

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Expressão de hsp70 e hsp83 no desenvolvimento  
de *Drosophila* em resposta ao estresse químico  
causado por disseleneto de difenila e paraquat**

**RONALDO MEDEIROS GOLOMBIESKI**

Tese submetida ao  
Programa de Pós-  
Graduação em Genética e  
Biologia Molecular da  
UFRGS como requisito  
parcial para a obtenção do  
grau de Doutor em  
Ciências

**Prof. Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky**  
Orientadora

**Prof. Dr. Élgion Lúcio da Silva Loreto**  
Co-orientador

**Porto Alegre, Janeiro de 2008.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Expressão de hsp70 e de hsp83 no  
desenvolvimento de *Drosophila* em resposta ao  
estresse químico causado por disseleneto de  
difenila e paraquat**

**RONALDO MEDEIROS GOLOMBIESKI**

**Prof. Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky**  
Orientadora

**Prof. Dr. Élgion Lúcio da Silva Loreto**  
Co-orientador

**Porto Alegre, Janeiro de 2008.**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de *Drosophila* do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Biologia Molecular de *Drosophila* – *LabDros* da Universidade Federal de Santa Maria e no Laboratório de Genomas e Populações de Plantas do Centro de Biotecnologia da UFRGS, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela FAPERGS.

Dedico este trabalho a minha esposa Jaqueline.

Dedico também a minha mãe Irma, minha irmã Renata, meu cunhado Sérgio e minha sobrinha amada Geórgia!!!

Aos meus tios Antônio e Erci pelos anos de dedicação prestados.

E ainda aos meus sogros Nelson e Salete Ineu que estiveram sempre ao meu lado me apoiando em tudo.

## **Agradecimentos**

A minha orientadora professora Vera Valente pela oportunidade concedida de aprimorar meus conhecimentos, bem como pela excelente orientação, amizade e carinho prestados durante este período.

Ao professor Élgion Lúcio da Silva Loreto do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), atualmente meu co-orientador, meu incentivador desde o início de minha graduação em 1996. Professor: o senhor sabe que não tenho palavras para agradecer sua orientação, amizade, paciência e participação em grande parte dos momentos da minha formação, além da dedicação prestada e das facilidades concedidas para a realização de parte deste trabalho no Laboratório de *Drosophila*. Aproveito também para agradecer a Profa. Lenira Sepel, sua esposa, pela grande amizade e por tudo que fez por mim na UFSM.

Ao Departamento de Genética, do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela acolhida e oportunidade.

Agradeço a todos os colegas do Programa de Pós-Graduação, especialmente a Daniel Garcia, Daniel Graichen, Gustavo, Nicolas, Ernesto, Adriano e principalmente aos colegas do Laboratório de *Drosophila*: Fabiano, Adri Sassi, Mary, Lizandra, Maríndia, Luis, Mônica, Marco, Ana, Adriana Ludwig, Hermes, Jonas, Juliana Cordeiro, Rosane, Sabrina, Grazia. Aos funcionários da

*Drosophila*, Berenice, Marcelo, Dani e D. Jane. Um especial abraço para o Andrés Cañedo, grande amigo e pesquisador. Amigos: “eu consegui!!!!”.

Fabiano Torres, muito obrigado por fazer dos teus amigos, os meus amigos. Valeu pelas conversas, pelas risadas, pela convivência, por dividir apartamento, por me fazer sair de casa. Agora sou um pouco mais sociável. Obrigado pela amizade “cabeça”.

Adri Sassi e Mary, obrigado pela amizade, pela alegria de vocês, pelas muitas conversas e risadas, fica a saudade.

Lizandra Robe e Maríndia Deprá, obrigado pela amizade de longa data, pelas ajudas, pela força, pelas conversas, pela tolerância. Já temos uns anos de histórias juntos.

Também aqueles que não foram colegas de PPG, mas grandes amigos como Paulo Marcos Pinto, Newton Vidal, Marcos Carvalho. Ao Paulo, obrigado pela tolerância quando dividimos apartamento, pela amizade de muito tempo, por me ajudar muitas vezes.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFRGS. A professora Sídia Callegari-Jacques pelo auxílio na parte estatística para o cumprimento deste trabalho.

Aos funcionários o Departamento, especialmente ao Elmo e Ellen pela amizade e boa vontade de sempre em me ajudar.

Aos amigos e colegas do Laboratório de *Drosophila* da UFSM, “*LabDros*”: Paloma, Felipe, Gabriel, Mauro, Brenda, Ana Lúcia, Karina, Bruna, Francis, Felipe Ten Caten, Josmael, Camila, Ana, Nina vocês são “jóias”, excelente grupo, continuem unidos.

A minha esposa Jaqueline, muito obrigado pelo apoio, pela compreensão, pelo carinho, simplesmente por tudo.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico) pela bolsa de estudos concedida, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

A todas aquelas pessoas (familiares, amigos, colegas, professores e conhecidos) que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e não foram aqui nominados.

## RESUMO

### EXPRESSÃO DE Hsp70 E DE 83 NO DESENVOLVIMENTO DE *Drosophila* EM RESPOSTA AO ESTRESSE QUÍMICO CAUSADO POR DISSELENETO DE DIFENILA E PARAQUAT

Visando contribuir para o conhecimento da dinâmica do estresse celular por agentes químicos e físicos e suas possíveis implicações sobre a mobilização de elementos transponíveis presentes em *Drosophila*, foram realizadas diferentes abordagens experimentais utilizando a espécie cosmopolita *Drosophila melanogaster*, e as espécies neotropicais do subgrupo *willistoni*, *D. willistoni* (três linhagens) *D. equinoxialis*, *D. paulistorum*, *D. insularis* e *D. tropicalis*. Foi verificado o efeito tóxico de disseleneto de difenila ((PhSe)<sub>2</sub>) durante diferentes estágios do ciclo de vida da *Drosophila melanogaster* e das espécies do subgrupo *willistoni*. Em *D. melanogaster*, as moscas adultas foram mais resistentes a intoxicação por (PhSe)<sub>2</sub> do que larvas e pupas. De uma maneira geral as espécies do subgrupo *willistoni* são mais sensíveis à intoxicação por selênio do que a *D. melanogaster*, possivelmente explicado e de acordo com a recentemente demonstrada ausência de homologia de genes para selenoproteínas no genoma de *D. willistoni* com todas as onze outras espécies sequenciadas. O potencial do selênio para promover estresse celular em *D. melanogaster* foi evidenciado através da transcrição do gene *hsp83* por *Northern blot*. Nas espécies do subgrupo *willistoni* a expressão deste gene e do *hsp70* foi abordada através de *Real Time PCR* em resposta ao selênio e ao paraquat, que igualmente foi mais tóxico nos estágios iniciais de desenvolvimento. Os resultados da expressão dos genes de estresse, entretanto, não foram conclusivos, bem como a procura da transposase do elemento *P* em resposta aos tratamentos. Apesar disso foram estabelecidas às condições experimentais para a realização de experimentos futuros.

Palavras-chaves: *Drosophila melanogaster*, *D. willistoni*, disseleneto de difenila, paraquat, estresse celular, desenvolvimento, proteínas de choque térmico.



**ABSTRACT**  
**Hsp70 and 83 EXPRESSION IN *Drosophila* DEVELOPMENT IN RESPONSE**  
**TO CHEMICAL STRESS CAUSED BY DIPHENYL DISELENIDE AND**  
**PARAQUAT**

Aiming to contribute to the knowledge of the dynamics of cell stress caused by chemical and physical agents and the likely implications thereof in the mobilization of transposable elements present in *Drosophila*, different experimental approaches were adopted using the cosmopolitan species *Drosophila melanogaster* and the Neotropical species of the *willistoni* subgroup, *D. willistoni* (three strains), *D. equinoxialis*, *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. insularis* and *D. tropicalis*. The toxic effect of diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>] was observed in the different life cycles of *Drosophila melanogaster* and of the species of the *willistoni* subgroup. *D. melanogaster* adult flies were more resistant to intoxication by (PhSe)<sub>2</sub> as compared to larvae and pupae. Generally speaking the species belonging to the *willistoni* subgroup are more sensitive to intoxication by selenium as compared to *D. melanogaster*, which is possibly explained and in accordance to the recently demonstrated absence of gene homology of selenoproteins in the *D. willistoni* genome with all that of the other eleven species sequenced. The evidence of the potential exhibited by selenium to promote cell stress in *D. melanogaster* is shown by the *hsp83* gene transcription analyzed by Northern blot. In the species of the *willistoni* subgroup, the expression of the *hsp83* and of the *hsp70* genes was analyzed by Real Time PCR in response to selenium and paraquat, which was equally more toxic in the early development stages. Nevertheless, the results of the stress gene expression were inconclusive, as well as the search for *P* element transposase in response to treatments. In spite of that, the experimental conditions required for future research have been established.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *D. willistoni*, diphenyl diselenide, paraquat, cellular stress, development, Heat shock protein

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Abreviaturas, símbolos e unidades</b> .....	xiii
<b>Lista de figuras</b> .....	xv
<b>Lista de tabelas</b> .....	xviii
<b>Capítulo I – Introdução Geral</b> .....	1
I.1 – Subgrupo da <i>Drosophila willistoni</i> .....	2
I.2 – Adaptação às variações climáticas .....	4
I.3 – Proteínas de choque térmico.....	8
I.3.1 – Hsp27.....	10
I.3.2 – Hsp60.....	11
I.3.3 – Hsp70.....	12
I.3.4 – Hsp90.....	13
I.4 – Elementos transponíveis e estresse.....	14
<b>Objetivos</b> .....	17
Objetivos gerais.....	17
Objetivos específicos.....	17
<b>Capítulo II – Over-activation of the <i>Drosophila melanogaster hsp83</i> gene by selenium intoxication</b> .....	18
<b>Capítulo III – Parâmetros do desenvolvimento de moscas do subgrupo <i>willistoni</i> de <i>Drosophila</i> em condição de estresse químico</b> .....	43

III.1. -- Introdução.....	44
III.1.1 – Proteínas de Choque Térmico.....	46
III.2 – Material e métodos.....	50
III.2.1 – Estoques de <i>Drosophila</i> .....	50
III.2.1.1) Indução de estresses químicos.....	50
III.2.2 – Determinação da viabilidade das espécies em diferentes concentrações dos agentes químicos.....	51
4.2.2.1. Meios de cultura.....	51
III.2.3 – Desenvolvimento dos ovos de <i>Drosophila</i> em meios de cultura.....	51
III.2.4 – Análise estatística.....	52
III.2.5 – Análise molecular das expressões dos Genes das Proteínas de Choque térmico e Elemento transponível <i>P</i> por PCR em Tempo Real.....	52
III.2.5.1 – Oligonucleotídeos para a reação de PCR em tempo Real.....	53
III.2.6 – Extração de RNA total.....	53
III.2.7 – Análise eletroforética dos RNAs.....	54
III.2.8 – Síntese de DNA complementar.....	54
III.2.9 – Quantificação das expressões gênicas por <i>Real Time PCR</i>	55
III.3 – Resultados sobre o desenvolvimento do subgrupo <i>willistoni</i> de <i>Drosophila</i> .....	56
III.3.1 – Efeito de concentrações variadas de disseleneto de difenila sobre os diferentes estágios de desenvolvimento das espécies do subgrupo <i>willistoni</i> .....	56
III.3.2 – Efeito de concentrações variadas de paraquat sobre os diferentes estágios de desenvolvimento das espécies do subgrupo <i>willistoni</i> .....	57
III.4 – Resultados sobre a expressão de Hsp70 e Hsp83 nos mutantes <i>Sepia</i> e <i>white</i> de <i>Drosophila willistoni</i> .....	87
III.4.1 – Estudo da expressão gênica dos genes de hsp70 e hsp83 em mutantes <i>Sepia</i> e <i>white</i> de <i>D. willistoni</i> .....	87

III.5 – Discussão, Conclusões e Perspectivas.....	118
<b>IV– Referências bibliográficas.....</b>	<b>122</b>

## Abreviaturas, símbolos e unidades

(PhSe) <sub>2</sub>	Disseleneto de difenila
18S	RNA ribossomal 18S
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
H <sub>2</sub> O DEPC	Água com Dietilpirrocarbonato
HSP	Heat Shock Proteins
<i>hsp70</i>	Gene da Hsp70
Hsp70	Proteína de choque térmico com 70KDa
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
M	Molar
mg	miligramas
mim	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
mmol	milimol

mRNA	RNA mensageiro
°C	Graus Celsius
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação de polimerização em cadeia)
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
tRNA	RNA transportador
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## Lista de figuras

### Capítulo II - Over-activation of the *Drosophila melanogaster hsp83* gene by selenium intoxication.

FIGURE 1– Diphenyl diselenide molarity and <i>Drosophila melanogaster</i> viability and developmental delay curves for the egg to pupa stage.....	39
FIGURE 2 – Diphenyl diselenide molarity and <i>Drosophila melanogaster</i> viability and developmental delay curves for the pupa to adult stage .....	40
FIGURE 3 - Diphenyl diselenide molarities and <i>Drosophila melanogaster</i> adult survival curves.....	41
FIGURE 4– Northern blot results.....	42

### Capítulo III – Parâmetros do desenvolvimento de moscas do subgrupo *willistoni* de *Drosophila* em condição de estresse químico

Figura 1 – Desenvolvimento de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> .....	59
Figura 2 – Desenvolvimento de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de paraquat.....	61
Figura 3 – Desenvolvimento do mutante <i>Sepia</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> .....	63
Figura 4 – Desenvolvimento do mutante <i>Sepia</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de paraquat.....	65
Figura 5 – Desenvolvimento do mutante <i>white</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> .....	67
Figura 6 – Desenvolvimento do mutante <i>white</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de Paraquat.....	69
Figura 7 – Desenvolvimento de <i>D. equinoxialis</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> .....	71
Figura 8 – Desenvolvimento de <i>D. equinoxialis</i> em diferentes concentrações de paraquat.....	73
Figura 9 – Desenvolvimento de <i>D. insularis</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> .....	75

Figura 10 – Desenvolvimento de <i>D. insularis</i> em diferentes concentrações de paraquat.....	77
Figura 11 – Desenvolvimento de <i>D. paulistorum</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> .....	79
Figura 12 – Desenvolvimento de <i>D. paulistorum</i> em diferentes concentrações de paraquat.....	81
Figura 13 – Desenvolvimento de <i>D. tropicalis</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> .....	83
Figura 14 – Desenvolvimento de <i>D. tropicalis</i> em diferentes concentrações de Paraquat.....	85

**Resultados sobre a expressão de Hsp70 e Hsp83 nos mutantes *Sepia e white de Drosophila willistoni***

Figura 1 – <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de $\beta$ -Actina para <i>D. willistoni Sepia</i> em Larvas.....	89
Figura 2 – <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de $\beta$ -Actina para <i>D. willistoni white</i> em Larvas.....	91
Figura 3 – <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de Tubulina para <i>D. willistoni Sepia</i> em Larvas.....	93
Figura 4 – <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de Tubulina para <i>D. willistoni white</i> em Larvas.....	96
Figura 5 – <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de <i>hsp70</i> para <i>D. willistoni Sepia</i> em Larvas.....	97
Figura 6 – <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de <i>hsp70</i> para <i>D. willistoni white</i> em Larvas.....	98
Figura 7 – <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de <i>hsp83</i> para <i>D. willistoni Sepia</i> em Larvas.....	101
Figura 8 – <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de <i>hsp83</i> para <i>D. willistoni white</i> em Larvas.....	102
Figura 9 – <i>Real Time PCR</i> , Amplificação do cDNA do elemento transponível <i>P</i> em Larvas.....	105
Figura 10 – Representação logarítmica da expressão de <i>hsp70</i> .....	106



Figura 11 - Representação logarítmica da expressão de <i>hsp83</i> .....	108
Figura 12 - <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de $\beta$ -Actina para <i>D. willistoni Sepia</i> em Gônadas.....	111
Figura 13 - <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de $\beta$ -Actina para <i>D. willistoni white</i> em Gônadas.....	112
Figura 14 - <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de Tubulina para <i>D. willistoni Sepia</i> em Gônadas.....	115
Figura 15 - <i>Real Time PCR</i> , Curvas de amplificação do cDNA de Tubulina para <i>D. willistoni white</i> em Gônadas.....	116
Figura 16 - <i>Real Time PCR</i> , Amplificação do cDNA do elemento transponível <i>P</i> em Gônadas.....	117

## Lista de Tabelas

### Capítulo II - Over-activation of the *Drosophila melanogaster hsp83* gene by selenium intoxication

Table 1 – Pairwise chi-squared ( $\chi^2$ ) comparisons of the <i>D. melanogaster</i> egg to pupae developmental rate for flies.....	36
Table 2 – Pairwise chi-squared ( $\chi^2$ ) comparisons of the <i>D. melanogaster</i> pupae to adult developmental rate for flies.....	37
Table 3 – Pairwise chi-squared ( $\chi^2$ ) comparisons of <i>D. melanogaster</i> adult lifespan for flies	38

### Capítulo III – Parâmetros do desenvolvimento de moscas do subgrupo *willistoni* de *Drosophila* em condição de estresse químico

Tabela 1 – Análise da Sobrevivência de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.....	60
Tabela 2 – Análise da Sobrevivência de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.....	60
Tabela 3 – Análise da Sobrevivência de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.....	62
Tabela 4 – Análise da Sobrevivência de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.....	62
Tabela 5 – Análise da Sobrevivência do mutante <i>Sepia</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa	64
Tabela 6 – Análise da Sobrevivência do mutante <i>Sepia</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.....	64
Tabela 7 – Análise da Sobrevivência do mutante <i>Sepia</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.....	66
Tabela 8 – Análise da Sobrevivência do mutante <i>Sepia</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.....	66
Tabela 9 – Análise da Sobrevivência do mutante <i>white</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.....	68
Tabela 10 – Análise da Sobrevivência do mutante <i>white</i> de <i>D. willistoni</i> em	

diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.....	68
Tabela 11 – Análise da Sobrevivência do mutante <i>white</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.....	70
Tabela 12 – Análise da Sobrevivência do mutante <i>white</i> de <i>D. willistoni</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.....	70
Tabela 13 – Análise da Sobrevivência de <i>D. equinoxialis</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.....	72
Tabela 14 – Análise da Sobrevivência de <i>D. equinoxialis</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.....	72
Tabela 15 – Análise da Sobrevivência de <i>D. equinoxialis</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.....	74
Tabela 16 – Análise da Sobrevivência de <i>D. equinoxialis</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.....	74
Tabela 17 – Análise da Sobrevivência de <i>D. insularis</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.....	76
Tabela 18 – Análise da Sobrevivência de <i>D. insularis</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.....	76
Tabela 19 – Análise da Sobrevivência de <i>D. insularis</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.....	78
Tabela 20 – Análise da Sobrevivência de <i>D. insularis</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.....	78
Tabela 21 – Análise da Sobrevivência de <i>D. paulistorum</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.....	80
Tabela 22 – Análise da Sobrevivência de <i>D. paulistorum</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.....	80
Tabela 23 – Análise da Sobrevivência de <i>D. paulistorum</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.....	82
Tabela 24 – Análise da Sobrevivência de <i>D. paulistorum</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.....	82
Tabela 25 – Análise da Sobrevivência de <i>D. tropicalis</i> em diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.....	84
Tabela 26 – Análise da Sobrevivência de <i>D. tropicalis</i> em diferentes	

concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.....	84
Tabela 27 – Análise da Sobrevivência de <i>D. tropicalis</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.....	86
Tabela 28 – Análise da Sobrevivência de <i>D. tropicalis</i> em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.....	86
<b>III.4. Resultados sobre a expressão de Hsp70 e Hsp83 nos mutantes <i>Sepia</i> e <i>white</i> de <i>Drosophila willistoni</i></b>	
<b>III.4.1. Estudo da expressão gênica dos genes de hsp70 e hsp83 em mutantes <i>Sepia</i> e <i>white</i> de <i>D. willistoni</i></b>	
Tabela 1 - Valores médios da expressão de <i>hsp70</i> em relação aos genes constitutivos obtidos nos tratamentos.....	107
Tabela 2 - Valores médios da expressão de <i>hsp83</i> em relação aos genes constitutivos obtidos nos tratamentos.....	109

# Capítulo I

## Introdução Geral

No início do século XX Thomas Morgan identificou a mutação *white* que altera a pigmentação do olho da mosca *Drosophila* (Bier, 2005). Desde então, estudos com *Drosophila melanogaster* têm levado à elucidação de muitos processos biológicos básicos desta e de outras espécies, inclusive o homem.

*Drosophila*, conhecida comumente como mosca das frutas, é um modelo de fundamental importância para o exame de problemas biológicos, especificamente genética, genômica, e evolução bem como taxonomia, desenvolvimento e neurobiologia (Rubin e Lewis, 2000; Tickoo e Russell, 2002; Bier, 2005). No ano de 2007, *Drosophila* foi o organismo modelo mais pesquisado nos bancos de dados da internet (Gunter *et al.*, 2007).

O gênero *Drosophila* compreende mais de 1.700 espécies (Bächli, 2006) de moscas pequenas, distribuídas praticamente em todas as regiões do mundo. A maioria delas se alimenta de microrganismos presentes em fungos e em vegetais em decomposição. Algumas espécies são mais restritas ecologicamente, utilizando como sítio de desenvolvimento e reprodução somente uma espécie hospedeira; outras são mais versáteis, podendo utilizar uma variada gama de recursos em diferentes fungos e/ou plantas. Por estes motivos, na coleta de Drosophilidae, geralmente são usadas armadilhas com iscas de frutas fermentadas (revisão em Carson, 1971).

Para explorar tão ampla gama de ambientes e substratos, os drosofilídeos e as espécies de *Drosophila*, em particular, devem ter evoluído sistemas intrínsecos de manutenção da homeostasia muito eficientes. Neste contexto, as espécies Neotropicais, como as do grupo *willistoni* de *Drosophila* são um bom modelo, uma vez que muitas delas se distribuem desde o sul da América do Norte até o Norte da Argentina, na América do Sul (Spassky *et al.*, 1971). A cosmopolita *Drosophila melanogaster*, por sua vez, devido à sua história evolutiva, acompanhando as migrações humanas, também é um excelente modelo, sendo

encontrada associada às habitações localizadas em todo o globo terrestre e em todos os tipos de clima, exceto nas regiões polares.

### **I.1. Subgrupo da *Drosophila willistoni***

O subgrupo da *D. willistoni* taxonomicamente é composto por seis espécies crípticas, conforme a classificação a seguir (Ehrman e Powell, 1982):

Phylum: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordem: Diptera

Família: Drosophilidae

Gênero: *Drosophila*

Subgênero: *Sophophora*

Grupo: *willistoni*

Subgrupo: *willistoni*

O grupo *willistoni* de *Drosophila* vem sendo estudado intensamente desde a década de 1940, contribuindo significativamente para a teoria evolucionária. O grupo *willistoni* pertence ao subgênero *Sophophora*, que abrange 25 espécies neotropicais (Throckmorton, 1975). Fazem parte do grupo *willistoni* seis espécies crípticas, *D. willistoni*, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis*, *D. pavlovskiana* e *D. paulistorum*, que são virtualmente indistinguíveis morfologicamente (Ehrman e Powell, 1982; Grimaldi, 1990; Cordeiro e Winge, 1995; Gleason *et al.*, 1998). Devido à sua ampla distribuição geográfica, espécies deste grupo ocupam os mais variados ambientes, onde estão sujeitas a grandes variações de temperatura.

A maneira como as condições ambientais (e em especial a temperatura) afeta os processos de desenvolvimento e a estabilidade genômica dessas espécies ainda é pouco conhecida. Trabalhos feitos em nosso grupo de pesquisa na UFRGS vêm tentando suprir esta lacuna. Assim, a ocorrência de um fenômeno de atrofia gonadal dependente de temperatura foi estabelecida por Regner *et al.*, (1999) e por Klein (2002) que mostra alguma similaridade com o encontrado em *D. melanogaster* e cujos agentes são elementos transponíveis (Kidwell, 1983; Klein *et al.*, 1999).

Bonorino *et al.*, (1993 a, b) caracterizaram pela primeira vez, a resposta a estresse térmico e à anoxia no grupo *willistoni* de *Drosophila*, bem como mapearam *in situ* o gene da Hsp70 nessas espécies, enquanto Rieger (1999) localizou, entre outros, os genes *Hsp83*, *Hsp27*, *Hsr-ômega* e *Ubi*, envolvidos na resposta ao choque térmico e a outros estresses. Saavedra (1999) observou diferenças significativas na longevidade e em taxas de mortalidade idade-específicas, de *Drosophila willistoni* relacionadas com a procedência (regiões de inverno frio, como Bento Gonçalves e de inverno quente, como o Parque do Turvo, no Rio Grande do Sul) das populações que originaram os estoques estudados em laboratório, sugerindo a ação da seleção natural operando diferencialmente sobre os genomas na natureza. Esta autora também comparou os perfis de proteínas de estresse por eletroforese bi-dimensional de indivíduos de diferentes faixas etárias e sugeriu que as reduções nas taxas de síntese protéica relacionadas com a idade dos indivíduos, possam ser moduladas conforme o ambiente original das populações seja frio ou quente.

