZÁLEZ, J.; PETROV, D. A. The Adaptive Role of Transposable Elements in the *Drosophila* Genome. **Gene**, v. 448, n. 2, p. 124-133, 2009.

GRAHAM, L.; WALKER, V.; DAVIES, P. Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 6452–6468, 2000.

HOFFMANN, A. A.; SORENSEN, J. G.; LOESCHCKE, V. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 175–216, 2003.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, v. 55, n. 1, p. 1-24, 2001.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 15, p. 7704—7711, 1997.

KLOK, C. J.; CHOWN, S. L. Resistance to temperature extremes in sub-Antarctic weevils: interspecific variation, population differentiation and acclimation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 78, p. 401–414, 2003.

LACHAISE, D.; et al. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. **Evolutionary Biology**, v. 22, p. 159–225, 1988.

LORETO, E. L. S.; CARARETO, C. M. A.; CAPY, P. Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. **Heredity**, v. 100, p. 545–554, 2008.

LOWE, C. B.; BEJERANO, G.; HAUSSLER, D. Thousands of human mobile element fragments undergo strong purifying selection near developmental genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 19, p. 8005-8010, 2007.

REIS, M.; et al. A Comparative Study of the Short Term Cold Resistance Response in Distantly Related *Drosophila* Species: The Role of *regucalcin* and *Frost*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

REZENDE-TEIXEIRA, T. **Identificação e caracterização de Elementos de Transposição no genoma de *Rhyncosciara***. 2007. 148f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RUBIN, P. M. **Análise do Elemento Transponível *copia* em Espécies de *Drosophila***. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

TELONIS-SCOTT, M.; et al. Selection for cold resistance alters gene transcript levels in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 549-555, 2009.

VIDAL, N. M. **História Evolutiva dos LTR-retrotransposons *Tom*, 297, 17.6 e *rover* em *Drosophilidae***. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

VIEIRA, C.; BIÉMONT, C. Selection against transposable elements in *D. simulans* and *D. melanogaster*. **Genetics Research**, v. 68, p. 9–15, 1996.

VIEIRA, C.; et al. Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 1251-1255, 1999.

WRAY, G. A. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. **Nature**, v. 8, p. 206-216, 2007.

XING, J. et al. Mobile elements create structural variation: Analysis of a complete human genome. **Genome Research**, v. 19, p. 1516-1526, 2009.

ANEXO A

Sequência do gene CG18446. Aesso GenBank –
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/442623069 - INV 16-JAN-2013

```

1 atcagtttct tacaaaaact caacgagtaa agtettctta tttgggattt tacagaatgc
61 gatcgccttt tcttctttta gtccgcagag aaacgtcgag ctgccgagtt gtgagctggg
121 cgttggaact ttatatttta tttacacata tgtatatatg catatgtact tagatcgagt
181 gtaactgtta aaaagcatgg cgggccacc tagtgaattt aacgtgaaag cgatcctaca
241 gaacagtgtg tatttataat tccaccaacc gaagagtgtc atgggagctg aaagtgatag
301 cgatgtggag atcatagaga cggaaactcat gaaccatcat caccaccatc gccagacgga
361 accaaagagg catcccgcaa agatgtacc gcaaattcca tccgccatac cctccccacc
421 attttcaccc actgatecta cggatagtc gctggccaag gagattctgg ctgcgagtga
481 acatataaat gttcccgaag gaaccgtgct ctgtgttccg tgctacctgt gcaaacagcc
541 cttcaatgat attgaatcct tcaaggagca cctcaccaca catgcccggg aaattaacgc
601 ctggaataac acgctgctgc aggagcagac acctccgccc acgataacac cctttgttca
661 gtccatgaat aaaccattcg tgcattcccac agatcagcac ttatttcatt ccattgatca
721 tgggtgacatg gatcaccatc acaatgcccc ctaccgcaat cggatggagt ttggctgtcc
781 gccaccatg gatTTTTTact caccgcccgt cgaaccagaa attccatttc aaatgcctgc
841 ggttcatcaa catccgattc agataccacc catgtatatg accgctcagc ataccgctta
901 tgagccacca gtgcagtttt taggtcatcg gccactcgaa ctgccccaaa aacttccaat
961 gtcaccgcaa tctcctctgg agccttctgg tcatccaatg gcaagcgcga ttccaagtaa
1021 ccaacatact tcgcttgaag tgcaaaacct ttgtgtgccg gaaggaattc tcacaagggt
1081 ggaggaacca cgggtcttgg aaaatccccg accccaagca caagatccga ttcaggatgc
1141 ggggtcaggg aagtcccgat cggcggttct gatcgaacc aagccccca atgccaaatc
1201 cttggctttc aatcaaggtc agttcgagt caattggtgc ggaagcgat tgagctcccg
1261 ccagtgcctg aatatccagc agagccactt ccacgggaat aaagatctgg ctgtgaatcg
1321 gttagagaag aatttgacca agcagcataa gtgcctcaca tgcaagaaac ctacaagcg
1381 gcggaccttc ctctgatgc acatgaaggt caaacacggg attgctttcc cgggcagagt
1441 aaatgctgat cccgaatac caaaatctgt agattcgct gtatccgca aggttctctgt
1501 ctccccaatg tcgtcgccga acgaggcacc gaaaaaggag atatggagca cacgaatatt
1561 caacgctgtg gcggcagcaa agtatcaacc ggccagcgag cgggcccaga agtatctggt
1621 tgcgccacgt cagcaaaccg agcagttgga atcgggtttt acgatcacgt ccaaaccggac
1681 atatccactt cgttcgccct acttcaatcc ggatctatgg ctggactgcg attcatactt
1741 ataggttgaa cttggctgga ttttaagaag cttggggtat caaatattcg agctaataag
1801 atagccaata gcgcccttgt tatttttact tataaaat cacttcgctt catggagctt
1861 ctgactatgt acgatgtaca tacataatag catggataca tatcgactc gcaagcgatt
1921 tattctgtag cctcagcact ttggatctgg atctcgact cgaagtecca aagccccaaa
1981 cttctgtgca taataaagaa actaaaaacg ctgagcattg caatacatt taagcactcg
2041 gacgtcaaaa tctgtccggt tctgtcataa gttttgtaca taaaatggaa ataaagaaac
2101 gcccaagcaa aacc

```

Sequência em azul – segmento do retrotransposon *roo{793}* inserido no gene;

Sequência em marrom – região codificadora do gene CG18446.