Blauth (2005) estabeleceu as fases do desenvolvimento embrionário de *Drosophila willistoni*, comparativamente com as de *D. melanogaster* (Fullilove e Jacobson, 1978) bem como detectou a presença de transcritos senso e antisenso do elemento *P* em diferentes fases do desenvolvimento embrionário de *D. willistoni*, sugerindo um mecanismo adicional de controle da mobilização deste elemento transponível. Finalmente, a ocorrência de hipermutabilidade, sob efeito de estresse térmico em *Drosophila willistoni* foi recentemente detectada por D'Ávila *et al* (2008) sugerindo que o choque de calor seja capaz de mobilizar transposição da fração móvel do genoma.

Até o estudo de Blauth (2005) e Blauth *et al.* (2008), o desenvolvimento embrionário de *Drosophila willistoni* era desconhecido, tomando-se sempre como padrão, o de *Drosophila melanogaster*. Nesta espécie, o desenvolvimento embrionário inicia-se quando o zigoto sofre sete ciclos de divisão em um citoplasma comum, formando o sincício e após várias divisões o embrião atinge o estágio chamado de blastoderma sincicial. Depois de sofrerem nove ciclos de divisões, alguns núcleos do embrião migram para a superfície do ovo e outros concentram-se na região terminal (pólo posterior), quando, então, se diferenciam

em células polares. As células polares começam a síntese protéica bem mais cedo do que as demais células do embrião, duplicando-se mais duas vezes. Algumas das células polares se tornarão células germinativas definitivas, enquanto outras migram, retornando à região central do embrião. Quando os núcleos estão na periferia do ovo, as membranas plasmáticas separam-se em células individuais, formando uma camada monocelular, chamada de blastoderma celular (revisão em Gaiesky e Loreto, 2003), seguindo-se os processos usuais de gastrulação e morfogênese. De maneira geral, em condições controladas de cultivo em laboratório ( $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  e 60% de umidade relativa do ar), a *Drosophila melanogaster* leva, em média, nove dias para completar seu ciclo vital entre ovo e adulto. Ela passa por um período embrionário desenvolvido no interior do ovo, como descrito acima, por três estágios larvais, por uma fase curta de pré-pupa e pela de pupa, na qual, sob influência hormonal, os tecidos larvais são lisados, os tecidos adultos diferenciam-se a partir dos discos imaginais, e da pupa emerge a mosca adulta. Em *Drosophila willistoni*, as etapas são comparáveis (Blauth, 2005).

## **I.2. Adaptação às variações climáticas**

No ambiente natural indivíduos, espécies e populações, todos têm que adaptarem-se às mudanças ambientais de clima, através de respostas fisiológicas imediatas e reversíveis. Ao nível de espécie, de população e de indivíduo, ocorre seleção dos mais aptos a fazerem frente a essas mudanças, levando a modificações genéticas e à evolução, através da herança das melhores variantes dos caracteres que confirmam proteção contra estresses (revisão em Capy *et al.*, 2000).

A variabilidade genética pode ter várias origens como, por exemplo, diferentes genes podem expressar em contraponto ao estresse ambiental, apresentarem aparentemente expressão normal mas serem escondidos pelo efeito tampão de algumas proteínas, tais como a *Hsp90* (Rutherford e Lindquist, 1998; Capy *et al.*, 2000).

Segundo Koehn e Bayne (1989) o estresse reduz o *fitness* (adaptabilidade) de um organismo. Hoffmann e Parsons (1997) propõem uma definição de



estresse que inclui “algumas mudanças ambientais que reduzem drasticamente a capacidade de um organismo”. Existem várias definições de estresse, as quais mudam nos vários níveis biológicos de moléculas a populações, de acordo com a intensidade das alterações ambientais, organismos e populações envolvidas. Estes autores identificam duas classes de estresse, definidos de acordo com a resposta do organismo: aquelas que levam a uma resposta fisiológica (contexto individual) e aquelas que evocam uma resposta fenotípica e/ou genética (contexto evolucionário) (Capy *et al.*, 2000).

Ao nível fenotípico, um aumento de variação resultante do estresse foi demonstrado pelos principais caracteres quantitativos em *Drosophila*, pois a criação sob condições estressantes acarretou alterações em vários caracteres como, por exemplo, um aumento do tempo de desenvolvimento (Gebhardt e Stearns, 1988; Imasheva *et al.*, 1998), peso seco na eclosão (Gebhardt e Stearns, 1988), tamanho do tórax (Imasheva *et al.*, 1997), tamanho da asa (David *et al.*, 1994), número de ovaríolos (Delpuech *et al.*, 1995) e o número de cerdas esternopleurais (Imasheva *et al.*, 1997). Os tipos de estresse testados foram temperaturas extremas (David *et al.*, 1994; Imasheva *et al.*, 1997, 1999), deficiência na alimentação larval (Gebhardt e Stearns, 1988, Imasheva *et al.*, 1999) e densidade larval (Parsons, 1961; Lazebny *et al.*, 1996). O aumento da variação fenotípica na população criada sob condições ambientais adversas pode ser resultado da quebra da homeostase durante o desenvolvimento (Imasheva *et al.*, 1998).

Respostas à seleção dependem da quantidade de variabilidade genética expressa nos fenótipos dos indivíduos de uma população. Devido a isto, o efeito das mudanças ambientais sobre a expressão da variabilidade genética dos traços quantitativos tem importantes implicações evolutivas. Se a variabilidade genética é inflacionada em ambientes desfavoráveis, isso resultará na aceleração das respostas genéticas e então, no aumento da taxa de evolução. Se, ao contrário, a variabilidade genética diminui em tais ambientes, então a resposta da seleção será menor do que em condições normais. No primeiro caso, os traços evoluirão mais rapidamente em ambientes pobres; no segundo, em ambientes ótimos (Imasheva *et al.*, 1999).

## Agentes indutores de estresses químicos

Muitos aspectos do desenvolvimento de *D. melanogaster*, principalmente o embrionário, mas também as fases de pupa, vêm sendo estudados para análise dos efeitos causados por agentes que aumentam as espécies reativas de oxigênio (ROS). A resistência a ROS está diretamente relacionada ao aumento da longevidade em *Drosophila* (Phillips *et al.*, 1989; Cunha *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2004). Um produto químico bastante utilizado como indutor de estresse celular é o paraquat. O paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium-dichloride) amplamente utilizado como herbicida, facilita a formação do ânion superóxido em sistemas biológicos e também a peroxidação lipídica, sendo este seu mecanismo de toxicidade. Este composto aceita elétrons do sistema de transferência de elétrons celular e doa ao O<sub>2</sub>, formando o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Farrington *et al.*, 1973, Burk *et al.*, 1980).

O papel da superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) foi testado em *Drosophila*, usando mutantes que tinham deficiência nessa enzima, já que estes mutantes são viáveis e desenvolvem-se até adultos. O aparente efeito da falta superóxido desmutase sobre a viabilidade larval pode ser reflexo da baixa exposição da larva ao O<sub>2</sub> atmosférico, através de seu ambiente de desenvolvimento semi-líquido ou possivelmente de uma baixa taxa metabólica basal (Phillips *et al.*, 1989). Outras características podem explicar a aparente invulnerabilidade larval, como um curto ciclo ovo-pupa (em torno de 5 dias, incluindo a embriogênese, a 25 °C) comparado ao adulto. Assim, o O<sub>2</sub><sup>-</sup> pode simplesmente não acumular a níveis tóxicos nesse pequeno espaço de tempo. Além disso, muitas das células da larva são politênicas ou posmitóticas, e, finalmente, a oogênese pode fornecer um dote materno de superóxido desmutase suficiente para proteger o desenvolvimento do embrião até a fase adulta (Phillips *et al.*, 1989).

O Selênio é um micronutriente essencial na dieta e de fundamental importância para a saúde. O principal efeito desse elemento é provavelmente mediado por selenoproteínas, através das quais é covalentemente incorporado na forma do aminoácido raro selenocisteína, o 21º aminoácido (Hatfield e Gladyshev,

2002). A maioria das selenoproteínas parece ter um papel como antioxidante ou nas reações de oxi-redução. Como componente de enzimas antioxidantes, o selênio ajuda a proteger as células dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Morey *et al.*, 2003), incluindo peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e o radical hidroxil. Experimentos realizados principalmente com linhagens mutantes de *D. melanogaster* para função nula do gene da selenofosfato sintetase, enzima chave para a biossíntese de selenoproteínas, demonstraram que ocorre acúmulo de ROS nas células que entram em apoptose (Alsina *et al.*, 1999).

Para mamíferos são relatadas duas formas de selenofosfato sintetase, SP1 e SP2, sendo que esta última é considerada uma selenoproteína (Alsina *et al.*, 1999). Em *D. melanogaster* foi encontrado um homólogo de SP2 dessa enzima, marcando a identificação da primeira selenoproteína desse organismo (Alsina *et al.*, 1998; Hirosawa-Takamori *et al.*, 2000).

Insetos não utilizam glutathione peroxidase com um mecanismo de defesa contra espécies reativas de oxigênio, como os vertebrados. Enzimas evolucionariamente conservadas como a superóxido desmutase (SOD1 e 2) (Phillips *et al.*, 1989; 2000), catalase (Griswold *et al.*, 1993) e glutathione-S-transferase (Parkes *et al.*, 1993) constituem as maiores defesas oxidantes conhecidas em moscas. *D. melanogaster* não codifica glutathione reductase, sendo que a redução da glutathione é realizada por tioredoxina reductase, que não é uma selenoproteína (Morozova *et al.*, 2003).

Estudos sobre selenoproteínas mostram que elas têm um papel essencial na viabilidade embrionária e na morfogênese em vertebrados e invertebrados (Morozova *et al.*, 2003). A perda da expressão de selenofosfato sintetase, uma enzima da biossíntese de selenocisteína, mostrou interromper a morfogênese dos discos imaginários em *D. melanogaster* (Alsina *et al.*, 1998).

O consórcio internacional para o seqüenciamento de 12 genomas de *Drosophila* (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007), em suas análises de predição de genes não encontraram o tRNA de selenocisteína no genoma de *D. willistoni*, tornando-se o primeiro animal conhecido a perder as selenoproteínas. Se correta, esta observação é um fato notável dada a ubiquidade das

selenoproteínas e de sua maquinaria de biossíntese em metazoários, bem como a sua importância para a defesa contra a toxicidade do excesso de selênio e para a proteção contra o estresse oxidativo mediado pelas selenoproteínas. Entretanto, continua sendo possível que esta espécie codifique selenoproteínas por outro caminho (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007).

### **I.3. Proteínas de Choque Térmico**

Todos os organismos respondem ao calor pela indução da síntese de um grupo de proteínas, chamadas de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP). Sua descoberta foi consequência da indução de um grupo de pufes em cromossomos politênicos de larvas de *Drosophila busckii* expostas a um choque térmico e a DNP (2,4-dinitrofenol) por Ritossa (1962). Em outros estudos, observaram-se que: (1) os pufes são induzidos por vários outros tratamentos de estresse (Ashburner, 1970, 1972), (2) eles são produzidos em poucos minutos (Ashburner, 1970), (3) estão associados aos RNAs recém sintetizados (Ritossa, 1962) e (4) são encontrados em outras espécies de *Drosophila* e em muitos diferentes tecidos (Ritossa, 1964; Berendes, 1965).

A análise molecular mostrou que estes pufes coincidem com a síntese de novas proteínas, e, estas respostas, levaram-os a se tornarem um sistema modelo para a investigação da estrutura e regulação do gene. Os genes de *hsps* de *Drosophila* estão entre os primeiros genes eucarióticos a serem clonados (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1979); a ter sua estrutura de cromatina determinada antes e depois da ativação (Keene *et al.*, 1981); a ter suas seqüências regulatórias identificadas (Pelham, 1982) e possuir os fatores de transcrição interagindo com esta seqüência caracterizada (Wu, 1985).

A resposta ao choque térmico é um conservado e bem conhecido sistema genético que existe em todos os organismos, de Archaeobacteria a Eubactéria, de plantas até animais. Embora certas características da resposta variem de organismo para organismo, muitas são universais (Lindquist, 1986; Lindquist e Craig, 1988; Georgopoulos e Welch, 1993). Originalmente foi descrita em *Drosophila* como resposta as altas temperaturas, origem de seu nome. A resposta ao choque térmico, é também acionada por diversos outros estresses, incluindo

choque ao frio, dissecação, anoxia e a exposição a uma ampla gama de metais pesados, etanol e outros contaminantes. Além disso, as HSPs também são expressas constitutivamente em todos os organismos em temperaturas normais e desempenham funções rotineiras para o funcionamento normal da célula (Lindquist, 1986; Lindquist e Craig, 1988; Parsell e Lindquist, 1993; Feder e Hofmann, 1999; Rinehart *et al.*, 2007).

Em todos os organismos, a indução das HSPs por estresse, é rápida e intensa, e existe uma notória relação entre a temperatura de indução e a variação da temperatura no ambiente original do organismo. Logo, em diferentes organismos uma dada temperatura pode induzir diferentes respostas. Assim, em *Drosophila melanogaster* a indução das HSPs ocorre entre 33-37°C, temperaturas comuns nos dias quentes de verão (Lindquist, 1980). Já em bactérias termofílicas, que se multiplicam a 50 °C, as proteínas são induzidas quando a temperatura sobe para 60 °C (Daniels *et al.*, 1984). Em peixes árticos que crescem a 0°C elas são induzidas entre temperaturas de 5-10 °C, em mamíferos elas são induzidas pela febre e na soja, no campo, pelas temperaturas comuns em dias ensolarados e quentes (Kimpel and Key, 1985; Li and Laslo, 1985; Lindquist e Craig, 1988). Um exemplo particularmente interessante é fornecido por uma variedade de patógenos dimórficos que têm uma fase em temperaturas baixas e outra em temperaturas mais elevadas em seus mamíferos hospedeiros. Esta mudança de temperatura é acompanhada por uma forte indução das HSPs em ambos os patógenos, procarióticos e eucarióticos, estando estas proteínas relacionadas a antígenos imunodominantes em muitas dessas infecções. Anticorpos e células T circulantes tem especificidade pelas principais proteínas HSPs de organismos tão diversos quanto *Mycobacterium leprae* (Agente causador da Hanseníase), *M. tuberculosis* (Tuberculose), *Coxiella burnetti* (Febre Q), *Plasmodium falciparum* (Malária), *Schistosoma mansoni* (Esquistossomose), *Brugia malayii* (Filariose), *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas) e *Leishmania major* (Leishmaniose cutânea) (Young *et al.*, 1988).

O mais convincente argumento de que as HSPs têm uma função protetora é a forte correlação entre sua indução e a indução de termotolerância. Uma série

de experimentos semelhantes sobre termotolerância , realizados em cultura de células de uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos, soja, moscas das frutas e camundongos foram realizados. Os experimentos mostraram que um grupo de células ou o próprio organismo morre rapidamente quando transferido diretamente de uma temperatura normal de crescimento para uma alta temperatura, enquanto um grupo correspondente, no qual as HSPs foram induzidas por um tratamento de pré-aquecimento, a morte foi muito mais lenta. Além disso, tratamento de pré-aquecimento induz tolerância a outras formas de estresse e outras formas de estresse induzem tolerância ao calor. Assim, aparentemente, as HSPs seriam induzidas por estresse moderado, não necessariamente letal, para proteger o organismo de um estresse mais intenso. Estes estudos sugerem que em temperaturas moderadas a resposta é transitória na maioria dos organismos, com o retorno das atividades normais depois de uma pausa temporária, e mantida em altas temperaturas até as células começarem a morrer lentamente (Lindquist, 1986; Lindquist e Craig,1988). Genes muitos semelhantes aos genes de *heat-shock*, os quais são expressos constitutivamente e, talvez, não induzidos por estresses são denominados de genes *heat-shock cognate* (hscs) (Becker e Craig, 1994).

Entretanto, é na biossíntese de proteínas que as HSPs desempenham sua função mais importante, agindo como chaperonas moleculares, auxiliando polipeptídeos nascentes a assumirem sua conformação tridimensional correta. Da mesma forma, as HSPs protegem as células da desnaturação e agregação de polipeptídios induzidos durante o estresse, aumentando as chances de sobrevivência da célula (Lindquist e Craig,1988; Becker e Craig, 1994; Feder e Hofmann,1999).

### **I.3.1. Hsp27**

As proteínas de choque térmico de baixo peso molecular Hsp22, Hsp23, Hsp26 e Hsp27 são codificadas por quatro unidades de transcrição induzidas pelo calor e estão agrupadas em um espaço de 15 kb de DNA no loco 67B do cromossomo 3L de *D. melanogaster* e no 29A e 32B do braço XR, a ele correspondente em *D. willistoni* (Rieger, 1999). A Hsp70 é expressa

constitutivamente e é intensamente induzida pelo calor (Ayme e Tissières, 1985; Pauli *et al.*, 1990).

Os efeitos anti-estresse da Hsp27 foram identificadas a partir de estudos com células humana e de ratos, onde a expressão aumentou em resposta a hipertermia e foram detectados em sítios sinápticos, sugerindo um papel protetor das sinapses contra os efeitos do estresse (Macario e Conway de Macario, 2000).

### **I.3.2. Hsp60**

A caracterização bioquímica da proteína hsp60-like em *E. coli*, GroEL, contribuiu muito extensivamente para a compreensão de como as chaperoninas (como são chamadas as chaperonas em bactérias), medeiam o enovelamento das proteínas. GroEL foi a primeira a ser identificada, pois é essencial para a montagem de bacteriófagos (Georgopoulos *et al.*, 1973), sendo também essencial para a multiplicação de *E. coli* sob condições normais (Fayet *et al.*, 1989). GroEL liga-se a proteínas parcialmente desenroladas em uma taxa de 1:1 ou 1:2 de oligômeros para polipeptídeos não dobrados e mostrou mediar a redobra e montagem de uma variedade de enzimas desnaturadas *in vitro* usando uréia guanidina ou calor (Martin *et al.*, 1991).

As proteínas Hsp70 e Hsp60 têm muitas características bioquímicas semelhantes, mas elas não são funcionalmente intercambiáveis, sendo cada uma essencial para a viabilidade celular. Várias linhas de fortes evidências indicam que Hsp70 e Hsp60 atuam sequencialmente em um caminho comum para facilitar o enovelamento proteínas. Mutantes de Hsp70 e Hsp60 em mitocôndria mostram o acúmulo das mesmas proteínas, embora em diferentes etapas da translocação/percurso do dobramento, indicando especificidade semelhante ao substrato (Kang *et al.*, 1990).

Embora implicadas na proteção da célula contra os efeitos nocivos do estresse, as HSPs também são essenciais sob condições normais de crescimento (Lindquist, 1986; Lindquist e Craig, 1988) e do desenvolvimento Rutherford e Linquist, 1998).

### **I.3.3. Hsp70**

As "heat shock proteins" de 70kDa (Hsp70 ou Hsp72) são uma abundante classe de chaperonas moleculares (Lopez-Buesa *et al.*, 1998; Mayer e Bukau, 2005), e seu papel protetor diante da apoptose induzida por estresse tem sido demonstrado (Mosser, *et al.*, 1997; Buzzard, *et al.*, 1998). Ela auxilia uma ampla gama de processos celulares como manutenção da estrutura tridimensional das proteínas, incluindo o enovelamento de proteínas recém sintetizadas, translocação e secreção de proteínas, controle da atividade das proteínas reguladoras, redobramento de estruturas incorretas e/ou sua degradação e remoção da célula (Parsell e Lindquist, 1993; Mayer e Bukau, 2005). Em grande parte dos eucariotos os genes de *hsp70* existem como parte de uma família multigênica, cujos genes são expressos no âmbito de uma variedade de condições fisiológicas. Eles são encontrados na maioria, se não em todos os compartimentos celulares de eucariotos incluindo o núcleo, mitocôndria, cloroplastos, retículo endoplasmático e citosol, assim como em bactérias. Todos os genes de Hsp70 isolados apresentam elevados graus de conservação, por exemplo, a Hsp70 humana apresenta 73% de homologia com a Hsp70 de *Drosophila* e 50% com a de *Escherichia coli* (Feder *et al.*, 1995). Todas as Hsp70 examinadas ligam-se ao ATP com alta afinidade, mas possuem fraca atividade ATPase que pode ser estimulada pela ligação a proteínas não dobradas e peptídeos sintéticos (Rothman, 1989). Truncando a Hsp70 expressa constitutivamente em células de mamíferos por proteólise limitada foi revelado que a atividade de ligação do ATP reside em um fragmento N-terminal de 44 KDa o qual falta a capacidade de ligação ao peptídeo, indicando que a capacidade de ligar polipeptídios está dentro da metade C-terminal (DeLuca-Flaherty *et al.*, 1990).

Todas as Hsp70, independentemente da sua localização celular, ligam proteínas, particularmente aquelas que não estão enroladas. A BiP, que está localizada no retículo endoplasmático, foi a primeira Hsp70 mostrada que liga proteínas não enroladas (Haas e Wabl, 1983). O retículo endoplasmático de células eucariontes contém esta proteína simples da família da Hsp70, chamada



BiP (Haas e Wabl, 1983) em células de mamíferos e Kar2p, produto do gene *KAR2*, em leveduras (Normington *et al.*, 1989, Rose *et al.*, 1989). Como é o caso, de outras Hsp70, a associação de BiP com proteínas não enroladas pode ser dissociada pela adição de ATP mas não de análogos de ATP não hidrolisáveis (Munro e Pelham, 1986).

Mitocôndrias de uma variedade de células eucarióticas incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (Craig *et al.*, 1989), *Euglena gracilis* (Amir-Shapira *et al.*, 1990), *Trypanosoma cruzi* (Engman *et al.*, 1989) e células de mamíferos (Leustek *et al.*, 1989) contêm proteínas Hsp70. A Hsp70 mitocondrial de *S. cerevisiae* é codificada pelo gene *SSC1*, que é um gene nuclear essencial (Craig *et al.*, 1987) contendo uma seqüência N-terminal líder para proteínas mitocondriais, que é clivada proteoliticamente após a entrada na matriz mitocondrial (Craig *et al.*, 1989). Ssc1p é necessária para importação de proteínas do citosol para a matriz mitocondrial (Kang *et al.*, 1990; Ostermann *et al.*, 1990).

A Hsp70 citosólica está intimamente associada com a síntese, dobramento e secreção de proteínas e todos os organismos têm, pelo menos, uma Hsp70 no citosol. Em células de mamíferos há a forma constitutiva abundante denominada Hsp73 e a forma indutiva chamada de Hsp72 (Becker e Craig, 1994).

#### **I.3.4. Hsp90**

Diferente da Hsp70, a Hsp90 geralmente não atua no dobramento de proteínas nascentes. Hsp90 é essencial para a manutenção da atividade de numerosas proteínas sinalizadoras, que desempenham um papel fundamental na rede de transdução de sinal. A família altamente conservada de Hsp90 com proteína de 90 KDa, presente no citosol eucariótico, é denominada variavelmente de HSP90 $\alpha$  (isoforma maior) e HSP90 $\beta$  (isoforma menor) em humanos, Hsp86 e Hsp84 em camundongos, Hsp83 em *Drosophila*, Hsc82 e Hsp82 em leveduras (Young *et al.*, 2001).

Defeitos na fisiologia celular causados pela interrupção da Hsp90 levam a defeitos em nível de tecidos e do organismo, associando a sua função com a evolução morfológica, um processo que frequentemente requer efeitos de

mudanças genéticas independentes (Rutheford e Linquist, 1998). Mutações que desativam a Hsp90 são letais em eucariontes, mas surpreendentemente sua interrupção parcial em *Drosophila* por mutação sensível a temperatura ou baixa quantidade de GA mostra uma diversa amplitude de variações fenotípicas hereditárias. As variações morfológicas parecem surgir da expressão dos alelos de genes de desenvolvimento, cujas proteínas são mutadas, e sua supressão do fenótipo dependerá da função plena da Hsp90 como um tampão conformacional para manter a atividade do tipo selvagem, mas cujo fenótipo pode ser estabilizado por outros genes (Rutheford e Linquist, 1998).

#### **I.4. Elementos transponíveis e estresse**

Um dos mecanismos que pode explicar a origem da variabilidade genética nas populações é aquele envolvendo a mobilização de elementos transponíveis (Capy *et al.*, 1997). Os elementos transponíveis são um potente agente mutagênico com potencial para produzir amplas alterações no genoma de seus hospedeiros (Kidwell e Lisch, 2000; 2001; Kidwell, 2002). A quantidade de “mutações” induzidas pela atividade dos elementos de transposição estende-se desde modificações no tamanho e arranjo de genomas inteiros à substituição, deleção e inserção de um único nucleotídeo. Elementos transponíveis induzem ainda rearranjos cromossômicos como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas, amplamente aproveitados pela seleção natural e encontrados na maioria dos organismos estudados, propiciando reorganização, amplificação e redução do genoma em pequena ou em grande escala (Kidwell, 2002).

A maioria dos elementos de transposição pode ser distribuída em duas classes principais, de acordo com o mecanismo de transposição (Finnegan, 1989; Capy *et al.*, 1997; Kidwell, 2002):

(1) Elementos de Classe I ou autônomos, são capazes de catalisar sua própria transposição. Eles usam um intermediário de RNA para transposição e codificam uma *transcriptase reversa*. Nesse grupo incluem-se semelhantes aos retrovírus. Estes elementos são amplificados pelo processo de transposição e tem um grande potencial para aumentar o número de cópias. Podem ser divididos em duas subclasses: os retrotransposons que possuem, de forma direta, *Long*

*terminal repeats* (LTRs) e os retroposons que não possuem LTRs. Na subclasse dos retrotransposons incluem-se quatro diferentes grupos, *Ty1-copia*, *BEL*, *DIRS* e *Ty-3 gypsy*, que são amplamente distribuídos em animais e plantas. Os retroposons incluem os *long interspersed nuclear elements* (LINEs) e os *short interspersed nuclear elements* (SINEs).

(2) Elementos de Classe II, mais conhecidos como transposons, caracterizam-se por possuir repetições terminais invertidas e transpõem-se diretamente por via de um intermediário de DNA, usando uma enzima chamada transposase. Temos como exemplo de elementos dessa classe, elementos da superfamília *hAT* (*hobo*, *Activator*, *Tam-3*), da superfamília *mariner-like* e o elemento *P*.

McClintock (1984), sugeriu que a atividade dos elementos de transposição pode ser a resposta para os desafios do genoma. Esta hipótese foi discutida por Hall (1998), que trabalhou com elementos *IS* de bactéria, que podem se transpor em resposta a sinais ambientais externos. O sinal externo utilizado pela autora foi o estresse causado pela deficiência do substrato. Em *E. coli*, *operons* silenciados podem ser ativados por inserção *IS* e então contribuir para o *fitness* da célula. Por exemplo, os *operons*  $\beta$ -*glucoside* são silenciados em linhagens selvagens e podem ser ativados por elementos *IS* para usar açúcar do tipo  $\beta$ -glicosídeo como fonte de carbono e energia (Hall, 1999).

Na revisão realizada por Grandbastien (1998), o autor cita um número razoável de elementos transponíveis em plantas (principalmente retrotransposons) que são ativados por estresses. Por exemplo, a transposição do elemento *Tnt1* de *Nicotiana tabacum* pode ser induzida após vários estresses bióticos e abióticos (Grandbastien *et al.*, 1997).

Em *Drosophila simulans* o número de cópias do elemento 412 aumenta com a latitude (Viera e Biémont, 1996), e este fenômeno foi observado em vários continentes e em ambos os lados do Equador. De forma independente, mas na mesma espécie, Giraud e Capy (1996), descreveram uma clina latitudinal entre a África tropical e a Europa para a atividade somática do elemento *mariner*, sugerindo um efeito de fator(es) intimamente relacionados à temperatura. Isto está de acordo com resultados de laboratório que mostram um efeito da

temperatura sobre o desenvolvimento medido pelas taxas de excisão, somáticas (Charkrani *et al.*, 1993) e germinativas (Garza *et al.*, 1991).

## Objetivos

### Objetivo geral:

Contribuir para o conhecimento da dinâmica do estresse celular por agentes químicos e físicos e suas possíveis implicações sobre a mobilização de elementos transponíveis presentes em *Drosophila*.

### Objetivos específicos:

1) Avaliar os possíveis efeitos tóxicos de disseleneto de difenila durante diferentes estágios do ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* e seu potencial para promover estresse celular, através da transcrição do gene *Hsp83* (Capítulo II);

2) Caracterizar o padrão de estresse celular no grupo *willistoni* de *Drosophila* (Capítulo III);

3) Caracterizar molecularmente os padrões de expressão dos genes das proteínas de estresse (*hsp70* e *hsp83*) em mutantes *Sepia* e *white* de *Drosophila willistoni* (Capítulo III);

4) Verificar o efeito do estresse celular como agente potencial na ativação do elemento de transposição *P* no genoma de *D. willistoni*.(Capítulo IV).

# Capítulo II

## **Over-activation of the *Drosophila melanogaster hsp83* gene by selenium intoxication**

Trabalho aceito para publicação na revista

**Genetics and Molecular Biology, 2008**

**Parte dos resultados deste trabalho foram obtidos durante o Mestrado em Bioquímica na UFSM e parte durante o Doutorado na UFRGS**

**Over-activation of the *Drosophila melanogaster hsp83* gene by selenium intoxication.**

Ronaldo Medeiros Golombieski<sup>1</sup>, Daniel Ângelo Sgranzerla Graichen<sup>1</sup>, João Batista Teixeira da Rocha<sup>2,3</sup>, Vera Lúcia da Silva Valente<sup>1</sup>, Élgion Lúcio da Silva Loreto<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.,<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, Brazil. <sup>4</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, Brazil.

**Running title:** *Drosophila hsp83* over-activation

**Key words:** gene activation, *hsp83* gene, selenium, diphenyl diselenide

Send correspondence to Élgion Lúcio da Silva Loreto, Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Biologia Prédio 16-A, Campus Universitário, Bairro Camobi, Santa Maria - RS, Brazil 97105-900 email: elgion.loreto@pq.cnpq.br

## Abstract

Selenium is an important dietary micronutrient and an essential component of selenoproteins and the active sites of some enzymes, although at high concentrations it is toxic. We investigated diphenyl diselenide ((C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>) for its effects on the developmental stages of *Drosophila melanogaster* and found that in the larval and pupae stages the toxic threshold for this compound when added to the banana-agar medium on which the larva were fed was 350 μmol. In adult flies, fed on the same media, there were no observable toxic effects below 500 μmol but there were toxic effects above 600 μmol, indicating that adult flies were more resistant to selenium intoxication. In larvae, when diphenyl diselenide was present above the toxic threshold there was increased activation of the *hsp83* heat shock protein gene. Selenium promotes oxidation of sulfhydryl groups and affects the folding of proteins and this could explain the over-expression of *hsp83* because the product of this gene is involved in protein folding and defense responses, including the response to heat shock.

## Introduction

Cellular responses to stress are evolutionarily ancient, ubiquitous, and essential mechanisms for the continued survival and reproduction of organisms (Lindquist, 1986; Feder and Hofmann, 1999). An important part of the cellular response to heat stress is played by a group of genes coding for heat shock proteins (HSP) or stress proteins, because their expression can be induced by high temperatures and a whole range of other stress factors (Sørensen *et al.*, 2003; Sørensen *et al.*, 2005). Stress responsive genes are of interest to the study and understanding of not only environmental stress resistance and stress response in general but also protein folding-mediated diseases in humans, immunological responses, animal breeding, genetic stress, protein quality control, developmental biology and gene regulation (Sørensen *et al.*, 2005).

Selenium, a nonmetal related to sulfur and tellurium, has long been recognized as a dietary antioxidant and as an important dietary micronutrient in mammals (Walter *et al.*, 1972; Combs and Combs, 1986; Leibovitz *et al.*, 1990;



May, 2002). At the molecular level, selenium is an essential component of the active sites of the enzymes glutathione peroxidase (Enzyme Commission number = EC 1.11.1.9), iodothyronine 5'-deiodinase (EC 1.97.1.10) and mammalian thioredoxin reductase (TrxR, EC 1.8.1.9) and is also present in several other mammalian selenoproteins. A deficiency in dietary selenium results in decreased levels of selenoproteins, thus compromising biological processes that are maintained by these proteins (Martin-Romero *et al.*, 2001). Both glutathione peroxidase and TrxR catalyze reactions that are essential to the protection of cellular components against oxidative and free radical damage. As a consequence of the growing recognition of the important biological role of selenium, a number of novel pharmaceutical agents which are selenium-based or which target specific aspects of selenium metabolism are under development (May, 1999; Meotti *et al.*, 2004).

A variety of seleno-organic compounds are now considered as potential antioxidant and chemopreventive pharmacological agents (Commandeur *et al.*, 2001; Klotz and Sies, 2003). Müller *et al.* (1984) described 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one, a synthetic lipid-soluble selenium-containing heterocyclic also known as PZ 51, DR3305 or Ebselen, which mimics glutathione peroxidase activity and which has been successfully used experimentally and pre-clinically in a variety of situations where free radicals were involved (Parnham *et al.*, 1987; Harman *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 2001; Kono *et al.*, 2001; Porciúncula *et al.*, 2001; Rossato *et al.*, 2002a, 2002b; Farina *et al.*, 2003; Klotz and Sies, 2003). Diselenides are good candidates as antioxidant agents because they have some chemical and biochemical characteristics in common with Ebselen in that they exert glutathione peroxidase-like activity and can react with sulfhydryl groups to form selenosulfide ( $-\text{Se-S}$ ) and disulfides, (Engman *et al.*, 1994; Barbosa *et al.*, 1998). Of particular importance is diphenyl diselenide ( $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Se}_2$ ), the simplest of the diaryl diselenides, which has been shown to be even more active as a glutathione peroxidase mimic (Wilson *et al.*, 1989) and less toxic to rodents than Ebselen (Meotti *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2003). Furthermore, diphenyl diselenide shows anti-inflammatory and antinociceptive activity (Nogueira *et al.*, 2001) and has a neuroprotective effect on *in vitro* models of ischemia

(Ghisleni *et al.*, 2003) and glutamate neurotoxicity (Porciúncula *et al.*, 2001; Rossato *et al.*, 2002a).

The fruit fly, *Drosophila melanogaster*, has been used for over a century as a model for probing the mysteries of genetics and biology (Ashburner, 2005; Tickoo and Russell, 2002). Comparative studies between the fly and human genomes have identified strong evolutionary conservation from insects to mammals at both sequence (structure) and pathway (function) levels (Rubin *et al.*, 2000; Ballatori and Villalobos, 2002). The use of sophisticated genetic approaches combined with emerging genomics technologies suggest that the fly has much to offer as a tool for understanding basic cellular processes and provides an attractive and complex model system for exploring the molecular basis of human diseases such as cancer, Alzheimer's disease and Huntington's disease (Rubin *et al.*, 2000; Tickoo and Russell, 2002).

Heat shock proteins (HSP) are members of a larger group of proteins called molecular chaperones, characterized by their ability to affect the structure or folded state of other proteins and are a family of proteins that are constitutively expressed at high level, with levels increasing when cells are stressed. The HSP include both highly conserved and more variable members, and are induced in all cells in response to heat stress (Lindquist, 1986). In *Drosophila*, six major HSP (Hsp-83, Hsp-70, Hsp-27, Hsp-26, Hsp-23 and Hsp-22) are induced in response to heat stress, with Hsp83 being constitutively expressed and upregulated several times during heat stress. The functions of Hsp83 include regulating the activity of other proteins such as specific steroid hormone receptor molecules (Picard *et al.*, 1990; Parsell and Lindquist, 1993). Heat stress causes trimerization and activation of the constitutively expressed heat shock transcription factor (HSF), which is required for *hsp* gene induction (Jedlicka *et al.*, 1997; Westwood *et al.*, 1991). The *hsp83* gene is a member of the *hsp90* gene family, which has been highly conserved through evolution (King and Tower, 1999).

In this paper, we describe the toxicological effect of diphenyl diselenide during different stages of the *D. melanogaster* life cycle and present *Hsp83* transcription data on the potential of this seleno-organic compound to promote cellular stress.

## Materials and Methods

### *Drosophila* stock used and rearing conditions

We obtained *Drosophila melanogaster* (Harwich strain) from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH, USA. The flies were reared in 2.5 cm x 6.5 cm bottles containing 5 ml of cornmeal medium (Klein et al 1999) at constant temperature and humidity (20 °C ± 1 °C and 60% relative humidity). Analyses of viability and developmental rate of the flies in different diphenyl diselenide molarities were performed in banana-agar medium (20% v/v homogenized banana; 1% (w/v) brewer's yeast; 2% (w/v) sucrose; 1% (w/v) powdered milk; 1% (w/v) agar; and 0.08% (v/w) methyl p-hydroxybenzoate (Nipagin® Delaware, Brazil). Diphenyl diselenide (molecular formula (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Se<sub>2</sub> (molar mass 312.13 g mol<sup>-1</sup>, CAS 1666-13-3). Diphenyl diselenide was synthesized according to literature methods (Paulmier, 1986) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) and added to the medium to produce diphenyl diselenide concentration, from 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 μmol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>/kg of medium. In the control treatment only DMSO was added to the medium.

To test egg to adult survival and developmental rate in different diphenyl diselenide molarities about 200 adult flies were transferred to a 300 mL empty bottle, which was inverted over a Petri dish containing banana medium to allow the flies to deposit fresh embryos. After 30 minutes the eggs were picked with a histological needle and rinsed in 0.5% (v/w) sodium hypochloride solution, after in distilled water and transferred to medium containing the desired molarity of diphenyl diselenide. Thirty eggs were placed per bottle and observed daily to accompany the developmental stages. Five replicates were prepared per treatment.

To determine the lifespan of the adult flies when they were unexposed or exposed to diphenyl diselenide freshly eclosed flies were collected and reared on banana-agar medium containing the desired diphenyl diselenide molarities. For each experiment, 10 vials, each containing 5 males and 5 females, were maintained at 20°C. Flies were transferred to new vials every 3 days. The number of dead flies was counted every day. Generally, five replicates were prepared per

treatment but in some cases up to eight replicates were made.

### **Molecular methods**

To investigate whether exposure to diphenyl diselenide induced cellular stress we estimated the transcriptional expression of the *Hsp83* gene using the Northern blot method. Total RNA was isolated from third-instar *D. melanogaster* larvae which had been exposed to one of following treatments: i) reared completely in banana-agar medium supplemented with 300  $\mu\text{mol}$  of diphenyl diselenide; ii) transferred 8 hours before RNA isolation to banana-agar medium supplemented with either 300 or 800  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  of diphenyl diselenide; iii) transferred 2 hours before RNA isolation to a 30 °C chamber to induce heat shock. A group of control larvae were reared on unsupplemented banana-agar medium. Total RNA was isolated with TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies) using 30 larvae in each treatment. Total RNA (10  $\mu\text{g}$ ) was fractionated on 1.5% (w/v) agarose gel in 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid (HEPES)/formamide buffer and transferred to Hybond<sup>®</sup> N+ nylon membrane (Amersham Bioscience). The membranes were hybridized to the random prime-labeled probes at 65° C in a mixture containing 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 5% (w/v) dextran sulfate and a 20-fold dilution of liquid block (Gene Image Kit<sup>®</sup>-Amersham Biosciences) in 5x saline-sodium citrate (SSC) buffer. The filters were washed twice at 65° C, firstly with 1x SSC and 0.1% (w/v) SDS and then with 0.2% SSC and 1% (w/v) SDS, in both cases under agitation for 15 minutes. For detection, the Gene Image CPD-Star kit (Amersham Biosciences) was used, following the manufacturer's instructions.

The *phsp83* plasmid (Straten *et al.*, 1997) containing the *D. melanogaster* *Hsp83* gene was used as probe. To control the quantity of RNA applied to the gel, the membrane was re-hybridized with the plasmid containing the 18S rRNA sequence (Straten *et al.*, 1997).

### **Statistical analyses**

The Kaplan–Meier method was used to generate survival curves for all survival experiments using the SPSS 10.0 for Windows Software. Differences in survival between treatment groups were compared using the non-parametric Log-Rank test, where  $p < 0.05$  indicates a significant difference between experimental and control groups. The individual  $P$  values were adjusted for multiple testing by controlling for false discovery rate using the Benjamini and Hochberg false discovery rate method (Benjamini and Hochberg, 1995). The Northern blots were analyzed with the LabImage<sup>®</sup> Gel Analysis and Documentation System program version 2.62<sup>©</sup>1999-2001 (Kapelan GmbH, German).

## Results

In the experiments to test the effects of different diphenyl diselenide molarities on *D. melanogaster* egg-to-pupae developmental rate and viability we found a molarity-dependent relationship between diphenyl diselenide concentration and the rate of development of *D. melanogaster*. As the molarity of diphenyl diselenide increased there was a delay from one to four days for larvae to reach the pupae stage (Figure 1). This data was subjected to chi-squared analysis and the Benjamini and Hochberg false discovery rate method (Benjamini and Hochberg, 1995) and the results presented in Tables 1. In most cases a higher diphenyl diselenide molarity was related to a significant reduction in the viability of the flies. The exception was 300  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide which showed a slightly increased percentage viability (89%) compared with control flies treated with DMSO only, for which only 88% of eggs reached the pupae stage. However, viability decreased when the larvae were exposed to diphenyl diselenide molarities exceeding 300  $\mu\text{mol}$  (Table 1), with the pupal stage being reached by 76% of eggs exposed to 350  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide, 73% exposed to 400  $\mu\text{mol}$ , 37% exposed to 450  $\mu\text{mol}$  and only 7% exposed to 500  $\mu\text{mol}$ . At diphenyl diselenide molarities exceeding 500  $\mu\text{mol}$  all larvae died. Almost all pairwise comparisons were statistically significant, the exception being the lack of significance between diphenyl diselenide molarities of 350  $\mu\text{mol}$  and 400  $\mu\text{mol}$  (Table 1).

The effect of different diphenyl diselenide molarities on the pupal stage of the *D. melanogaster* life cycle is shown in Figure 2. In the control without diphenyl

diselenide the percentage viability at this stage was 80 % but the viability increased to 86% at 300  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide, although there was an average delay of two days for the flies to complete their developmental cycle. However, at higher diphenyl diselenide molarities there was a significant decline in viability from 72% viability at 350  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide to 3.33% viability at 500  $\mu\text{mol}$  (Table 2) and the development cycle increased from two to seven days as diphenyl diselenide concentration increased. At 600  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide and above none of the pupae survived. Almost all pairwise comparisons were statistically significant, the exception being the lack of significance between diphenyl diselenide molarities of 350  $\mu\text{mol}$  and 400  $\mu\text{mol}$  (Table 2).

The adult flies were more resistant to diphenyl diselenide intoxication than larvae or pupae. Below 500  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide there was no significant alteration to the lifespan of adult flies (data not shown). However, contrasting with the lower diphenyl diselenide molarities, there was a significant decline in the lifespan of the adult flies at molarities exceeding 500  $\mu\text{mol}$  when compared to the control group without diphenyl diselenide (Figure 3, Table 3). Between 500  $\mu\text{mol}$  and 1000  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide there was, with one exception, no significant difference in the lifespan of the flies, suggesting a similar level of toxicity. The exception was that when 600  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide was compared to the control group without diphenyl diselenide there was no statistically significant difference (Table 3) but there was a statistically significant difference between the 600  $\mu\text{mol}$  and 800  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide molarities. These experiments were replicated five times and produced similar results (data not shown), with 500  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide failing to produce significantly different results from the control without diphenyl diselenide in some replicates while in other replicates 600  $\mu\text{M}$  diphenyl diselenide failed to produce significantly different results from the control. These results suggest that the interval between 500  $\mu\text{mol}$  and 600  $\mu\text{mol}$  is the threshold at which diphenyl diselenide affects *Drosophila* adult lifespan. We also found that on the first five days the mortality of the adult flies exposed to various diphenyl diselenide molarities was very similar to that for unexposed control flies but, subsequently, the lifespan of the flies decreased, mainly for the flies exposed to the higher diphenyl diselenide molarities.

Northern blot analyses showed differential expression of *hsp83* in the different treatments (Figure 4). The treatments were able to increase the transcription of this gene, though not to the same intensity as heat shock treatment. Quantification of *hsp83* expression with the LabImage program gave a Northern blot value of  $1.197 \pm 0.053$  for larvae maintained on medium containing 300  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide and  $1.421 \pm 0.051$  for larvae growing on the same medium but which were also heat shocked. In comparison, larvae maintained on medium containing 800  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide gave a Northern blot value of  $1.19 \pm 0.036$  compared with  $1.604 \pm 0.021$  for larvae growing on the same medium but which were also heat-shocked. All these Northern blot values compare to an arbitrarily defined value of 1 given to the control without diphenyl diselenide. The Northern blot values for the diphenyl diselenide treatments were significantly different from control without diphenyl diselenide (both with and without heat shock treatment), suggesting that although this seleno-organic compound is able to induce a cellular stress responses the response is not as strong as that caused by heat shock.

### Discussion

Selenium, while essential to the metabolism of living organisms, presents toxic effects when present at molarities higher than required in the diet. These effects could be observed in our experiments with *D. melanogaster*. The importance of selenium in *D. melanogaster* metabolism is indicated by the fact that when a low concentration of elemental selenium (Rosenfeld and Belth, 1964) or sodium selenite (Lewgoy and Cordeiro, 1971) was added to *D. melanogaster* culture medium there was a significant increase in the viability of the flies, although these authors also showed that high molarities of selenium decreased the viability of the flies.

The results obtained in our present work using the organic compound diphenyl diselenide, as a selenium source were consistent with those previously described by other authors (Rosenfeld and Belth, 1964; Lewgoy and Cordeiro, 1971).

In our study, 300  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide caused a 6% increase in the

viability of *D. melanogaster* larvae/pupae/adult flies, while at molarities higher than 350  $\mu\text{mol}$  it produced toxic effects. These results support other studies described in the literature that show that selenium is toxic to various organisms when present at molarities in excess of dietary requirements (Painter, 1941; Wilber, 1980; Yang *et al.*, 1983; Helzisouer *et al.*, 1985; Navarro-Alarcon and Lopez-Martinez, 2000).

Interestingly, we found that pre-adult stages were more susceptible to selenium intoxication than adult flies, with the baseline diphenyl diselenide concentration producing toxic effect in adult flies (500  $\mu\text{mol}$ ) being lethal to larvae. This is possibly explainable by the metabolic differences between these stages, with larvae and pupae possessing cells undergoing active mitotic divisions while adults are post-mitotic. Affleck *et al.* (2006) have shown that methotrexate (an antimetabolite and antifolate used in the treatment of cancer and autoimmune diseases and which acts by inhibiting folic acid metabolism) presents toxic and teratogenic effects in both larvae and pupae of *Drosophila* but produces no such effects in adult flies, possibly because adult *Drosophila* are post-mitotic. One explanation for such effects could be that larvae are more susceptible to selenium intoxication because they are in permanent close contact with selenium in the medium on which they are feeding. However, we observed the same toxicity pattern for pupae, which are generally on the surface of the medium and which are not actively feeding. It thus seems probable that the toxic effects of selenium in regard to *Drosophila* pupae are probably related to ingestion and absorption of selenium during the larval stage.

In the experiments designed to investigate the effects of various diphenyl diselenide molarities on the lifespan of adult *D. melanogaster* we found that on the first five days mortality was very similar to that for control flies not exposed to diphenyl diselenide but the lifespan of the flies subsequently decreased, principally flies exposed to the higher molarities. These results were similar to those described by Leal and Neckameyer (2002) who found that there was a delay of about three days in the initiation of feeding by adult *D. melanogaster* when the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport inhibitor DL-2,4-diaminobutyric acid (DABA) was added to their medium, possibly because the flies took around three days to start to ingest the medium. This may also have been the case for our



experiments with adult flies, although it is also possible that diphenyl diselenide has a delayed effect and only acts about five days after ingestion.

At toxic molarities we found that diphenyl diselenide induced the *hsp83* cellular stress response gene. The product of this gene is an 83 kD protein reported to be involved in various processes, including protein complex assembly, protein folding, the defense response and the heat response (Lange *et al.*, 2000). Several authors have shown that diphenyl diselenide promotes oxidation of sulfhydryl groups in proteins and affects the folding of these macromolecules, such oxidation also being promoted by cadmium and lead as well as selenium (Barbosa *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2000). We suggest that activation of *hsp83* is an attempt by cells to recover the correct shape of proteins disturbed by high selenium molarities. It is also possible that other stress related genes involved in the refolding of proteins (e.g. *hsp70* and *hsp23*) could also be activated by diphenyl diselenide.

The increased viability seen by us when diphenyl diselenide was added to *D. melanogaster* culture medium below the toxic threshold concentration suggests that organic selenium compounds can be a source of necessary dietary selenium but, conversely, at levels higher than the threshold concentration diphenyl diselenide activates the stress responsive gene *hsp83* in *D. melanogaster* larvae. Diselenides such as Ebselen and diphenyl diselenide have been used in pre-clinical trials for their pharmacological properties but our drosophila study has shown that at high molarities these compounds can promote activation of cellular stress protection systems, indicating that further research in this area is warranted. Since cellular stress mechanisms are highly conserved, we suggest that drosophila can be a good model for studying the effects of selenium compounds.

### **Acknowledgments**

The authors thank Dr. Sídia Maria Callegari Jacques (Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil) for help with the statistical analyses and the Brazilian agencies. Dr. Gilson Zeni (Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, for diphenyl diselenide synthesis. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio

Grande do Sul (FAPERGS grant number 04/1196.5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

## References

Affleck JG, Neumann K, Wong L and Walker VK (2006) The effects of Methotrexate on *Drosophila* development, female fecundity, and gene expression. *Toxicol Sci* 89:495-503.

Ashburner M (2005) *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1409pp.

Ballatori N and Villalobos AR (2002) Defining the molecular and cellular basis of toxicity using comparative models. *Toxicol Appl Pharmacol* 183: 207-220.

Barbosa NV, Rocha JBT, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC and Braga AL (1998) Effect of organic forms of Selenium on aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 149:243-253.

Benjamini Y and Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Statist Soc, Series B (Methodological)* 57:289 -300.

Combs GF Jr and Combs SB (1986) Selenium and cancer. In: Combs GF Jr and Combs SB (eds) *The Role of Selenium in Nutrition*. San Diego, CA: Academic Press, pp.413–462.

Commandeur JN, Rooseboom M and Vermeulen NP (2001) Chemistry and biological activity of novel selenium-containing compounds. *Adv Exp Med Biol* 500:105-112.

Engman L, Tunek A, Hallberg M and Hallberg A (1994) Catalytic effects of glutathione peroxidase mimetics on the thiol reduction of cytochrome c. *Chem Biol*

Interact 93:129-137.

Farina M, Frizzo MES, Soares FAA, Schwalm FD, Dietrich MO, Zeni G, Rocha JBT and Souza DO (2003) Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicol Lett* 144:351-357.

Feder ME and Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61: 243–282.

Ghisleni G, Porciúncula LO, Cimarosti H, Rocha JBT, Salbego CG and Souza DO (2003) Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immuncontent. *Brain Res* 986:196-199.

Harman AW, Adamson GM and Shaw SG (1992) Protection from oxidative damage in mouse liver cells. *Toxicol Lett* 64-65:581-587

Helzlsouer K, Jacobs R and Morris S (1985) Acute selenium intoxication in the United States. *Proc Fed Am Soc Exp Biol* 44:1670.

Jedlicka P, Mortin MA and Wu C (1997) Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor *in vivo*. *EMBO J* 16: 2452-2462.

King V and Tower J (1999) Aging-Specific Expression of *Drosophila hsp22*. *Dev Biol* 207:107–118.

Klotz L and Sies H (2003) Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol Lett* 140: 125-132.

Kobayashi T, Ohta Y and Yoshino J (2001) Preventive effect of ebselen on acute

gastric mucosal lesion development in rats treated with compound 48/80. *Eur J Pharmacol* 414:271-279.

Kono H, Arteel GE, Rusyn I, Sies H and Thurman RG (2001) Ebselen prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *Free Rad Biol Med* 30:403–411,

Lange BMH, Bachi A, Wilm M and Gonzalez C (2000) Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *EMBO J* 19:1252-1262.

Leal SM and Neckameyer WS (2002) Pharmacological evidence for GABAergic regulation of specific behaviors in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* 50:245-261.

Leibovitz B, Hu ML and Tappel AL (1990) Dietary supplements of vitamin E, beta-carotene, coenzyme Q10 and selenium protect tissues against lipid peroxidation in rat tissue slices. *J Nutr* 120:97-104.

Lewgoy F and Cordeiro AR (1971) Ação genética e somática do selênio em *Drosophila melanogaster*. *Cienc Cult* 23:108.

Lindquist S (1986) The heat shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151–1191.

Maciel EN, Bolzan RC, Braga AL and Rocha JBT (2000) Diphenyl Diselenide and Diphenyl Ditelluride differentially affect  $\alpha$ -aminolevulinatase from liver, kidney and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* 14:310-319.

Martin-Romero FJ, Kryukov GV, Lobanov AV, Carlson BA, Lee BJ, Gladyshev VN and Hatfield DL (2001) Selenium metabolism in *Drosophila*: selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality. *J Biol Chem* 276:29798-29804.

May SW (1999) Selenium-based drug design: rationale and therapeutic potential. *Exp Opin Invest Drugs* 8:1017–1030.

May SW (2002) Selenium-based pharmacological agents: an update. *Exp Opin Invest Drugs* 11:1261–1269.

Meotti FC, Borges VC, Zeni G, Rocha JBT and Nogueira CW (2003) Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett* 143:9–16.

Meotti FC, Stangherlin E, Zeni G, Nogueira CW and Rocha JBT (2004) Protective role of aryl and alkyl diselenide on lipid peroxidation. *Environ Res* 94:276–282.

Müller A, Cadenas E, Graf P and Sies H (1984) A novel biologically active seleno-organic compound-I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem Pharmacol* 33:3235–3239.

Navarro-Alarcon M and Lopez-Martinez MC (2000) Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *The Sc Total Environ* 249:347–371.

Nogueira CW, Borges VC, Zeni G and Rocha JBT (2003) Organochalcogens effects on  $\alpha$ -aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology* 191:169–178.

Nogueira CW, Maciel EM, Zeni G, Graça D and Rocha JBT (2001) Biochemical toxicology of simple diorganoyl chalcogenides. ECSOC Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. <http://www.mdpi.net/ecsoc-5/d0013>

Painter EP (1941) The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. *Chem Rev* 28:179–213.

Parnham MJ, Leyck S, Kuhl P, Schalkwijk J and Van Den Berg WB (1987) Ebselen: a new approach to the inhibition of peroxide-dependent inflammation. *Int J Tissue React* 9:45-50.

Parsell DA and Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27:437-456.

Paulmier C (1986) Selenoorganic functional groups. In: C. Paulmier, Editor, *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis* (first ed.), Pergamon Press, Oxford, England (1986), pp. 25–51.

Picard D, Khursheed B, Garabedian MJ, Fortin MG, Lindquist S and Yamamoto KR (1990) Reduced levels of *hsp90* compromise steroid receptor action *in vivo*. *Nature* 348:166-168.

Porciúncula LO, Rocha JBT, Boeck CR, Vendite D and Souza DO (2001) Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 299: 217–220.

Rosenfeld I and Belth OA (1964) *Selenium: Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition*. 1st edition. Academic Press New York, 411pp.

Rossato JI, Ketzer LA, Centuriao FB, Silva SJ, Ludtke DS, Zeni G, Braga AL, Rubin MA and Rocha JBT (2002a) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 27:297-303.

Rossato JI, Zeni G, Mello CF, Rubin MA and Rocha JBT (2002b) Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosci Lett* 318:137-140.

Rubin GM, Yandell MD, Wortmann JR, Miklos GLG, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, *et al.* (2000) Comparative Genomics of Eukaryotes. *Science* 287: 2204-2215.

Sørensen JG, Kristensen TN and Loeschcke V (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol Lett* 6: 1025–1037.

Sørensen JG, Nielsen MM, Kruhøffer M, Justesen J and Loeschcke V (2005) Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones* 10: 312–328.

Straten AVD, Rommel C, Dickson B and Hafen E (1997) The heat shock protein 83 (Hsp83) is required for Raf-mediated signalling in *Drosophila*. *EMBO J* 16:1961-1969.

Tickoo S and Russell SS (2002) *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Curr Opin Pharmacol* 2:555–560.

Walter R, Schwartz IL and Roy J (1972) Can selenoamino acids act as reversible biological antioxidants? *Ann N Y Acad Sci* 192:175-180.

Westwood JT, Clos J and Wu C (1991) Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature* 353: 822–827.

Wilber CG (1980) Toxicology of selenium: A Review. *Clin Toxicol* 17:171-230.

Wilson SR and Zucker PA (1989) Development of Synthetic Compounds with Glutathione Peroxidase Activity. *J Am Chem Soc* 111:5936-5939.

Yang G, Wang S, Zhou R and Sun S (1983) Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr* 37:872-881.

**Table 1** – Pairwise chi-squared ( $\chi^2$ ) comparisons of the *D. melanogaster* egg to pupae developmental rate for flies fed on banana-agar medium supplemented with different molarities ( $\mu\text{mol/kg}$  of medium) of diphenyl diselenide dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The comparisons use the Benjamini and Hochberg false discovery rate method and are ranked (i) in order of decreasing  $\chi^2$  value and probability level ( $P$ ) is in increasing magnitude. The corrected p-value ( $A$ ) is equal to the p-value multiplied by the rank (i) and divided by the total number of comparisons ( $A = p \times i / 15$ ) for an error rate = 0.05. The treatments were significantly different in respect to developmental rate when  $A > P$ , with the higher diphenyl diselenide molarities showing lower development rates. The control was DMSO only and 30 *D. melanogaster* eggs were used for the control and each diphenyl diselenide concentration.

Diphenyl diselenide molarity	$\chi^2$	$P$	i	$A = 0.05 \times i / 15$	Significant ( $A > P$ )
0.00 versus 500	157.11	0.000000	1	0.00333	Yes
300 versus 500	145.13	0.000000	2	0.00667	Yes
0.00 versus 450	110.90	0.000000	3	0.01000	Yes
350 versus 500	100.53	0.000000	4	0.01333	Yes
400 versus 500	90.76	0.000000	5	0.01667	Yes
300 versus 450	88.62	0.000000	6	0.02000	Yes
0.00 versus 400	59.45	0.000000	7	0.02333	Yes
0.00 versus 350	58.83	0.000000	8	0.02667	Yes
350 versus 450	38.87	0.000000	9	0.03000	Yes
300 versus 0.00	36.91	0.000000	10	0.03333	Yes
400 versus 450	30.86	0.000000	11	0.03667	Yes
450 versus 500	25.82	0.000000	12	0.04000	Yes
300 versus 400	20.20	0.000000	13	0.04333	Yes
300 versus 350	19.66	0.000010	14	0.04667	Yes
350 versus 400	0.24	0.623300	15	0.05000	No



**Table 2** – Pairwise chi-squared ( $\chi^2$ ) comparisons of the *D. melanogaster* pupae to adult developmental rate for flies fed on banana-agar medium supplemented with different molarities ( $\mu\text{mol/kg}$  of medium) of diphenyl diselenide dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The comparisons use the Benjamini and Hochberg false discovery rate method and are ranked (i) in order of decreasing  $\chi^2$  value and probability level ( $P$ ) is in increasing magnitude. The corrected p-value ( $A$ ) is equal to the p-value multiplied by the rank (i) and divided by the total number of comparisons ( $A = p \times i / 15$ ) for an error rate = 0.05. The treatments were significantly different in respect to developmental rate when  $A > P$ , with the higher diphenyl diselenide molarities showing lower development rates. The control was DMSO only and 30 *D. melanogaster* eggs were used for the control and each diphenyl diselenide concentration.

Diphenyl diselenide molarity	$\chi^2$	$P$	i	$A = 0.05 \times i / 15$	Significant ( $A > P$ )
300 versus 500	142.00	0.0000	1	0.00333	Yes
0.00 versus 500	129.24	0.0000	2	0.00667	Yes
350 versus 500	97.44	0.0000	3	0.01000	Yes
300 versus 450	87.93	0.0000	4	0.01333	Yes
400 versus 500	84.23	0.0000	5	0.01667	Yes
0.00 versus 450	74.03	0.0000	6	0.02000	Yes
350 versus 450	36.33	0.0000	7	0.02333	Yes
0.00 versus 400	34.64	0.0000	8	0.02667	Yes
0.00 versus 350	33.16	0.0000	9	0.03000	Yes
450 versus 500	31.78	0.0000	10	0.03333	Yes
300 versus 400	28.59	0.0000	11	0.03667	Yes
300 versus 350	27.82	0.0000	12	0.04000	Yes
400 versus 450	23.13	0.0000	13	0.04333	Yes
0.00 versus 300	16.24	0.0001	14	0.04667	Yes
350 versus 400	1.04	0.3077	15	0.05000	No

**Table 3** – Pairwise chi-squared ( $\chi^2$ ) comparisons of *D. melanogaster* adult lifespan for flies fed on banana-agar medium supplemented with different molarities ( $\mu\text{mol/kg}$  of medium) of diphenyl diselenide dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The comparisons use the Benjamini and Hochberg false discovery rate method and are ranked (i) in order of decreasing  $\chi^2$  value and probability level ( $P$ ) is in increasing magnitude. The corrected p-value ( $A$ ) is equal to the p-value multiplied by the rank (i) and divided by the total number of comparisons ( $A = p \times i / 21$ ) for an error rate = 0.05. The treatments were significantly different in respect to developmental rate when  $A > P$ , with the higher diphenyl diselenide molarities showing lower development rates. The control was DMSO only and 30 *D. melanogaster* eggs were used for the control and each diphenyl diselenide concentration.

Diphenyl diselenide molarity	Significant				
	$\chi^2$	$P$	i	$A = 0.05 \times i / 21$	( $A > P$ )
0.00 versus 800	23.82	0.0000	1	0.0024	Yes
0.00 versus 700	11.71	0.0006	2	0.0048	Yes
600 versus 800	8.91	0.0028	3	0.0071	Yes
0.00 versus 900	8.88	0.0029	4	0.0095	Yes
0.00 versus 1000	6.23	0.0125	5	0.0119	Yes
0.00 versus 500	6.07	0.0138	6	0.0143	Yes
800 versus 1000	4.83	0.0280	7	0.0167	No
0.00 versus 600	3.97	0.0464	8	0.0190	No
500 versus 800	3.44	0.0637	9	0.0214	No
700 versus 800	2.71	0.0998	10	0.0238	No
800 versus 900	2.26	0.1328	11	0.0262	No
600 versus 700	2.07	0.1506	12	0.0286	No
600 versus 900	1.43	0.2313	13	0.0310	No
700 versus 1000	0.52	0.4721	14	0.0333	No
500 versus 600	0.40	0.5248	15	0.0357	No
900 versus 1000	0.37	0.5413	16	0.0381	No
600 versus 1000	0.35	0.5524	17	0.0405	No
500 versus 700	0.34	0.5583	18	0.0429	No
800 versus 900	0.16	0.6895	19	0.0452	No
500 versus 1000	0.02	0.8988	20	0.0476	No
700 versus 900	0.01	0.9413	21	0.0500	No

Figure 1

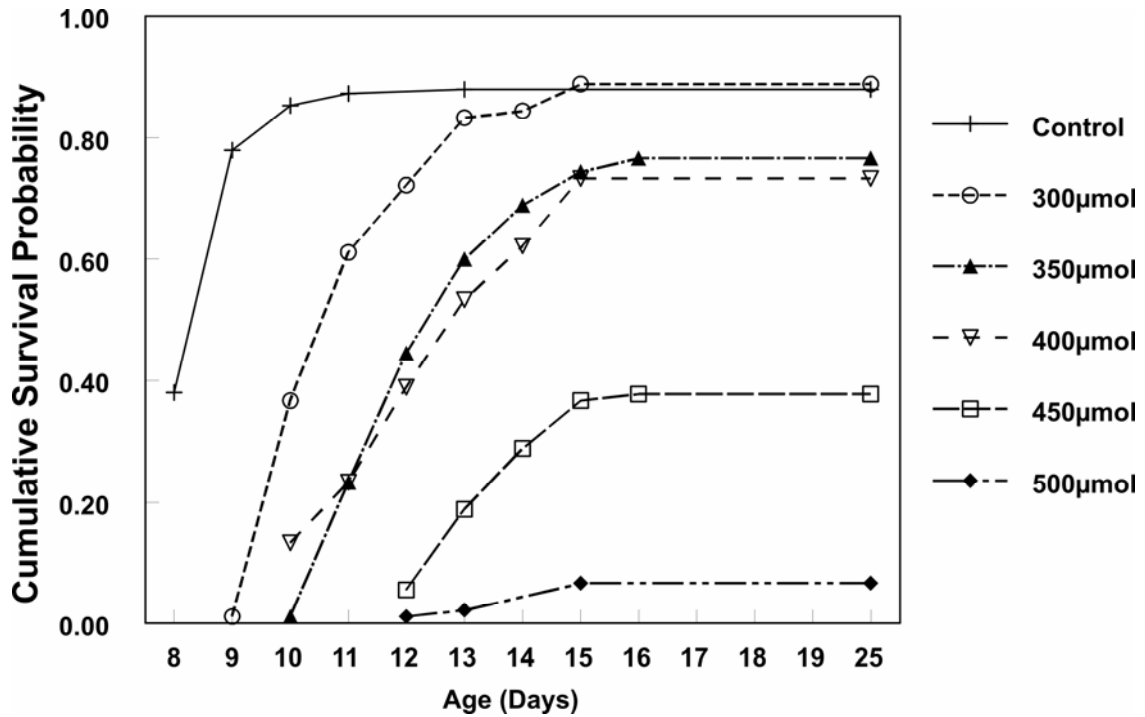


Figure 1 – Diphenyl diselenide molarity and *Drosophila melanogaster* viability and developmental delay curves for the egg to pupa stage. For each of five replicates, 30 eggs were placed on banana-agar containing different molarities of diphenyl diselenide and assessed for viability every day up to the pupal stage, the Y-axis representing the percentage of viable larvae surviving to this stage.

Figure 2

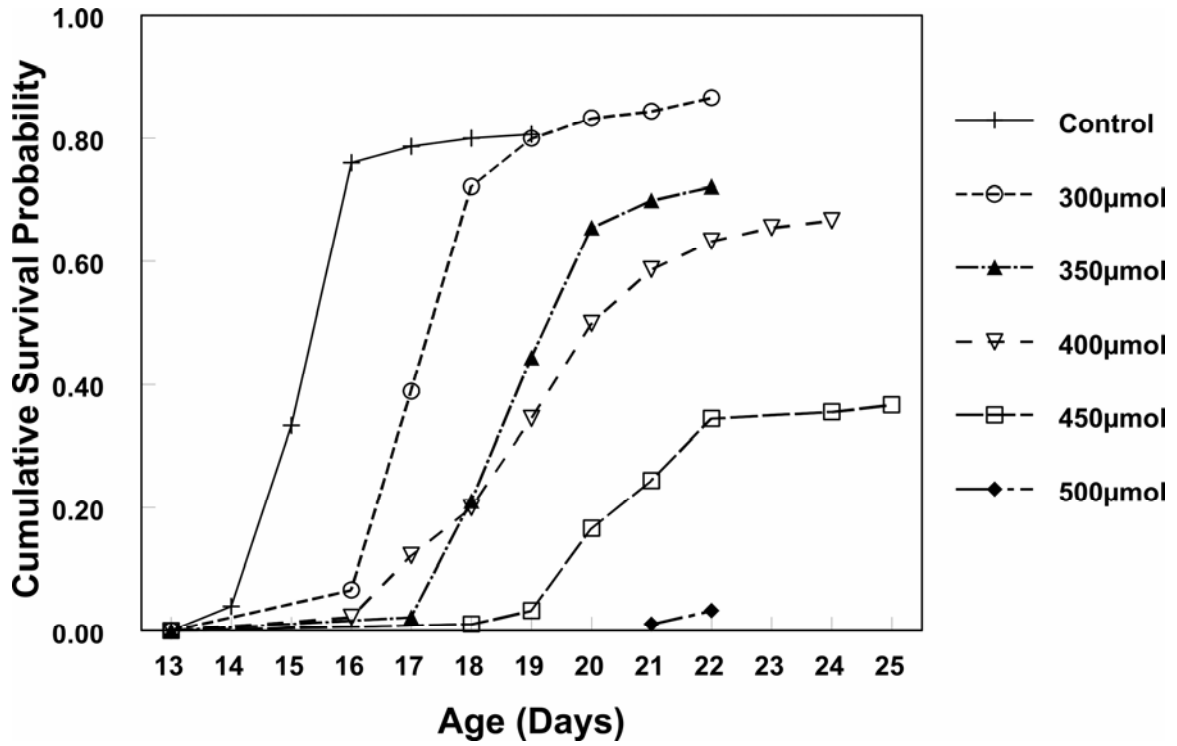
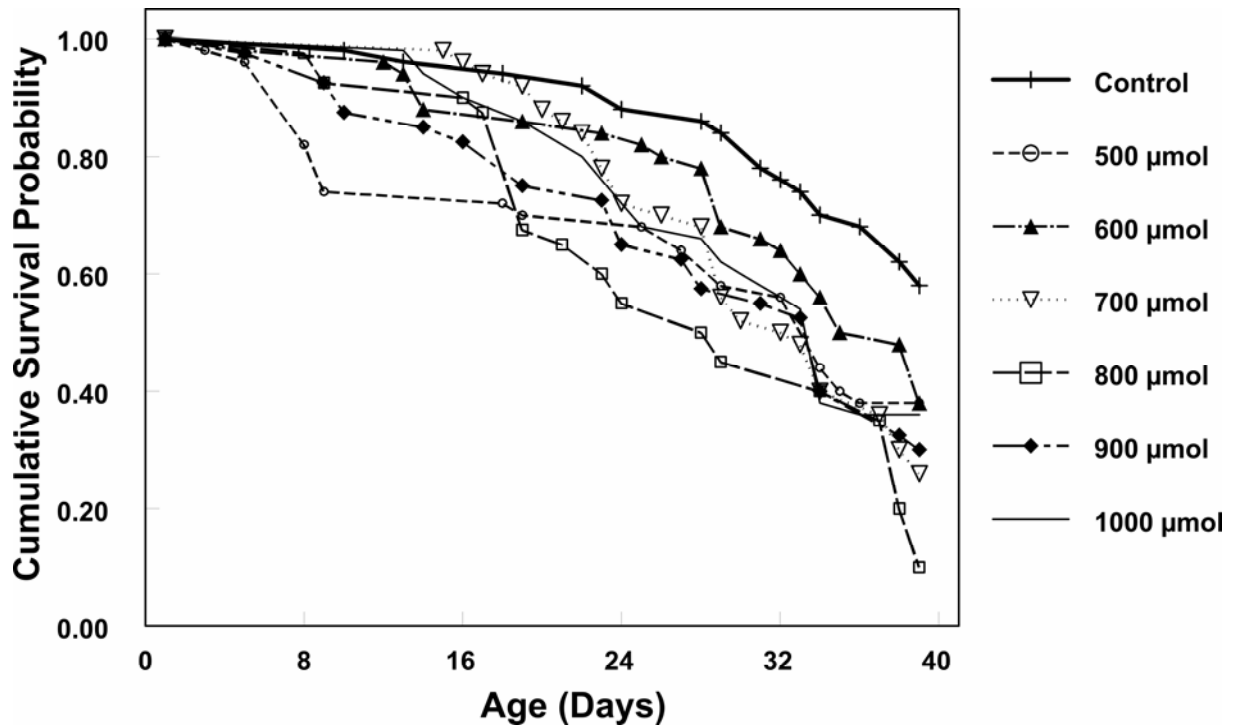


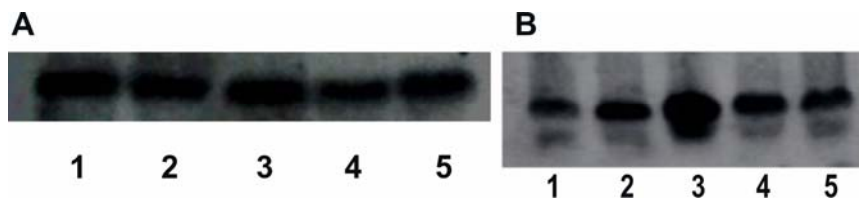
Figure 2 – Diphenyl diselenide molarity and *Drosophila melanogaster* viability and developmental delay curves for the pupa to adult stage. For each of five replicates, 30 eggs were placed on banana-agar containing different molarities of diphenyl diselenide and assessed for viability every day up to adulthood, the Y-axis representing the percentage of viable larvae surviving to this stage.

Figure 3



**Figure 3** – Diphenyl diselenide molarities and *Drosophila melanogaster* adult survival curves. For each of five replicates, 30 eggs were placed on banana-agar containing different molarities of diphenyl diselenide and assessed for viability every day up to adulthood. Data are expressed as the cumulative survival probability.

**Figure 4**



**Figure 4** – Northern blot results. A) 18s ribosomal gene; B) *D. melanogaster hsp83* gene. Total RNA was isolated from third-instar larvae raised on banana-agar media with or without diphenyl diselenide and with or without heat shock. 1) banana-agar media containing no diphenyl diselenide (control); 2) banana-agar media containing 300  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide; 3) banana-agar media containing no diphenyl diselenide and heat shocked at 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 4) banana-agar media containing 300  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide and heat shocked at 30  $^{\circ}\text{C}$ ; and 5) banana-agar media containing 800  $\mu\text{mol}$  diphenyl diselenide.

# Capítulo III

**Parâmetros do desenvolvimento de moscas do subgrupo *willistoni* de *Drosophila* em condição de estresse químico**

### III.1. Introdução

O gênero *Drosophila* compreende mais de 1.700 espécies (Bächli, 2006) de moscas pequenas, distribuídas praticamente em todas as regiões do mundo. A maioria delas se alimenta de microrganismos presentes em fungos e em vegetais em decomposição. Algumas espécies são mais restritas ecologicamente, utilizando como sítio de desenvolvimento e reprodução somente uma espécie hospedeira; outras são mais versáteis, podendo utilizar uma variada gama de recursos em diferentes fungos e/ou plantas. Por estes motivos, na coleta de Drosophilidae, geralmente são usadas armadilhas com iscas de frutas fermentadas (revisão em Carson, 1971). Entre as espécies de *Drosophila* atraídas pelas iscas de frutas, as espécies do subgrupo *willistoni* salientam-se pela sua ubiqüidade, especialmente ao longo da vasta área que compreende a região amazônica e a América Central, onde chegam a conviver em simpatria, mais de quatro das espécies crípticas.

O subgrupo da *D. willistoni* inclui seis espécies crípticas, de morfologia praticamente idêntica, mas perfeitamente diferenciáveis por testes de cruzamento, padrões enzimáticos espécie-específicos revelados por eletroforese (Garcia *et al.*, 2006), padrões de bandas cromossômicas nos núcleos politênicos (Burla *et al.*, 1949, Dobzhansky e mais recentemente Rohde *et al.*, 2006) e algumas características morfológicas da sua genitália externa de machos e interna das fêmeas (revisão em Ehrman e Powell, 1982).

O grupo *willistoni* de *Drosophila* e em especial as espécies crípticas que dele fazem parte, foram eleitos pelo eminente evolucionista Theodosius Dobzhansky como seu objeto de estudo no Brasil, onde permaneceu por vários anos desde o fim da década de 1940, sendo que deste grupo de organismos vieram muitas evidências que deram suporte à Teoria Sintética da Evolução do Século XX, da qual ele foi um dos artífices.

O grupo *willistoni* pertence ao subgênero *Sophophora*, e é formado por 25 espécies neotropicais (Throckmorton, 1975), das quais, seis delas são crípticas, e quase indistinguíveis do ponto de vista de sua morfologia externa (Ehrman e Powell, 1982; Grimaldi, 1990; Cordeiro e Winge, 1995; Gleason *et al.*, 1998). São



elas: *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana*, havendo ainda sub-especiação em *D. willistoni* (*willistoni willistoni* e *willistoni quéchua*) e em *D. tropicalis* (*tropicalis tropicalis* e *tropicalis cubana*) (revisão em Cordeiro e Winge, 1995). Como se vê em Spassky *et al.*, (1971), suas distribuições geográficas são amplas e parcialmente sobrepostas, sendo *D. willistoni* a de maior área, seguida pela *D. paulistorum*, que possui 6 semi-espécies, *D. equinoxialis*, *D. tropicalis* e as duas outras, de menor distribuição, sendo *D. insularis* endêmica das ilhas do Caribe.

No vasto território ocupado pelo grupo *willistoni*, muitos climas diferentes ocorrem, bem como muitos substratos vegetais são explorados por estas espécies, daí o interesse de estudá-las do ponto de vista de sua resposta a estresses. Assim, Bonorino *et al.*, (1993 a, b) avaliaram a resposta aos estresses - choque de calor e anoxia no grupo *willistoni* de *Drosophila*, estabelecendo o perfil de proteínas induzíveis pelos tratamentos. Já Saavedra (1999) encontrou diferenças na longevidade e mortalidade em *Drosophila willistoni* relacionadas com o clima (invernos frios ou moderados) de onde as amostras provinham. Esses achados sugerem que a seleção natural opera diferencialmente sobre os genomas na natureza, maximizando as defesas contra estresses atuantes nos diferentes ambientes.

Por outro lado, recentemente foi demonstrado (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007), que, ao contrário de todas as outras espécies seqüenciadas, *D. willistoni* parece ter perdido homologia com tRNA de selenocisteína no seu genoma, tornando-se o primeiro animal conhecido a perder as selenoproteínas. Daí também a importância de se avaliar a resposta desta espécie e de suas espécies crípticas a estresses químicos, como exposição a doses não fisiológicas de Selênio e a compostos tóxicos como o Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium-dichloride), herbicida conhecido como potente gerador de moléculas reativas de Oxigênio.

O Selênio é um micronutriente essencial na dieta e de fundamental importância para a saúde. O principal efeito desse elemento é provavelmente mediado por selenoproteínas, no qual é covalentemente incorporado na forma do aminoácido raro selenocisteína, o 21º aminoácido (Hatfield e Gladyshev, 2002). A

maioria das selenoproteínas parece ter um papel como antioxidante ou nas reações de oxi-redução. Como componente de enzimas antioxidantes, o selênio ajuda a proteger as células dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Morey *et al.*, 2003), o qual inclui peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e o radical Hidroxil. Experimentos realizados principalmente com linhagens mutantes de *D. melanogaster* para função nula do gene da selenofosfato sintetase, enzima chave para a biossíntese de selenoproteínas, demonstraram que nas células ocorre acúmulo de ROS que entra em apoptose (Alsina *et al.*, 1999).

O consórcio internacional para o seqüenciamento de 12 genomas de *Drosophila* (*Drosophila* 12 genomes consortium, 2007), em suas análises de predição de genes não encontraram o tRNA de selenocisteína no genoma de *D. willistoni*, tornando-se o primeiro animal conhecido a perder as selenoproteínas. Se corretos, esta observação é um fato notável dada a ubiquidade das selenoproteínas e de sua maquinaria de biossíntese em metazoários e sua importância na toxicidade do excesso de selênio e na proteção contra o estresse oxidativo mediado pelas selenoproteínas. Entretanto, continua sendo possível que esta espécie codifique selenoproteínas por outro caminho (*Drosophila* 12 genomes consortium, 2007).

### **III.1.1. Proteínas de Choque Térmico**

Todos os organismos respondem ao calor pela indução da síntese de um grupo de proteínas chamadas de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP). Sua descoberta foi consequência da indução de um grupo de pufes em cromossomos politênicos de larvas de *Drosophila busckii* expostas a um choque térmico e a DNP (2,4-dinitrofenol) por Ritossa (1962). Em outros estudos, observaram-se que: (1) os pufes são induzidos em vários outros tratamentos de estresse (Ashburner, 1970, 1972), (2) eles são produzidos em poucos minutos (Ashburner, 1970), (3) estão associados aos RNAs recém sintetizados (Ritossa, 1962) e (4) são encontradas em outras espécies de *Drosophila* e em muitos diferentes tecidos (Ritossa, 1964; Berendes, 1965).

A análise molecular mostrou que estes pufes coincidem com a síntese de novas proteínas, e, estas respostas, levaram-nos a se tornarem um sistema modelo para a investigação da estrutura e regulação do gene. Os genes de *hsps* de *Drosophila* estão entre os primeiros genes eucarióticos a serem clonados (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1979); a ter sua estrutura de cromatina determinada antes e depois da ativação (Keene *et al.*, 1981); a ter suas seqüências regulatórias identificadas (Pelham, 1982) e possuir os fatores de transcrição interagindo com esta seqüência caracterizada (Wu, 1985).

A resposta ao choque térmico é um conservado e bem conhecido sistema genético que existe em todos os organismos, de Archaeobacteria a Eubactéria, de plantas até animais. Embora certas características da resposta variem de organismo para organismo, muitas são universais (Lindquist, 1986; Lindquist e Craig, 1988; Georgopoulos e Welch, 1993). Originalmente fora descrita em *Drosophila* como resposta as altas temperaturas, origem de seu nome. As respostas ao choque térmico, são reguladas por diversos estresses, incluindo choque de frio, dissecação, anoxia e a exposição de uma ampla gama de metais pesados, etanol e outros contaminantes. Além disso, as HSPs estão presentes em todos os organismos em temperaturas normais e desempenham funções no funcionamento normal da célula (Lindquist, 1986; Lindquist e Craig, 1988; Parsell e Lindquist, 1993; Feder e Hofmann, 1999; Rinehart *et al.*, 2007).

Em todos os organismos, a indução das HSPs é rápida e intensa, e existe uma notória relação entre a temperatura de indução e a temperatura no ambiente do organismo. Em diferentes organismos uma dada temperatura pode induzir diferentes respostas. Assim, em *Drosophila melanogaster* a indução das HSPs ocorre entre 33-37 °C, temperaturas comuns nos dias quentes de verão (Lindquist, 1980). Já em bactérias termofílicas, que crescem a 50 °C, as proteínas são induzidas quando a temperatura sobe para 60 °C (Daniels *et al.*, 1984). Em peixes árticos que crescem a 0 °C elas são induzidas de 5-10 °C, em mamíferos elas são induzidas pela febre e na soja, no campo, pelas temperaturas comuns em dias ensolarados e quentes (Kimpel and Key, 1985; Li and Laslo, 1985; Lindquist e Craig, 1988). Um exemplo particularmente interessante é fornecido por uma variedade de patógenos dimórficos que têm uma fase em temperaturas

baixas e outra em temperaturas mais elevadas em seus mamíferos hospedeiros. Esta mudança de temperatura é acompanhada por uma forte indução das HSPs em ambos os patógenos, procarióticos e eucarióticos, estando estas proteínas relacionadas a antígenos imunodominantes em muitas dessas infecções. Anticorpos e células T circulantes demonstraram ter especificidade pelas principais proteínas HSPs de organismos tão diversos quanto *Mycobacterium leprae* (Agente causador da Hanseníase), *M. tuberculosis* (Tuberculose), *Coxiella burnetti* (Febre Q), *Plasmodium falciparum* (Malária), *Schistosoma mansoni* (Esquistossomose), *Brugia malayii* (Filariose), *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas) e *Leishmania major* (Leishmaniose cutânea) (Young *et al.*, 1988).

O mais convincente argumento de que as HSPs têm uma função protetora é a forte correlação entre sua indução e a indução de termotolerância. Uma série de experimentos semelhantes sobre termotolerância, realizados em cultura de células de uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos, soja, moscas das frutas e camundongos foram realizados. As observações mostraram que um grupo de células ou o próprio organismo morre rapidamente quando transferido diretamente de uma temperatura normal de crescimento para uma alta temperatura, enquanto um grupo correspondente, o qual foi induzido as HSPs por um tratamento de pré-aquecimento, a morte foi muito mais lenta. Além disso, tratamento de pré-aquecimento induz tolerância a outras formas de estresse e outras formas de estresse induzem tolerância ao calor. Assim, aparentemente, as HSPs seriam induzidas por estresse moderado, não necessariamente letal, para proteger o organismo de um estresse mais intenso. Estes estudos sugerem que em temperaturas moderadas a resposta é transitória na maioria dos organismos, com o retorno das atividades normais depois de uma pausa temporária e mantida em altas temperaturas até as células começarem a morrer lentamente (Lindquist, 1986; Lindquist e Craig, 1988). Genes muitos semelhantes aos genes de *heat-shock* os quais são expressos constitutivamente e talvez não induzidos por estresses são denominados de genes *heat-shock cognate* (hscs) (Becker e Craig, 1994).

Entretanto, é na biossíntese de proteínas que as HSPs desempenham sua função mais importante, agindo como chaperonas moleculares, auxiliando

polipeptídeos nascentes a assumirem sua conformação tridimensional correta. Da mesma forma, as HSPs protegem as células da desnaturação e agregação de polipeptídios induzidos durante o estresse, aumentando as chances de sobrevivência da célula (Lindquist e Craig, 1988; Becker e Craig, 1994; Feder e Hofmann, 1999).

Um dos mecanismos que pode explicar a origem da variabilidade genética nas populações são aqueles envolvendo os elementos transponíveis (Capy *et al.*, 1997). Os elementos transponíveis são um potente agente mutagênico com potencial para produzir amplas alterações no genoma de seus hospedeiros (Kidwell e Lisch, 2000; 2001; Kidwell, 2002). A quantidade de “mutações” induzidas pela atividade dos elementos de transposição estende-se desde modificações no tamanho e arranjo de genomas inteiros à substituição, deleção e inserção de um único nucleotídeo. Elementos transponíveis induzem rearranjos cromossômicos como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas. Esta atividade proporciona o potencial de pequena e grande escala na reorganização, amplificação e redução do genoma (Kidwell, 2002).

## III.2. Material e métodos

### III.2.1. Estoques de *Drosophila*

Os seguintes estoques foram utilizados: *Drosophila willistoni* México; *D. tropicalis* Catatumbo (Venezuela); *D. paulistorum* Ribeirão Preto (Brasil); *D. equinoxialis* Tefé, Amazonas (Brasil); *D. insularis* St Kitts e os mutantes de *Drosophila willistoni*, *Sepia* e *white*. Todas as linhagens foram mantidas por cruzamento massal em câmara de temperatura a  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , em tubos contendo meio de cultura padrão (Klein *et al.*, 1999).

#### III.2.1.1) Indução de estresses químicos

Compostos utilizados nos estudos de viabilidade e estresse químicos:

**A)** *Paraquat* - [dichloride.(1,1-dimethyl-4,4-bipyridinium)], ( $\text{Cl}_2\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2 \cdot 2\text{Cl}$ ), um composto conhecido por sua capacidade intrínseca de geração de espécies reativas de oxigênio, em especial do radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e por esta característica é utilizado comercialmente em pesticidas, em especial herbicidas, de uso agropecuário. Acredita-se que os radicais peróxidos e superóxidos sejam responsáveis pelos efeitos letais apresentado por esse composto. Em *Drosophila melanogaster*, a resistência ao paraquat está relacionada à longevidade (Arking *et al.*, 1991; Cunha *et al.*, 1995). Dessa forma, este composto (*Paraquat* - Methyl Viologen - Sigma<sup>®</sup>) foi empregado para as diluições dos diferentes tratamentos.

**B)** *Disseleneto de difenila* -  $(\text{PhSe})_2$ , um organocalcogênio, cujo uso provocou estresse celular, atrasou o desenvolvimento, diminuiu a viabilidade e causou aumento na expressão da *hsp83* em *D. melanogaster* (Golombieski *et al.*, 2008- Capítulo II desta Tese). Este composto foi sintetizado no Laboratório de Química Orgânica do Prof. Dr Gilson Zeni, Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, RS - Brasil.

## **III.2.2. Determinação da viabilidade das espécies em diferentes concentrações dos agentes químicos**

### **III.2.2.1. Meios de cultura**

Para a preparação dos meios de cultura com os agentes químicos foi feita uma solução estoque de 15 mM (PhSe)<sub>2</sub> dissolvido em Etanol, 100 mM de Paraquat dissolvido em água .

Os meios de cultura continham:

- 1 litro de água;
- 10g de agar bacteriológico;
- 10g de levedo de cerveja;
- 10g de leite em pó;
- 20g de Açúcar;
- Anti-fúngico – 8 mL de solução etanólica de Nipagin® a 10%.

Estes meios foram preparados da seguinte forma: misturou-se o agar e o açúcar em 700 mL de água. Ferveu-se para dissolver o agar e em seguida foram misturados os restantes dos componentes e a água. Após a mistura estar homogeneizada, foi adicionado o produto químico da solução estoque, até atingir a concentração final desejada. Em seguida, o meio foi distribuído em frascos com aproximadamente 20g de meio/frasco. As concentrações estudadas para (PhSe)<sub>2</sub> variaram de 100-600 µmol/kg meio de cultura e para os tratamentos Controle foi adicionado apenas Etanol na mesma quantidade do tratamento. Para o estudo da viabilidade das populações com paraquat, as concentrações variaram de 5-60 mM/g de meio de cultura, e para os tratamentos Controle, foi adicionado apenas água ao meio de cultivo.

### **III.2.3. Desenvolvimento dos ovos de *Drosophila* em meios de cultura**

As moscas foram colocadas para ovopositarem em placas de petri (1cm X 7,5cm) contendo meio especial de ovoposição, preparado com: 100 mL de água; 50g de banana madura; 1,5g de Agar bacteriológico; 0,1g de Nipagim<sup>®</sup> fervido por 5 minutos e após colocava-se corante alimentar vermelho até obter a coloração desejada. A finalidade deste corante foi facilitar as visualizações dos ovos.

Os ovos foram retirados das placas de petri com auxílio de uma agulha histológica, e tratados com Hipoclorito de sódio (Alvejante comercial 10%) para reduzir a quantidade de microorganismos aderidos aos ovos que poderiam proliferar no meio de cultura e interferir no crescimento e sobrevivência das larvas. Para este tratamento, os ovos foram transferidos para uma cesta feita de tela de aço inox de 1,5 X 1,5 cm e mergulhados em uma solução de 10% de alvejante comercial, por 10 seg e posteriormente em água destilada por mais 10 seg.

Após esta assepsia, 30 ovos/frasco foram colocados nos meios de cultura dos tratamentos.

Os tratamentos foram acompanhados diariamente, para observação das mudanças de estágios Ovo-pupa e posteriormente de Pupa para Imago.

#### **III.2.4. Análise estatística**

Os dados de desenvolvimento dos ovos e de sobrevivência foram submetidos à Análise de sobrevivência, teste de Kaplan-Meyer ao nível mínimo de 95% de significância ( $P < 0,05$ ) com o auxílio do programa "SPSS for Windows", versão 10.0.1 (Copyright<sup>®</sup> SPSS Inc., 1989-1999). Para a montagem dos gráficos foi utilizado o programa "SlideWrite Plus 4.0" (Advanced Graphics Software Inc. USA, 1996).

#### **III.2.5. Análise molecular das expressões dos Genes das Proteínas de Choque térmico e Elemento transponível *P* por PCR em Tempo Real**



### III.2.5.1 Oligonucleotídeos para a reação de PCR em tempo Real

Para os desenhos dos *primers* dos genes de expressão constitutiva Actina e Tubulina, utilizados como controle da expressão, foram realizadas buscas nos “contigs” do genoma de *D. willistoni*, através de BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi?organism=insects](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=insects)) usando como referência os genes de *D. melanogaster* e obtendo-se uma seqüência consenso através da qual foram desenhados os pares de *primers*. Para o gene da  $\beta$ -actina, foram eles: ActinaSense 5' TGTGTGACGAAGAGGTTGCT 3' e ActinaAnti 5'TACGAGTCCTTTTGTCCCAT 3', amplificando um fragmento de 140 pares de bases. Para o gene da Tubulina, os *primers* foram: TubulinSenseRT 5'CGACGAACAGATGCTCAACA 3' e TubulinAntiRT 5'GCCAATGAATGTGGCAGAC 3', e o produto amplificado deve corresponder a 130 pares de bases.

Para análise da expressão dos genes de *Heat Shock*, Hsp70 e Hsp83, foram realizadas buscas no genoma de *D. willistoni* através da ferramenta BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi?organism=insects](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=insects)) usando como referência os genes de *D. melanogaster*, para obter uma seqüência consenso. Com base nessa seqüência foram desenhados os *primers* do gene de Hsp70: 70Srtpcr 5'CGTTCTTCTGGTGGATGTGG 3' e 70Artpcr 5'GTTCGGCATAGGTGGAGAACG 3' gerando um fragmento amplificado de 130 pares de bases. Para Hsp83, os *primers* foram: 83SenseRTPCR 5'GAGGGTGATGGCAAGAAGAA 3' e 83AntiRTPCR 5'CCGTATTCCTCCTGGCTGAT 3', gerando um fragmento correspondente a 118 pares de bases.

Todos os pares de *primers* foram desenhados com o auxílio dos seguintes programas: “*Oligo Versão 3.3*” (MBI Software) e o programa *online* Primer3 [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).

### III.2.6. Extração de RNA total

Para a extração de RNA total, larvas provenientes dos tratamentos foram selecionadas e colocadas dentro de um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, homogeneizado com TRIzol<sup>®</sup> Reagent, da Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies. Todo o processo de extração seguiu as instruções do protocolo que acompanha o produto, até a ressuspensão com H<sub>2</sub>O DEPC. Para cada tratamento foram extraídas triplicadas biológicas.

### **III.2.7. Análise eletroforética dos RNAs**

As amostras de RNA foram preparadas em tampão de amostra, com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e os géis em tampão TAE 1X pH 7, na concentração de 1,0% de agarose. As corridas eletroforéticas foram realizadas em tampão TAE 1X pH 7, com voltagem de 90 V. A visualização do RNA corado com brometo de etídio foi realizada sob luz ultravioleta (transluminador HOEFER, MacroVue uv-20). Os géis de agarose foram fotografados sob luz ultravioleta por câmera digital Kodak<sup>®</sup> DC120 e, em seguida, transferidos ao computador para posterior análise.

### **III.2.8. Síntese de DNA complementar**

Após verificação da qualidade da extração dos RNAs totais, estes foram submetidos a uma reação de digestão enzimática com a enzima DNase RQ1 RNase-Free DNase (Promega), seguindo o protocolo do produto, para a eliminação de eventuais contaminações com DNAs. Em seguida, foi realizada uma reação de PCR usando 1µL deste RNA para comprovação da eficiência da atividade da DNase.

A síntese dos cDNAs foi realizada com a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), utilizando “random primers” e seguindo as orientações do fabricante do produto. Logo após, para testar a qualidade dos cDNAs, montava-se uma reação de PCR nas seguintes condições: 1 µL de cDNA, tampão 1X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2pmol de cada “primer”, 1mM de dNTPs e 1U enzima *Taq* polimerase, em 35 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 15 segundos a 60 °C e 20 segundos a 72 °C.

### **III.2.9. Quantificação das expressões gênicas por *Real Time PCR***

Para a quantificação por PCR em tempo real, cada cDNA foi diluído na proporção de 1:100 com uma concentração final de 2,5 ng/μL. O *Mix* da reação foi preparado da seguinte forma: 0,1 μM de cada *primer*, 0,1 mM de dNTPs, Tampão de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, *SYBR green* 0,1X, *Platinum Taq DNA polimerase* 0,25 U, H<sub>2</sub>O para completar o volume desejado e acrescentados 10 μL de cDNA diluídos em cada reação. Em seguida a placa contendo as reações foi colocada na máquina de PCR em Tempo Real da Applied Biosystems (7500 System SDS Software versão 1.3.1). As quantificações, o preparo, a utilização dos reagentes e os experimentos foram realizados no Laboratório de Genomas e Populações de Plantas (LGPP), do Centro de Biotecnologia da UFRGS, coordenado pelo Professor Dr. Rogério Margis.

### **III.3. Resultados sobre o desenvolvimento do subgrupo *willistoni* de *Drosophila***

#### **III.3.1. Efeito de concentrações variadas de disseleneto de difenila sobre os diferentes estágios de desenvolvimento das espécies do subgrupo *willistoni***

O selênio, embora essencial para o metabolismo para muitos seres vivos, apresenta efeitos tóxicos, quando estes são expostos a concentrações muito acima das requeridas na dieta. Este efeito pode ser evidenciado nos nossos experimentos com *Drosophila* do subgrupo *willistoni*.

Na figura 1 e tabelas 1 e 2 estão apresentados os resultados do desenvolvimento de *D. willistoni* expostas a disseleneto de difenila. Pode-se observar que houve diferenças significativas das concentrações utilizadas em relação ao tratamento controle, sendo que em concentrações acima de 500  $\mu\text{mol}$  de  $(\text{PhSe})_2$  foi verificado a inviabilidade de todos os ovos expostos. É importante ressaltar que esta tendência se manteve também nos mutantes de *D. willistoni*, *Sepia* e *white* (Figuras 3 e 5, Tabelas 5, 6, 9 e 10). Para os mutantes *Sepia* e *white*, a concentração máxima de viabilidade foi 450  $\mu\text{mol}$  de  $(\text{PhSe})_2$ . Diferenças dependentes do *background* genético das linhagens podem ser observadas nas curvas de viabilidade-sobrevivência acumuladas em *D. willistoni*, onde as linhagens mutantes *Sepia* e *white* apresentaram padrão próprio de resposta dose-dependente.

Em *D. equinoxialis* (Figura 7, Tabelas 13 e 14), o efeito do selênio, foi menos acentuado do que em *D. willistoni* e suas crípticas, a julgar pelas maiores concentrações de  $(\text{PhSe})_2$  usadas e seus efeitos menos drásticos. A viabilidade dos ovos em *D. equinoxialis* foi observada até 600  $\mu\text{mol}$  de  $(\text{PhSe})_2$ .

Nas figuras 9, 11 e 13, com as espécies *D. insularis*, *D. paulistorum* e *D. tropicalis*, respectivamente, verificou-se algumas variações na sensibilidade ao selênio das diferentes espécies crípticas do grupo *willistoni* de *Drosophila*. Nas tabelas 13, 14, 17, 18, 21, 22, 25 e 26 encontram-se as significâncias

estatísticas das diferenças entre doses e efeitos em cada uma das espécies de *Drosophila* testadas no presente trabalho.

Nas concentrações estudadas acima de 100  $\mu\text{mol}$  de  $(\text{PhSe})_2$ , passou-se a observar o efeito tóxico deste composto, uma vez que ocorreu uma diminuição na viabilidade dos ovos, sendo que muitos não atingiram o estágio de pupa. Estes resultados concordam com os descritos na literatura, onde mostrou-se que o selênio causa um efeito tóxico em diversos organismos quando estes estão expostos a concentrações acima da requerida na dieta (Wilber, 1980; Yang *et al.*, 1983; Helzlsouer *et al.*, 1985; Navarro-Alarcon e Lopez-Martinez, 2000). Após as larvas das drosófilas estudadas atingirem o estágio de pupa, o  $(\text{PhSe})_2$  possivelmente continua agindo na sua fisiologia, uma vez que elas apresentam um atraso para atingirem o estágio de mosca adulta. Porém, esse atraso deve ser consequência do selênio adquirido no estágio larval.

De uma maneira geral, as espécies do subgrupo *willistoni* são mais sensíveis ao selênio do que a *D. melanogaster*, tanto que as doses tóxicas e seus limiares são claramente menores. Isso é particularmente bem exemplificado pela comparação entre as curvas de probabilidade de sobrevivência de *D. melanogaster* (Golombieski *et al.* 2008), cuja exposição a 300 $\mu\text{mol}$  de  $(\text{PhSe})_2$  praticamente não altera a sobrevivência, e as de *D. willistoni*, para a qual a concentração de 200  $\mu\text{mol}$  do mesmo composto tem um efeito redutor muito mais acentuado.

O disseleneto de difenila afetou de forma concentração-dependente o desenvolvimento dos diferentes estágios ovo-pupa e em seguida pupa-mosca, promovendo um atraso no início destes. Além disso, o disseleneto de difenila reduziu a viabilidade dos ovos nas concentrações estudadas.

### **III.3.2. Efeito de concentrações variadas de paraquat sobre os diferentes estágios de desenvolvimento das espécies do subgrupo *willistoni***

Nas Figuras.2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14, estão apresentadas as curvas de resposta ao paraquat com *D. willistoni*, mutante *Sepia*, mutante *white*, *D.*

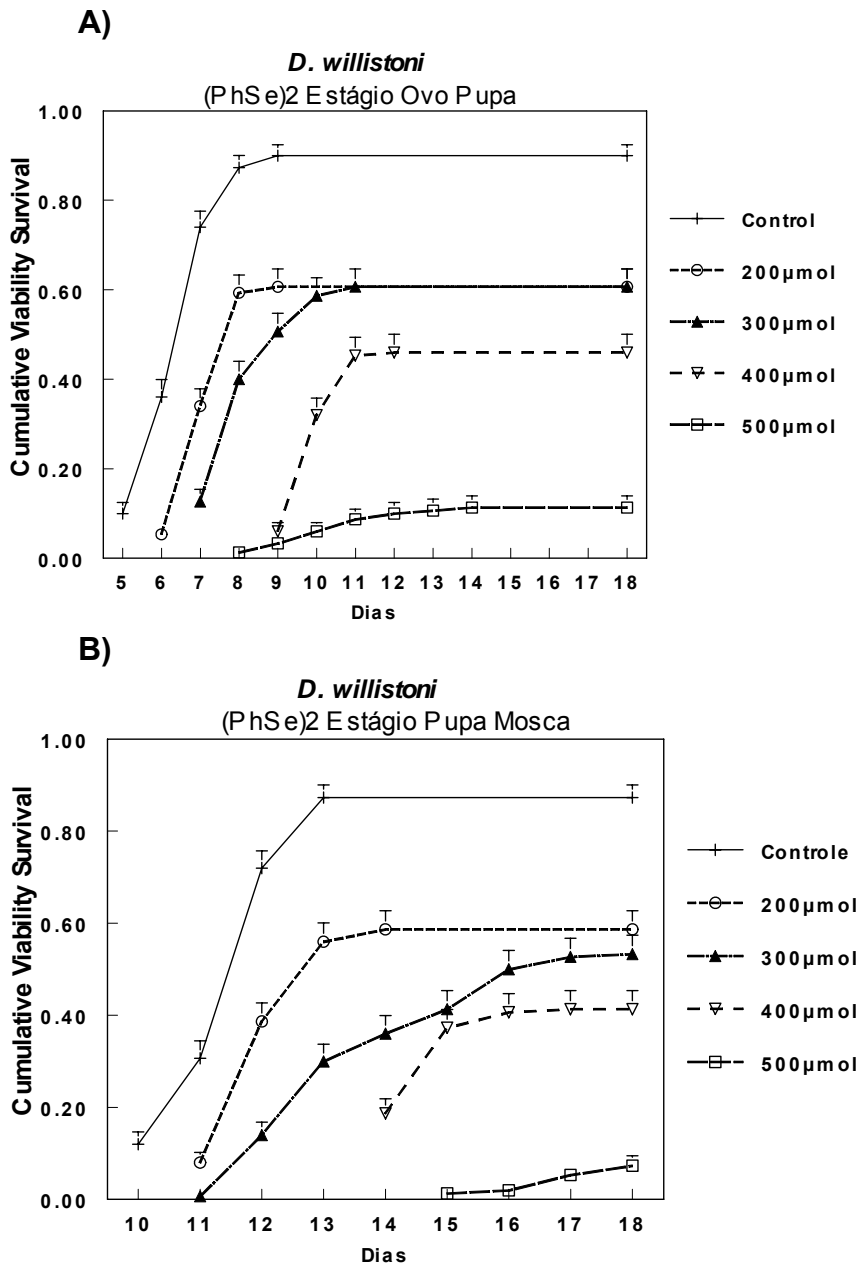
*equinoxialis*, *D. insularis*, *D. paulistorum* e *D. tropicalis*, respectivamente, e nas tabelas 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24, 27 e 28 a significância estatística das diferenças entre doses de paraquat aplicadas às espécies crípticas do grupo *willistoni* de *Drosophila*.

Pode-se observar que houve diferenças significativas das concentrações utilizadas de paraquat em relação ao tratamento controle, sendo que em concentrações acima de 30 mM de paraquat foi verificado a inviabilidade de todos os ovos expostos, para os mutantes *Sepia* e *white*. Entretanto, para as outras espécies a concentração acima de 40 mM de paraquat provocou a inviabilidade dos ovos. Assim como ocorrera para disseleneto de difenila, cabe ressaltar que para paraquat manteve-se também a tendência da viabilidade dose-dependente para todas as espécies do subgrupo.

A submissão ao paraquat e ao seu efeito causador do aumento de radicais livres, embora em concentrações bem menores do que as de (PhSe)<sub>2</sub>, resultou em decréscimos bem mais acentuados dos parâmetros de viabilidade-sobrevivência em todas as espécies do subgrupo *willistoni*.

Experimentos realizados por Cunha *et al.* (1995), com *D. melanogaster* expostas ao paraquat, concordam com os resultados do presente trabalho, onde encontraram uma diminuição da sobrevivência de machos e fêmeas após 24 e 48 h em uma concentração de 20 mM.

O quanto as diferenças de sensibilidade das espécies do grupo *willistoni* aos compostos testados refletem diferenças relacionadas à exploração de recursos mais ou menos ricos em Selênio e diferenças metabólicas em relação à *Drosophila melanogaster* acumuladas ao longo dos 50 milhões de anos que separam as radiações *melanogaster-willistoni*, entretanto, ainda é matéria para futuros estudos.



**Figura 1** – Desenvolvimento de *D. willistoni* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub>. **A)** Estágio de Ovo a Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Mosca.

**Tabela 1** – Análise da Sobrevivência de *D. willistoni* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	62,82 (0,0000)			
<b>300µmol</b>	98,16 (0,0000)	2,25 (0,1333)		
<b>400 µmol</b>	179,16 (0,0000)	25,52 (0,0000)	21,54 (0,0000)	
<b>500µmol</b>	235,51 (0,0000)	89,90 (0,0000)	88,88 (0,0000)	43,67 (0,0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 2** – Análise da Sobrevivência de *D. willistoni* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	47,19 (0.0000)			
<b>300µmol</b>	92,85 (0.0000)	5,07 (0.0244)		
<b>400 µmol</b>	159,48 (0.0000)	26,47 (0.0000)	8,15 (0.0043)	
<b>500µmol</b>	224,94 (0.0000)	98,13 (0.0000)	82,07 (0.0000)	50,37 (0.0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



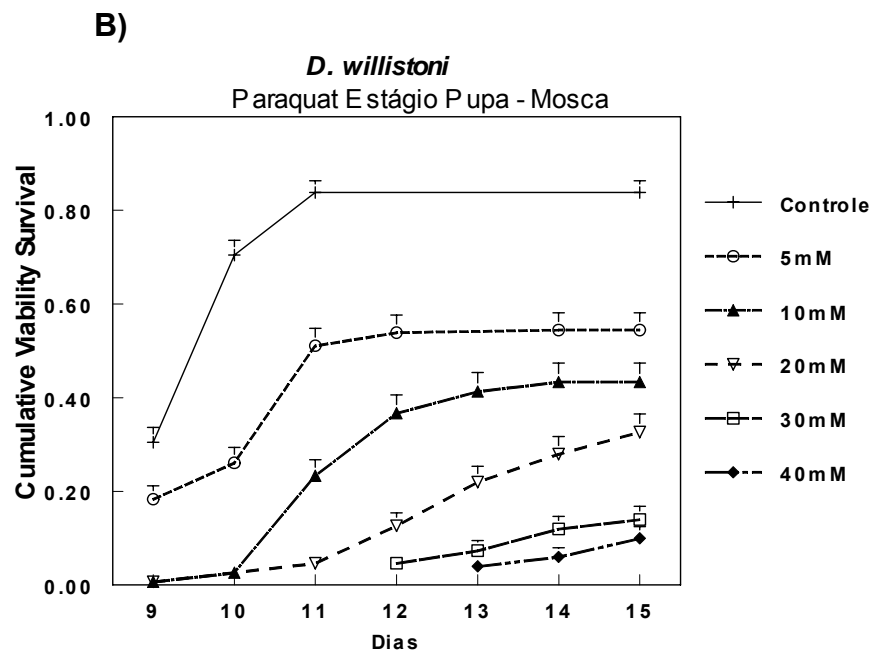
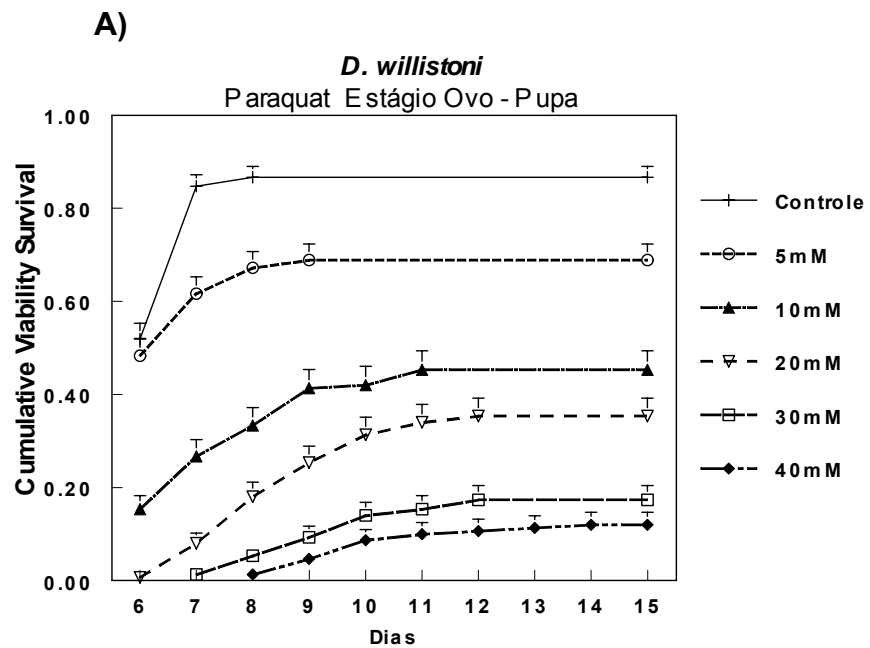


Figura 2 – Desenvolvimento de *D. willistoni* em diferentes concentrações de Paraquat. **A)** Estágio de Ovo a Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Mosca.

**Tabela 3** – Análise da Sobrevivência de *D. willistoni* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.

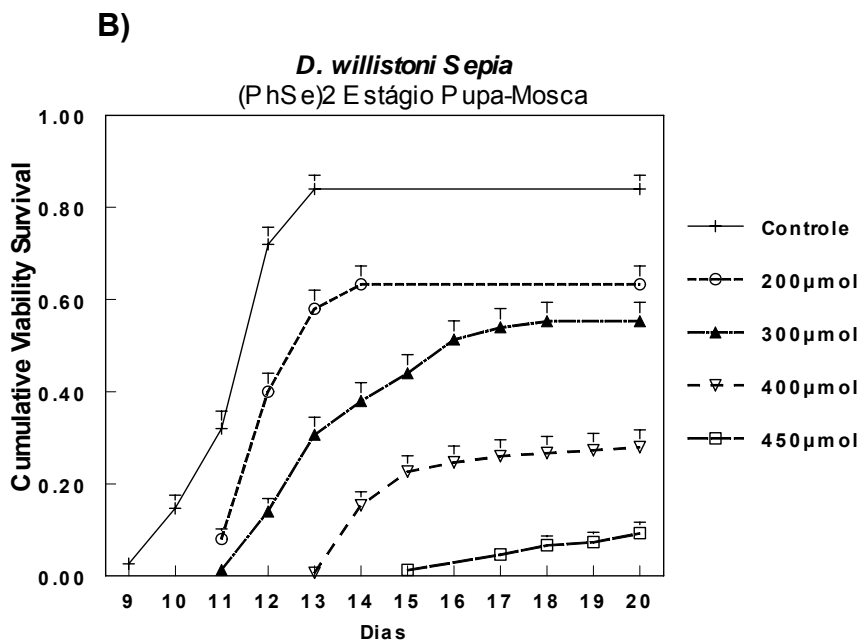
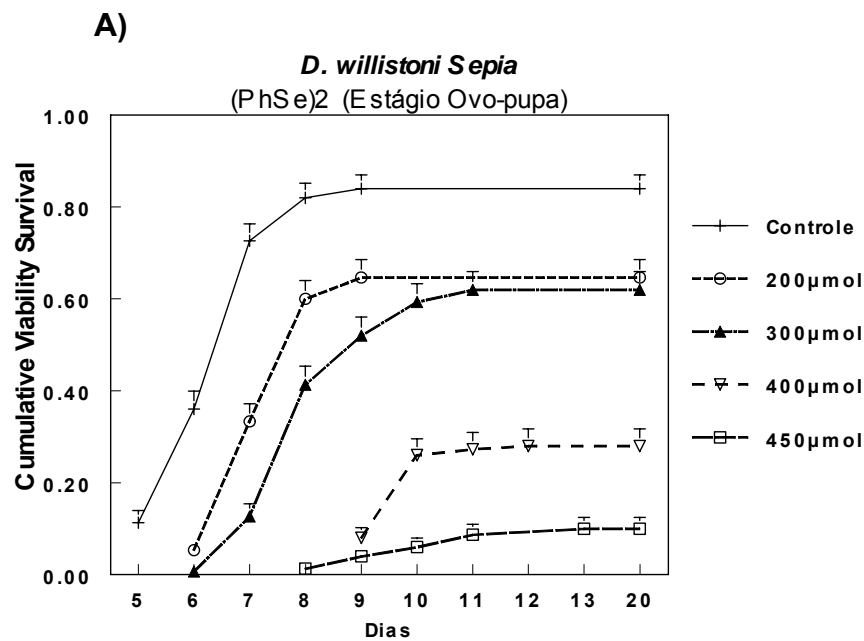
<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>
<b>5mM</b>	12,91 (0,0003)				
<b>10mM</b>	91,72 (0,0000)	27,36 (0,0000)			
<b>20mM</b>	154,13 (0,0000)	58,07 (0,0000)	5,49 (0,0191)		
<b>30mM</b>	208,21 (0,0000)	105,78 (0,0000)	32,14 (0,0000)	13,63 (0,0002)	
<b>40mM</b>	225,01 (0,0000)	123,79 (0,0000)	46,06 (0,0000)	24,61 (0,0000)	1,86 (0,1723)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 4** – Análise da Sobrevivência de *D. willistoni* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>
<b>5mM</b>	54,85 (0.0000)				
<b>10mM</b>	116,73 (0.0000)	10,48 (0.0012)			
<b>20mM</b>	148,57 (0.0000)	26,78 (0.0000)	6,51 (0.0107)		
<b>30mM</b>	199,85 (0.0000)	66,70 (0.0000)	36,26 (0.0000)	15,16 (0.0001)	
<b>40mM</b>	210,98 (0.0000)	78,50 (0.0000)	47,67 (0.0000)	24,65 (0.0000)	1,29 (0.2562)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



**Figura 3** – Desenvolvimento do mutante *Sepia* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub>. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 5** – Análise da Sobrevivência do mutante *Sepia* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.

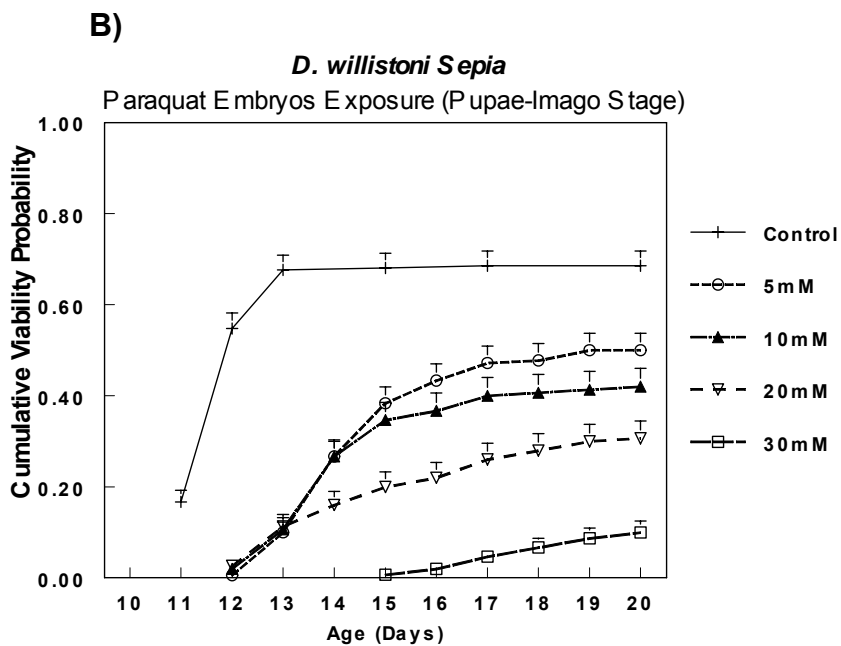
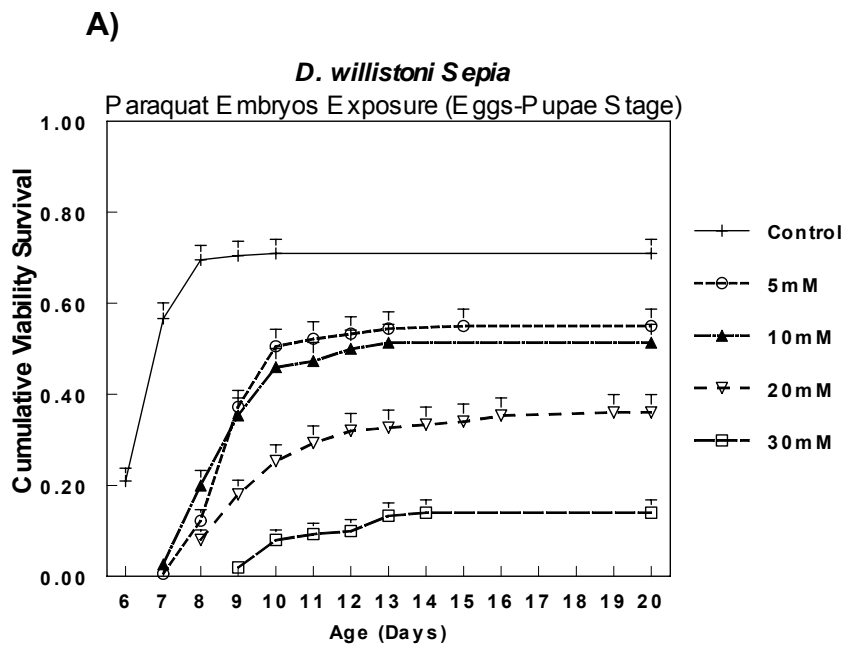
<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	40,77 (0,0000)			
<b>300µmol</b>	65,24 (0,0000)	3,70 (0,0544)		
<b>400 µmol</b>	160,30 (0,0000)	65,21 (0,0000)	50,62 (0,0000)	
<b>450µmol</b>	196,61 (0,0000)	105,78 (0,0000)	94,90 (0,0000)	14,27 (0,0002)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 6** – Análise da Sobrevivência do mutante *Sepia* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	34,48 (0,0000)			
<b>300µmol</b>	73,19 (0,0000)	7,94 (0,0048)		
<b>400 µmol</b>	156,79 (0,0000)	58,83 (0,0000)	28,74 (0,0000)	
<b>450µmol</b>	199,60 (0,0000)	107,57 (0,0000)	81,82 (0,0000)	18,87 (0,0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



**Figura 4** – Desenvolvimento do mutante *Sepia* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de Paraquat. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 7** – Análise da Sobrevivência do mutante *Sepia* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.

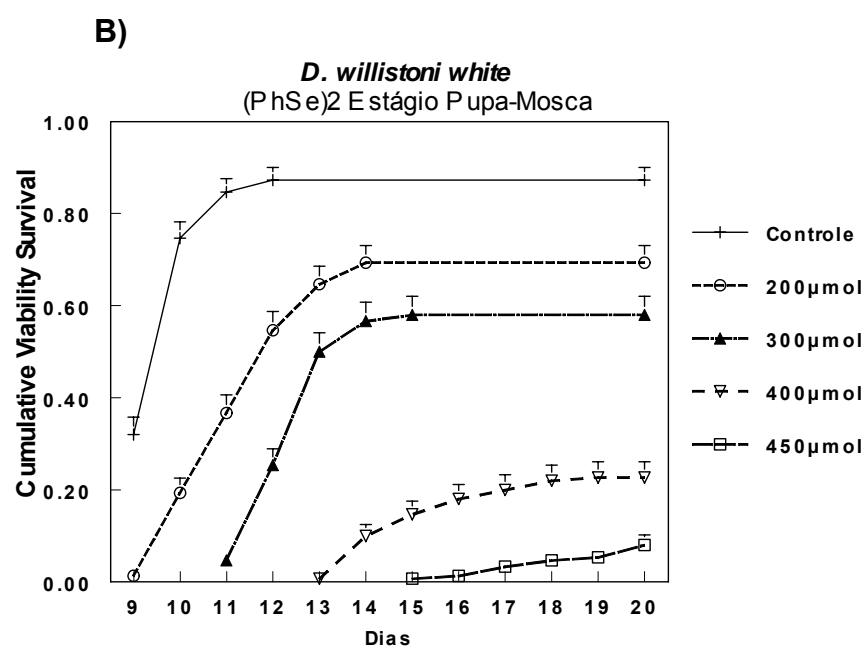
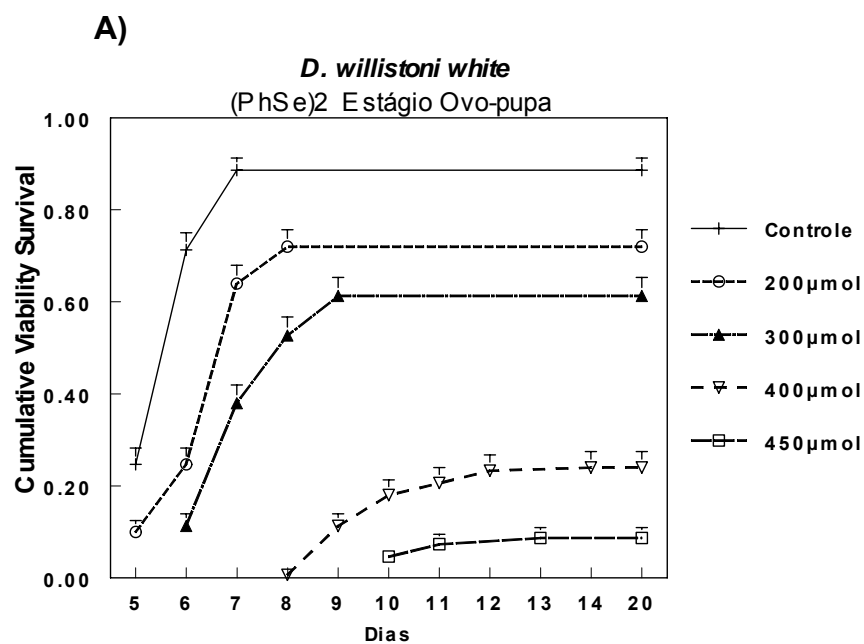
<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>
<b>5mM</b>	45,99 (0.0000)			
<b>10mM</b>	40,89 (0.0000)	0,09 (0,7601)		
<b>20mM</b>	71,00 (0.0000)	13,41 (0.0000)	9,42 (0,0022)	
<b>30mM</b>	128,82 (0.0000)	65,27 (0.0000)	54,10 (0.0000)	20,96 (0.0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 8** – Análise da Sobrevivência do mutante *Sepia* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>
<b>5mM</b>	43,16 (0.0000)			
<b>10mM</b>	49,08 (0.0000)	1,51 (0,2193)		
<b>20mM</b>	69,47 (0.0000)	11,97 (0.0005)	4,27 (0,0387)	
<b>30mM</b>	130,30 (0.0000)	65,55 (0.0000)	44,43 (0.0000)	21,75 (0.0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



**Figura 5** – Desenvolvimento do mutante *white* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub>. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 9** – Análise da Sobrevivência do mutante *white* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	43,20 (0,0000)			
<b>300µmol</b>	88,76 (0,0000)	10,39 (0,0013)		
<b>400 µmol</b>	198,85 (0,0000)	99,60 (0,0000)	60,89 (0,0000)	
<b>500µmol</b>	230,82 (0,0000)	141,41 (0,0000)	103,59 (0,0000)	13,63 (0,0002)

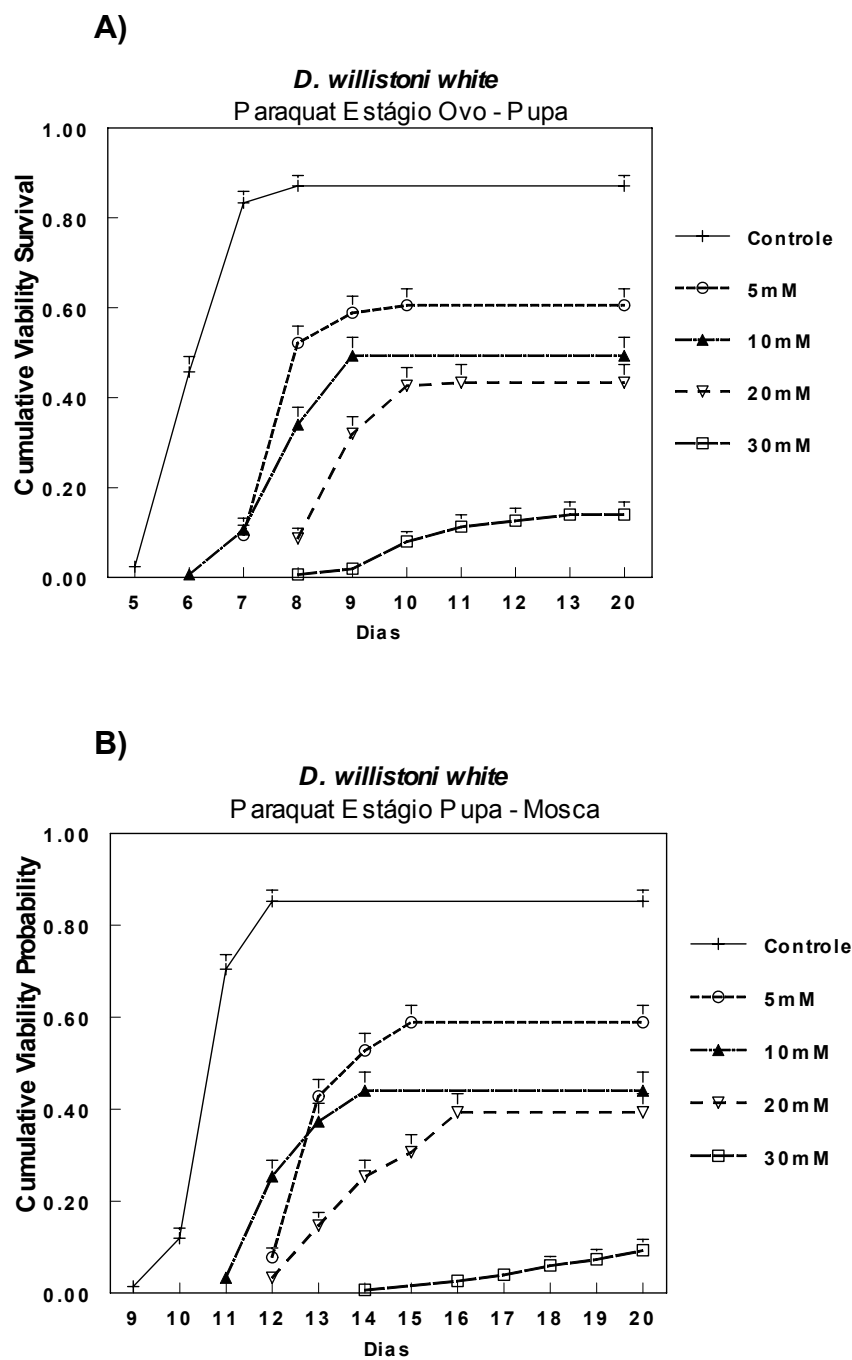
\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 10** – Análise da Sobrevivência do mutante *white* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	61,93 (0,0000)			
<b>300µmol</b>	123,03 (0,0000)	15,72 (0,0001)		
<b>400 µmol</b>	193,42 (0,0000)	94,19 (0,0000)	53,03 (0,0000)	
<b>500µmol</b>	226,76 (0,0000)	136,71 (0,0000)	93,95 (0,0000)	13,50 (0,0002)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.





**Figura 6** – Desenvolvimento do mutante *white* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de Paraquat. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 11** – Análise da Sobrevivência do mutante *white* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.

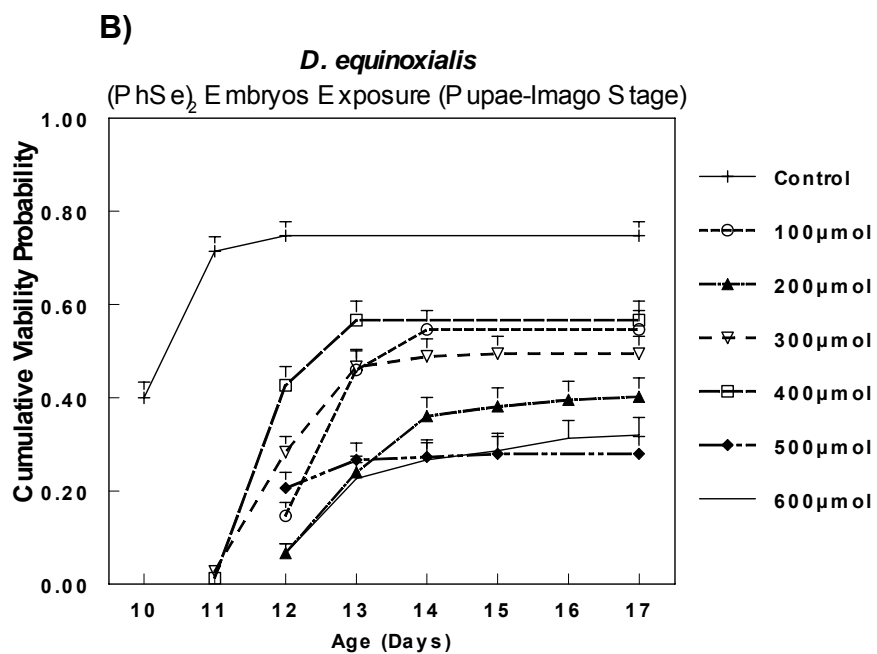
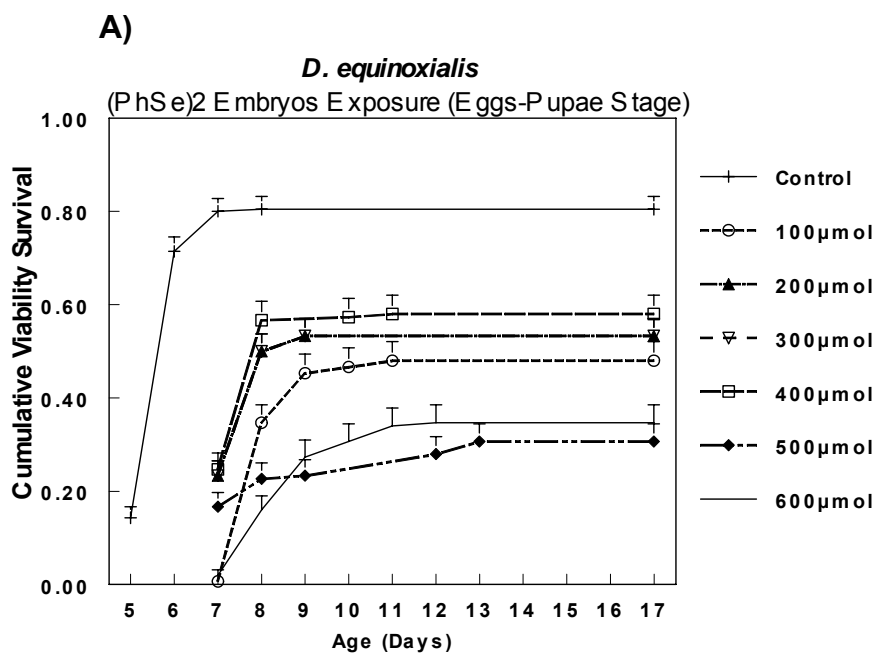
<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>
<b>5mM</b>	132,20 (0.0000)			
<b>10mM</b>	126,98 (0.0000)	4,22 (0,0400)		
<b>20mM</b>	158,04 (0.0000)	20,76 (0.0005)	4,87 (0,0273)	
<b>30mM</b>	221,79 (0.0000)	83,57 (0.0000)	50,86 (0.0000)	35,63 (0.0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 12** – Análise da Sobrevivência do mutante *white* de *D. willistoni* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>
<b>5mM</b>	127,39 (0.0000)			
<b>10mM</b>	119,07 (0.0000)	2,25 (0,1336)		
<b>20mM</b>	144,34 (0.0000)	17,36 (0.0005)	3,16 (0,0756)	
<b>30mM</b>	221,78 (0.0000)	94,48 (0.0000)	51,28 (0.0000)	40,67 (0.0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



**Figura 7** – Desenvolvimento de *D. equinoxialis* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub>. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 13** – Análise da Sobrevivência de *D. equinoxialis* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.

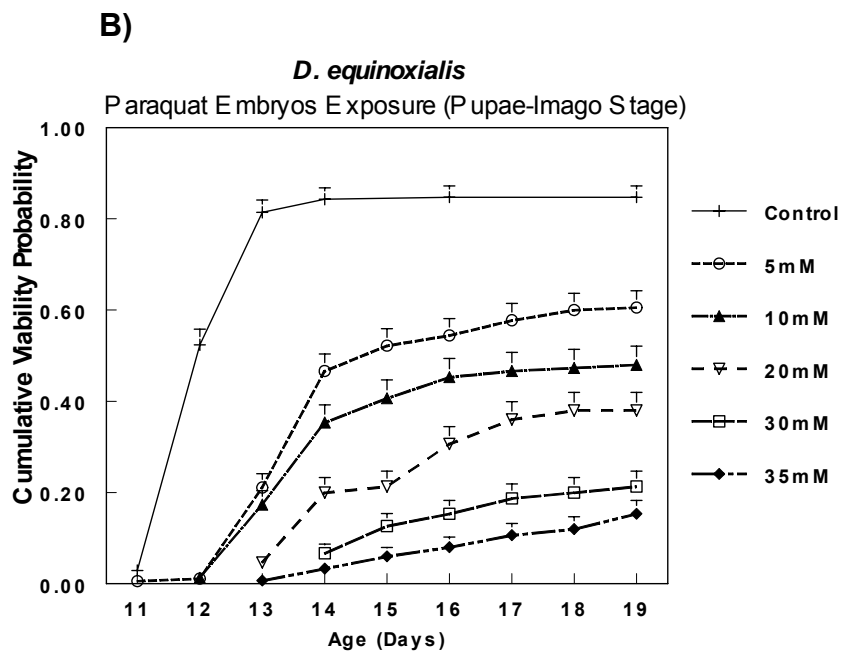
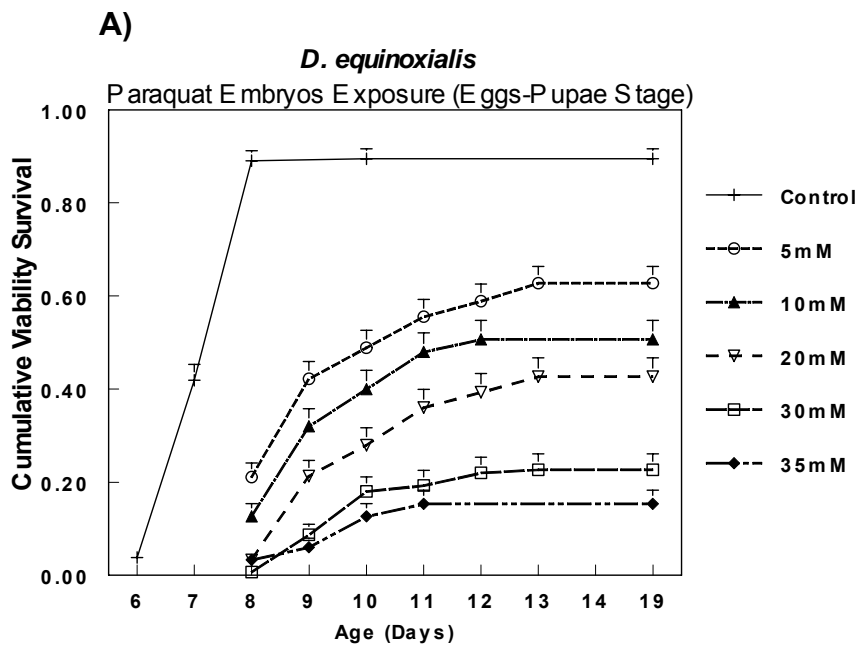
<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>100µmol</b>	<b>200µmol</b>	<b>300 µmol</b>	<b>400 µmol</b>	<b>500 µmol</b>
<b>100µmol</b>	90,19 (0,0000)					
<b>200µmol</b>	100,57 (0,0000)	5,26 (0,0219)				
<b>300 µmol</b>	96,67 (0,0000)	0,12 (0,7331)	4,87 (0,0273)			
<b>400 µmol</b>	76,95 (0,0000)	1,60 (0,2060)	9,30 (0,0023)	0,64 (0,4246)		
<b>500µmol</b>	125,93 (0,0000)	16,65 (0,0000)	6,16 (0,0131)	16,50 (0,0000)	21,70 (0,0000)	
<b>600µmol</b>	121,52 (0,0000)	21,22 (0,0000)	6,54 (0,0106)	18,28 (0,0000)	25,02 (0,0000)	0,18 (0,6731)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 14** – Análise da Sobrevivência de *D. equinoxialis* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>100µmol</b>	<b>200µmol</b>	<b>300 µmol</b>	<b>400 µmol</b>	<b>500 µmol</b>
<b>100µmol</b>	59,18 (0,0000)					
<b>200µmol</b>	82,22 (0,0000)	8,63 (0,0033)				
<b>300 µmol</b>	74,99 (0,0000)	0,00 (0,9589)	6,53 (0,0106)			
<b>400 µmol</b>	57,00 (0,0000)	2,82 (0,0930)	16,05 (0,0001)	2,48 (0,1153)		
<b>500µmol</b>	109,72 (0,0000)	16,11 (0,0001)	2,67 (0,1022)	14,77 (0,0001)	25,75 (0,0000)	
<b>600µmol</b>	99,24 (0,0000)	17,06 (0,0000)	1,91 (0,1665)	14,16 (0,0002)	25,98 (0,0000)	0,13 (0,7235)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



**Figura 8** – Desenvolvimento de *D. equinoxialis* em diferentes concentrações de Paraquat. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 15** – Análise da Sobrevivência de *D. equinoxialis* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.

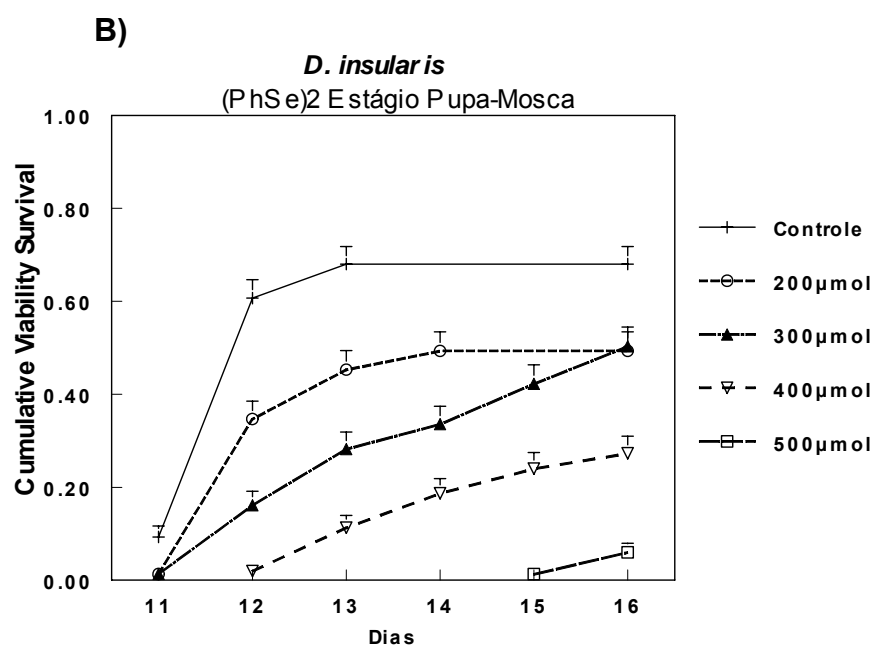
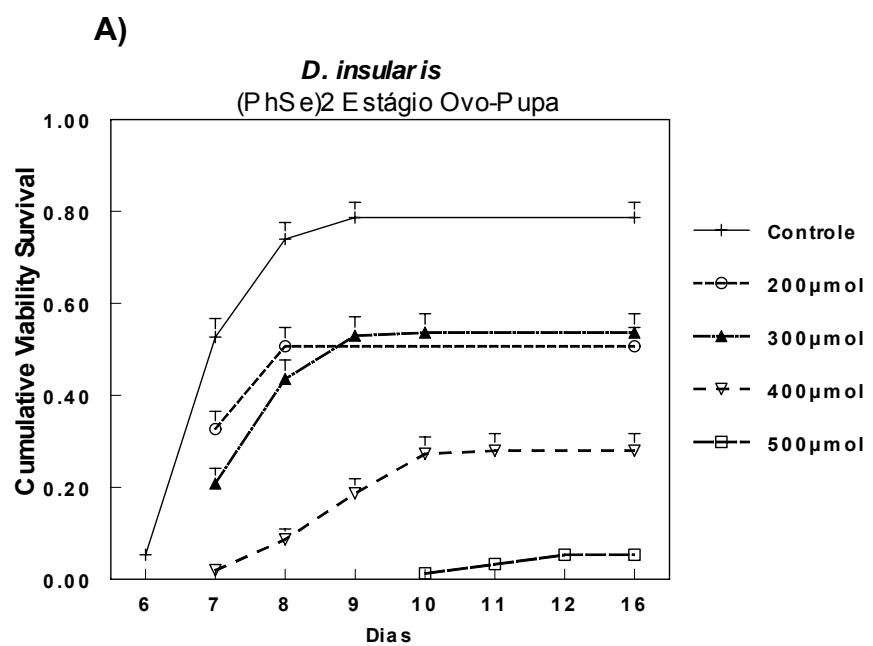
<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>
<b>5mM</b>	119,22 (0,0000)				
<b>10mM</b>	136,18 (0,0000)	5,21 (0,0225)			
<b>20mM</b>	164,89 (0,0000)	17,56 (0,0000)	3,33 (0,0680)		
<b>30mM</b>	210,02 (0,0000)	57,91 (0,0000)	28,31 (0,0000)	13,77 (0,0002)	
<b>35mM</b>	220,52 (0,0000)	77,12 (0,0000)	43,41 (0,0000)	26,16 (0,0000)	2,43 (0,1187)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 16** – Análise da Sobrevivência de *D. equinoxialis* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>
<b>5mM</b>	91,00 (0,0000)				
<b>10mM</b>	104,27 (0,0000)	4,85 (0,0277)			
<b>20mM</b>	139,72 (0,0000)	21,80 (0,0000)	5,28 (0,0216)		
<b>30mM</b>	185,59 (0,0000)	59,25 (0,0000)	28,46 (0,0000)	10,71 (0,0011)	
<b>35mM</b>	201,42 (0,0000)	77,43 (0,0000)	42,38 (0,0000)	21,40 (0,0000)	2,01 (0,1564)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



**Figura 9** – Desenvolvimento de *D. insularis* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub>. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 17** – Análise da Sobrevivência de *D. insularis* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	27,23 (0,0000)			
<b>300µmol</b>	32,19 (0,0000)	0,02 (0,9022)		
<b>400 µmol</b>	111,08 (0,0000)	24,01 (0,0000)	28,06 (0,0000)	
<b>500µmol</b>	172,95 (0,0000)	67,06 (0,0000)	76,50 (0,0000)	19,29 (0,0000)

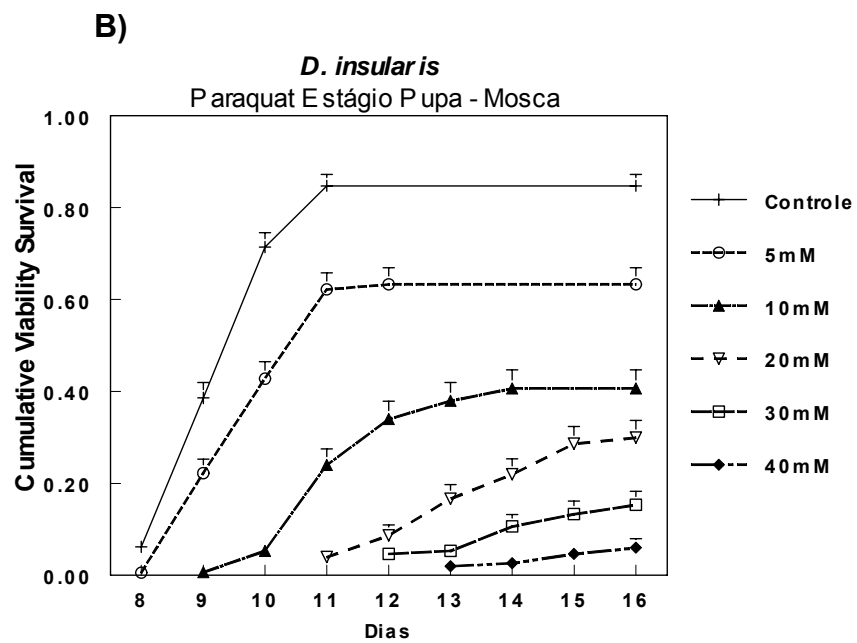
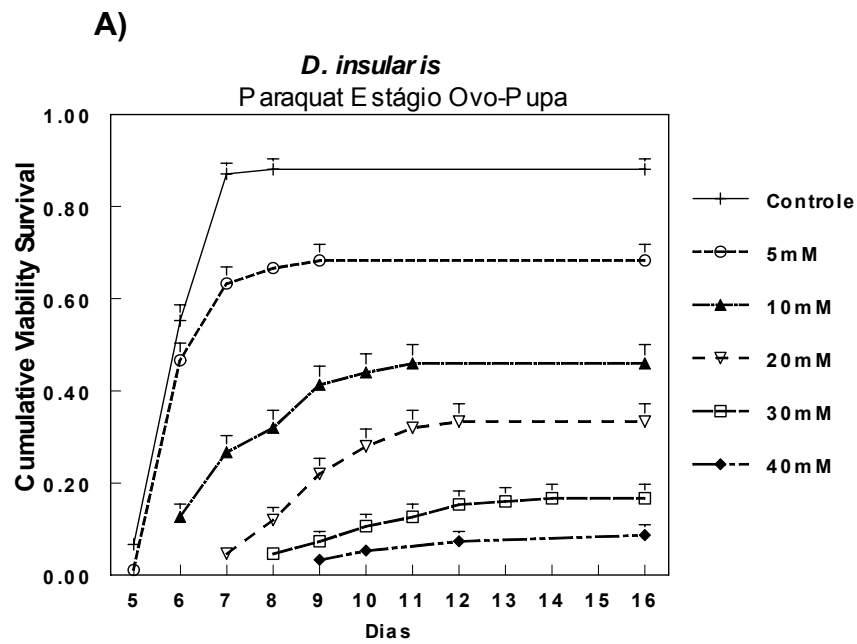
\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 18** – Análise da Sobrevivência de *D. insularis* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	15,48 (0,0001)			
<b>300µmol</b>	21,21 (0,0000)	0,42 (0,5184)		
<b>400 µmol</b>	69,25 (0,0000)	21,84 (0,0000)	18,05 (0,0000)	
<b>500µmol</b>	133,08 (0,0000)	75,40 (0,0000)	78,03 (0,0000)	26,20 (0,0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.





**Figura 10** – Desenvolvimento de *D. insularis* em diferentes concentrações de Paraquat. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 19** – Análise da Sobrevivência de *D. insularis* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.

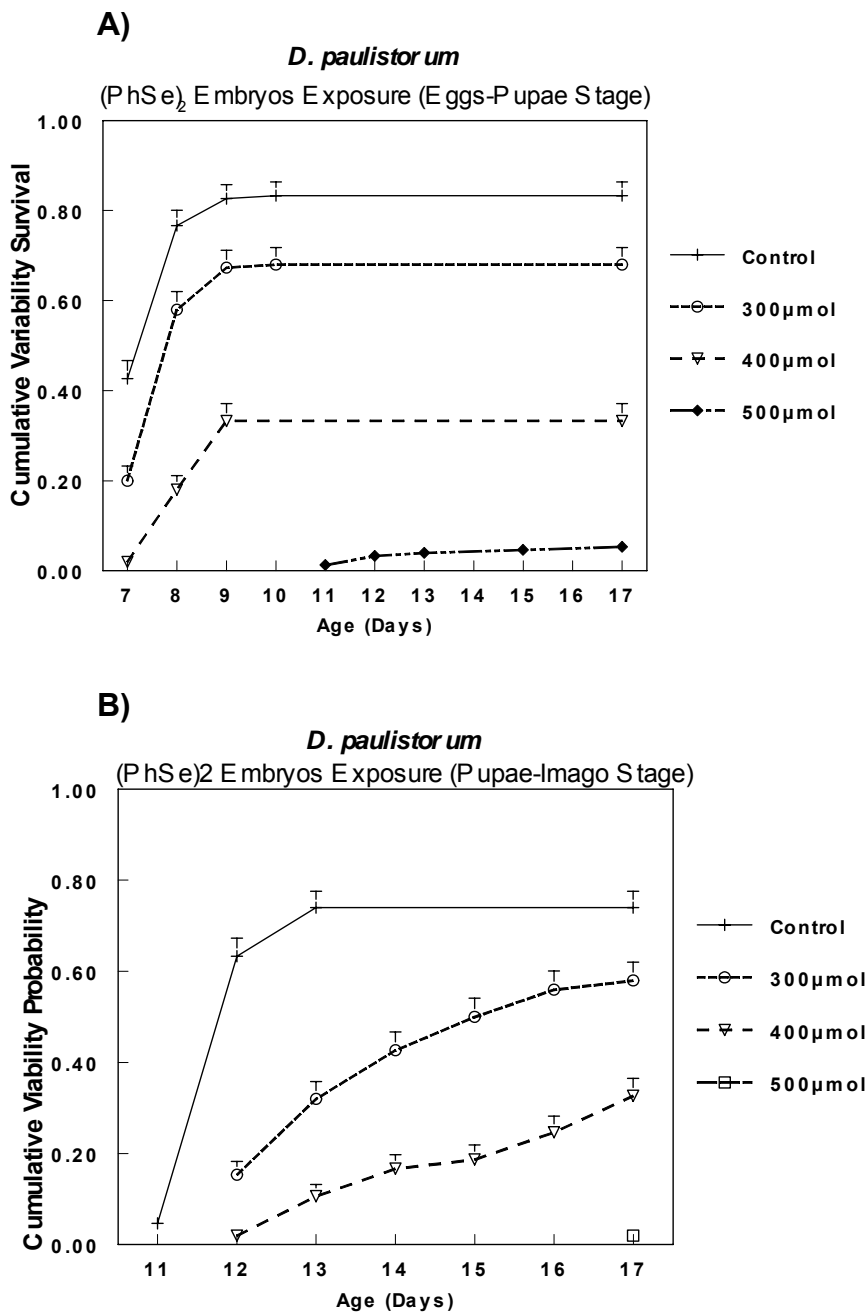
<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>
<b>5mM</b>	20,05 (0,0000)				
<b>10mM</b>	105,30 (0,0000)	27,16 (0,0000)			
<b>20mM</b>	176,02 (0,0000)	63,08 (0,0000)	8,50 (0,0036)		
<b>30mM</b>	220,44 (0,0000)	106,10 (0,0000)	35,50 (0,0000)	12,11 (0,0005)	
<b>40mM</b>	240,77 (0,0000)	132,49 (0,0000)	57,75 (0,0000)	29,14 (0,0000)	4,51 (0,0337)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 20** – Análise da Sobrevivência de *D. insularis* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>
<b>5mM</b>	32,85 (0,0000)				
<b>10mM</b>	125,67 (0,0000)	31,34 (0,0000)			
<b>20mM</b>	164,79 (0,0000)	56,33 (0,0000)	6,84 (0,0089)		
<b>30mM</b>	203,25 (0,0000)	92,18 (0,0000)	28,50 (0,0000)	9,65 (0,0019)	
<b>40mM</b>	228,04 (0,0000)	121,19 (0,0000)	53,65 (0,0000)	30,22 (0,0000)	6,98 (0,0082)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



**Figura 11** – Desenvolvimento de *D. paulistorum* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub>. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 21** – Análise da Sobrevivência de *D. paulistorum* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.

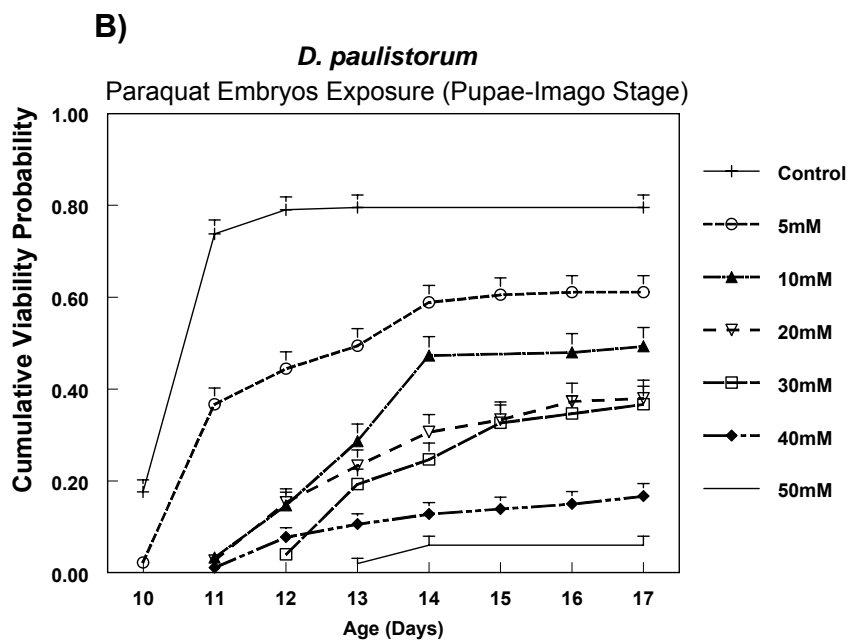
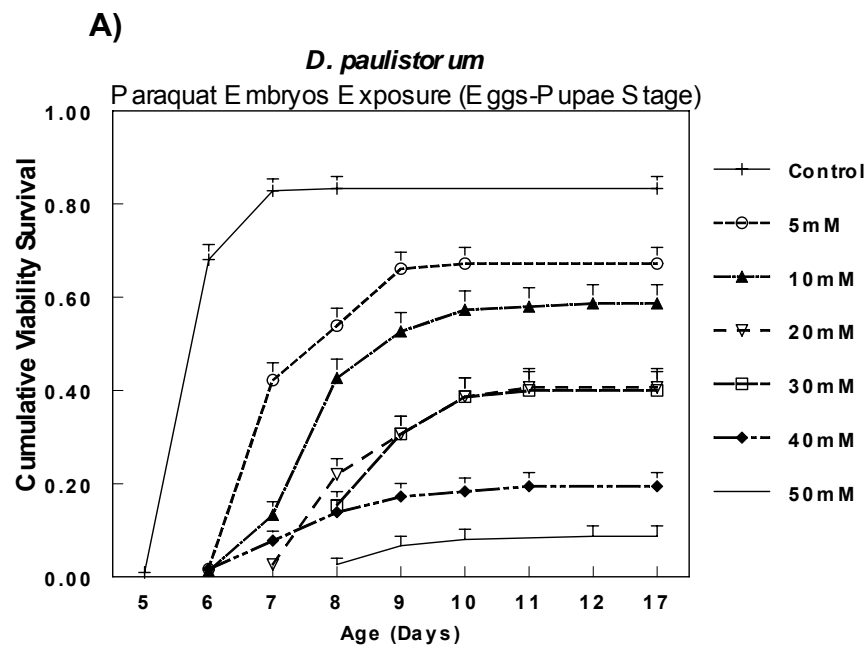
<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>300µmol</b>	17,32 (0,0000)		
<b>400 µmol</b>	108,15 (0,0000)	46,43 (0,0000)	
<b>500µmol</b>	209,26 (0,0000)	137,08 (0,0000)	39,45 (0,0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 22** – Análise da Sobrevivência de *D. paulistorum* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>300µmol</b>	25,03 (0,0000)		
<b>400 µmol</b>	79,20 (0,0000)	25,28 (0,0000)	
<b>500µmol</b>	173,11 (0,0000)	117,33 (0,0000)	50,21 (0,0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



**Figura 12** – Desenvolvimento de *D. paulistorum* em diferentes concentrações de Paraquat. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 23** – Análise da Sobrevivência de *D. paulistorum* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.

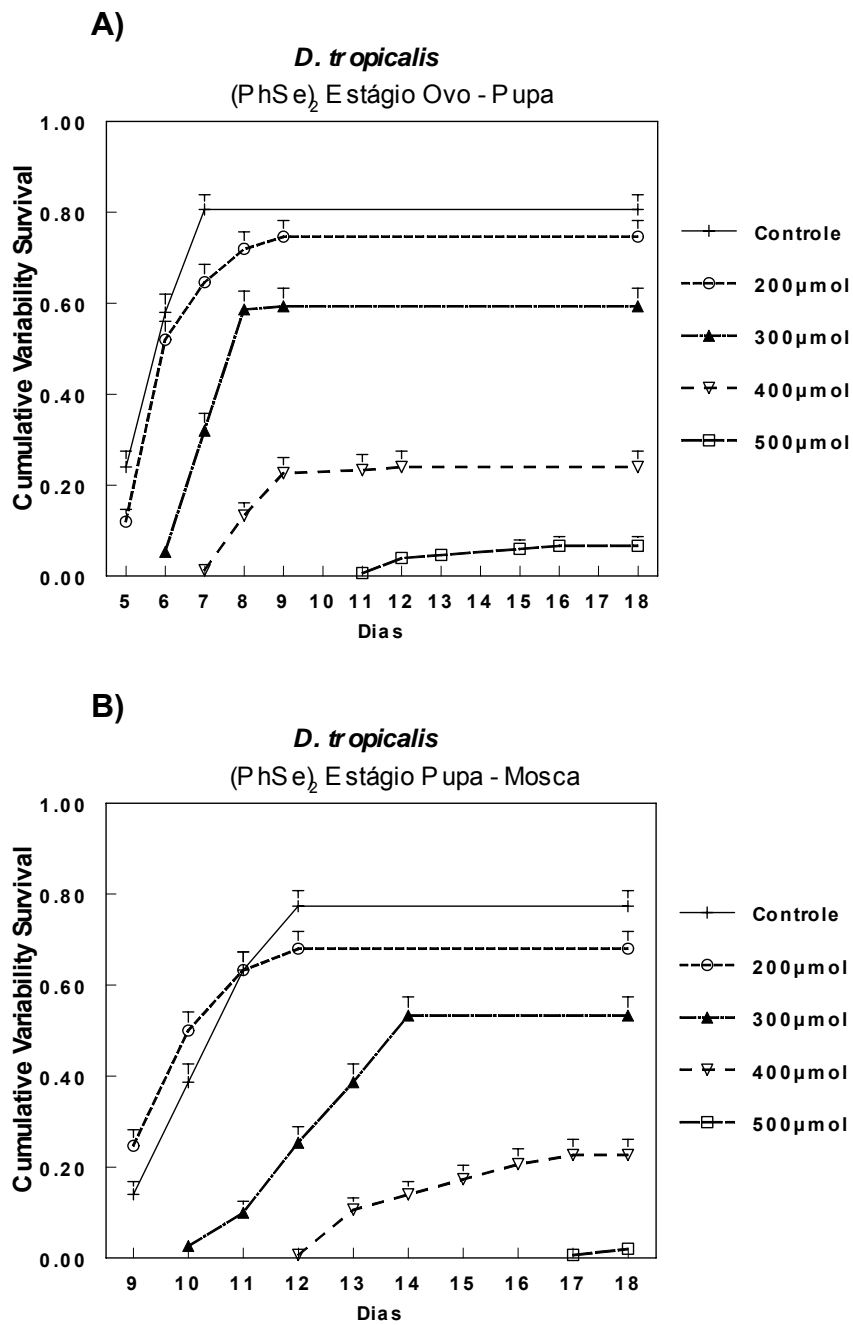
<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>	<b>40mM</b>
<b>5mM</b>	71,34 (0,0000)					
<b>10mM</b>	85,47 (0,0000)	7,00 (0,0081)				
<b>20mM</b>	128,16 (0,0000)	36,11 (0,0000)	13,3 (0,0003)			
<b>30mM</b>	132,23 (0,0000)	40,69 (0,0000)	16,47 (0,0000)	0,10 (0,7553)		
<b>40mM</b>	198,62 (0,0000)	87,53 (0,0000)	51,93 (0,0000)	15,2 (0,0001)	13,54 (0,0002)	
<b>50mM</b>	217,05 (0,0000)	124,02 (0,0000)	89,21 (0,0000)	42,20 (0,0000)	40,26 (0,0000)	8,20 (0,0042)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 24** – Análise da Sobrevivência de *D. paulistorum* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>	<b>40mM</b>
<b>5mM</b>	33,72 (0,0000)					
<b>10mM</b>	79,65 (0,0000)	11,45 (0,0007)				
<b>20mM</b>	100,03 (0,0000)	25,13 (0,0000)	3,50 (0,0616)			
<b>30mM</b>	108,91 (0,0000)	30,97 (0,0000)	6,62 (0,0101)	0,33 (0,5659)		
<b>40mM</b>	180,54 (0,0000)	83,65 (0,0000)	39,85 (0,0000)	19,25 (0,0000)	15,58 (0,0001)	
<b>50mM</b>	194,11 (0,0000)	112,31 (0,0000)	72,36 (0,0000)	45,86 (0,0000)	42,10 (0,0000)	9,13 (0,0025)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.



**Figura 13** – Desenvolvimento de *D. tropicalis* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub>. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 25** – Análise da Sobrevivência de *D. tropicalis* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Ovo-Pupa.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	4,03 (0,0446)			
<b>300µmol</b>	60,49 (0,0000)	28,49 (0,0000)		
<b>400 µmol</b>	144,09 (0,0000)	108,57 (0,0000)	49,54 (0,0000)	
<b>500µmol</b>	188,74 (0,0000)	163,89 (0,0000)	101,28 (0,0000)	18,61 (0,0000)

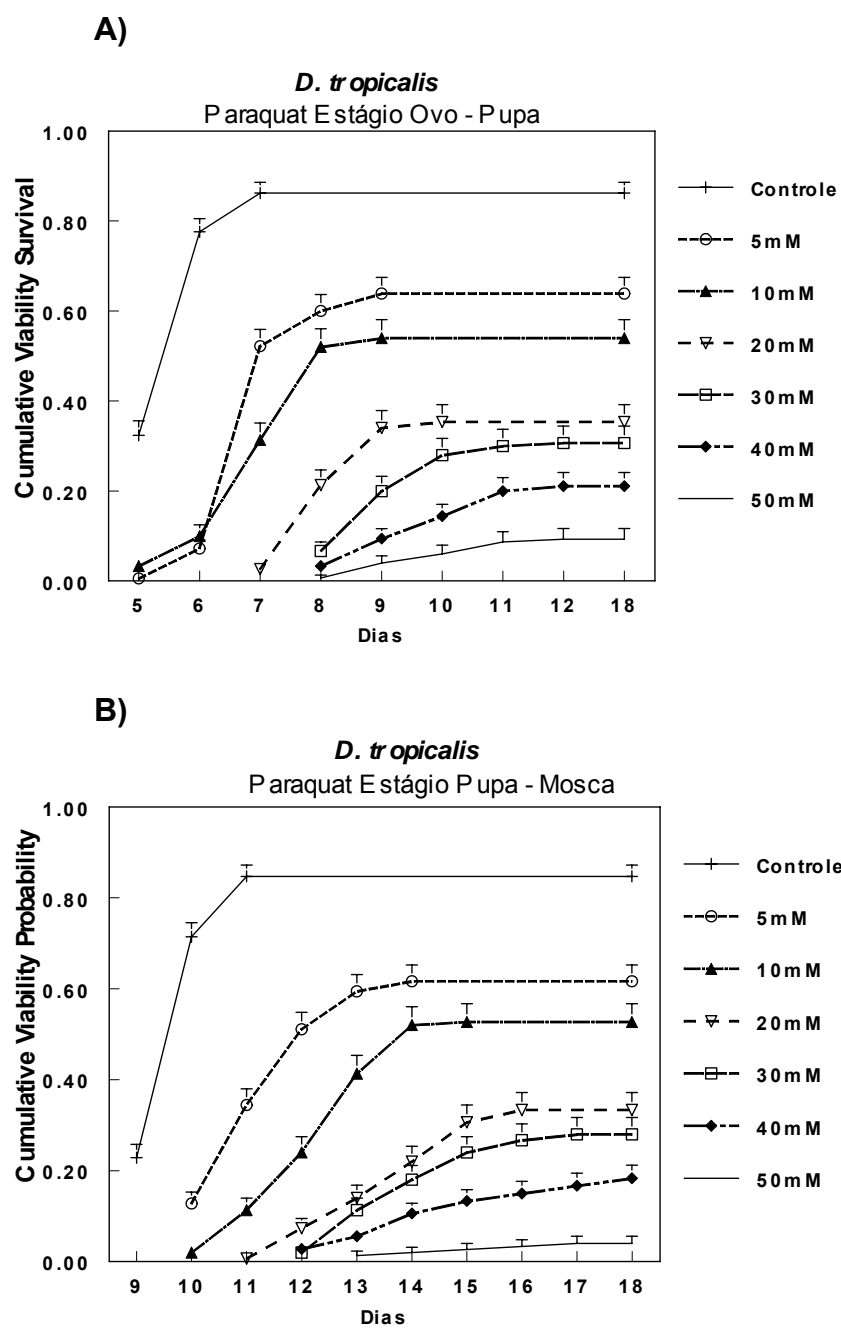
\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 26** – Análise da Sobrevivência de *D. tropicalis* em diferentes concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamentos</i>	<b>Controle</b>	<b>200µmol</b>	<b>300µmol</b>	<b>400 µmol</b>
<b>200µmol</b>	0,07 (0,7961)			
<b>300µmol</b>	54,71 (0,0000)	29,76 (0,0000)		
<b>400 µmol</b>	130,88 (0,0000)	89,15 (0,0000)	36,82 (0,0000)	
<b>500µmol</b>	189,51 (0,0000)	151,75 (0,0000)	101,74 (0,0000)	30,15 (0,0000)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.





**Figura 14** – Desenvolvimento de *D. tropicalis* em diferentes concentrações de Paraquat. **A)** Estágio de Ovo-Pupa; **B)** Estágio de Pupa-Imago.

**Tabela 27** – Análise da Sobrevivência de *D. tropicalis* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Ovo-Pupa.

<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>	<b>40mM</b>
<b>5mM</b>	107,34 (0,0000)					
<b>10mM</b>	101,96 (0,0000)	3,85 (0,0496)				
<b>20mM</b>	166,99 (0,0000)	41,94 (0,0000)	19,13 (0,0000)			
<b>30mM</b>	176,26 (0,0000)	54,06 (0,0000)	28,70 (0,0000)	1,76 (0,1848)		
<b>40mM</b>	228,52 (0,0000)	87,64 (0,0000)	53,05 (0,0000)	11,10 (0,0009)	4,58 (0,0324)	
<b>50mM</b>	227,62 (0,0000)	110,87 (0,0000)	76,91 (0,0000)	31,57 (0,0000)	22,18 (0,0000)	8,59 (0,0034)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

**Tabela 28** – Análise da Sobrevivência de *D. tropicalis* em diferentes concentrações de Paraquat no estágio Pupa-Imago.

<i>Tratamento</i>	<b>Controle</b>	<b>5mM</b>	<b>10mM</b>	<b>20mM</b>	<b>30mM</b>	<b>40mM</b>
<b>5mM</b>	83,74 (0,0000)					
<b>10mM</b>	109,84 (0,0000)	9,14 (0,0025)				
<b>20mM</b>	156,87 (0,0000)	42,24 (0,0000)	16,82 (0,0000)			
<b>30mM</b>	169,77 (0,0000)	54,49 (0,0000)	26,12 (0,0000)	1,18 (0,2765)		
<b>40mM</b>	223,76 (0,0000)	88,92 (0,0000)	52,16 (0,0000)	10,56 (0,0012)	4,57 (0,0325)	
<b>50mM</b>	233,20 (0,0000)	122,92 (0,0000)	91,09 (0,0000)	43,07 (0,0000)	32,43 (0,0000)	16,03 (0,0001)

\* Valores indicados entre parênteses: P < 0,05. Teste Log Rank.

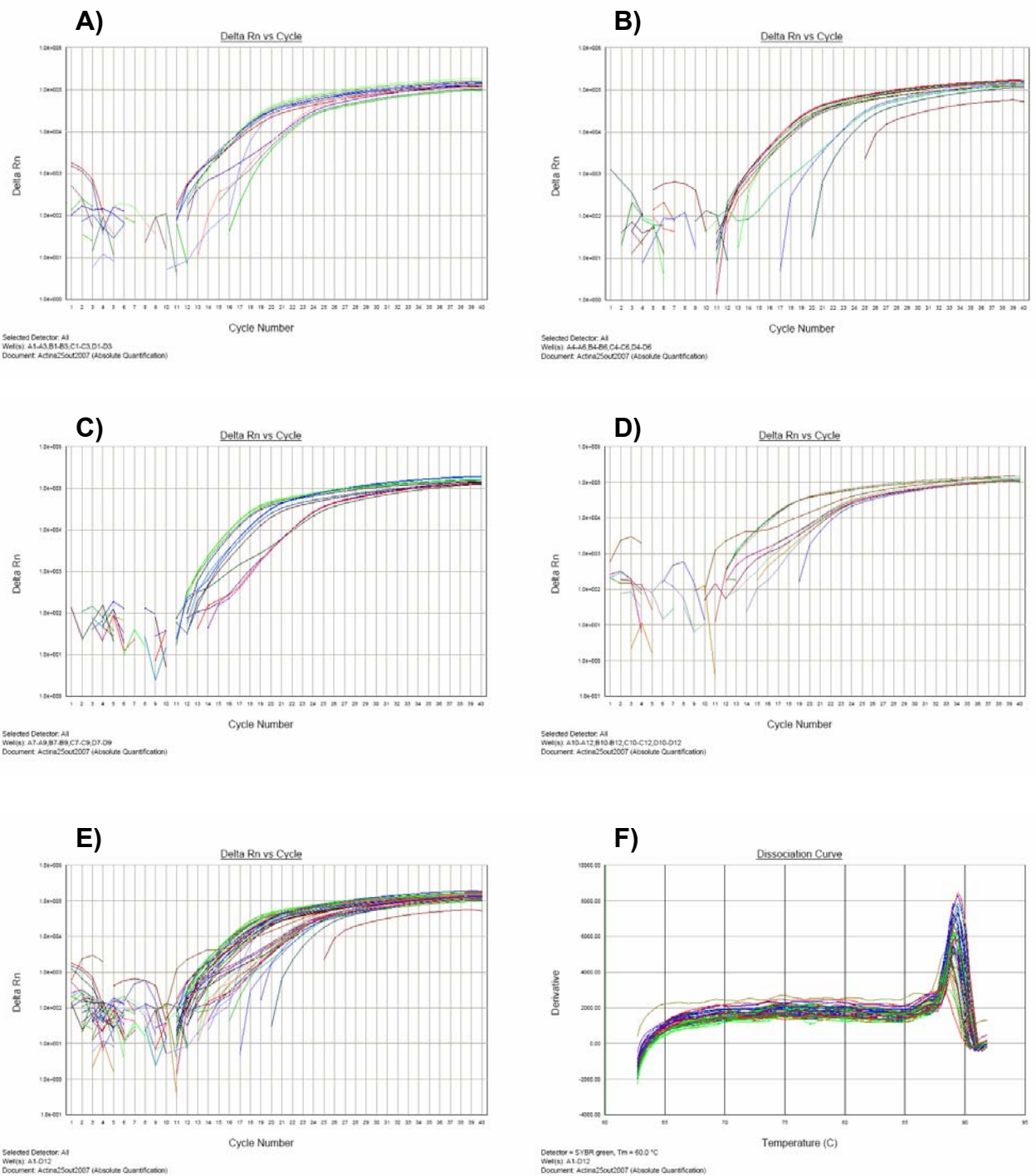
### **III.4. Resultados sobre a expressão de Hsp70 e Hsp83 nos mutantes *Sepia* e *white* de *Drosophila willistoni***

#### **III.4.1. Estudo da expressão gênica dos genes de *hsp70* e *hsp83* em mutantes *Sepia* e *white* de *D. willistoni***

O estresse celular induzido pelos compostos Disseleneto de difenila e paraquat foi avaliado pela expressão dos genes *hsp70* e *hsp83*, quantificando comparativamente o total de mRNA produzido por esses genes, na presença dos compostos e na sua ausência, com aqueles produzidos por genes de expressão constitutiva (“house keeping”). Os genes de expressão constitutiva escolhidos foram  $\beta$ -Actina e tubulina.

Os efeitos dos tratamentos com  $(\text{PhSe})_2$  e paraquat no mutante *Sepia* de *D. willistoni*, sobre a expressão do gene constitutivo de  $\beta$ -Actina avaliados através da técnica *Real Time PCR*, podem ser observadas na Figura 1. Podemos ver na Figura 1A, as curvas de amplificação a partir do cDNA do tratamento controle onde verificamos dois grupos de amplificações separando as amostras biológicas, mostrando uma diferença de alguns ciclos (17 e 22) para alcançar o ciclo limiar (“Cycle threshold, Ct”). Estas variações entre as amostras biológicas são esperadas e indicam diferenças no rendimento das produções de cDNA entre as amostras. Na Figura 1B, temos as amplificações dos cDNAs de  $\beta$ -Actina provenientes do tratamento com  $(\text{PhSe})_2$ , e observamos que as amostras separaram-se em dois grupos não formando um conjunto homogêneo. Já na Figura 1C, com o tratamento com paraquat, ocorreu a amplificação com três perfis diferentes, separando as três amostras biológicas. Na Figura 1D, temos a amplificação do cDNAs de larvas submetidas ao choque de temperatura, *Heat Shock*, onde aparecem dois grupos distintos de amplificações. Na Figura 1E, observamos os 4 tratamentos em uma mesma figura, e temos amplificações que diferem em vários ciclos indicando uma grande variação na quantidade de cDNA produzido entre as amostras biológicas e entre os tratamentos.

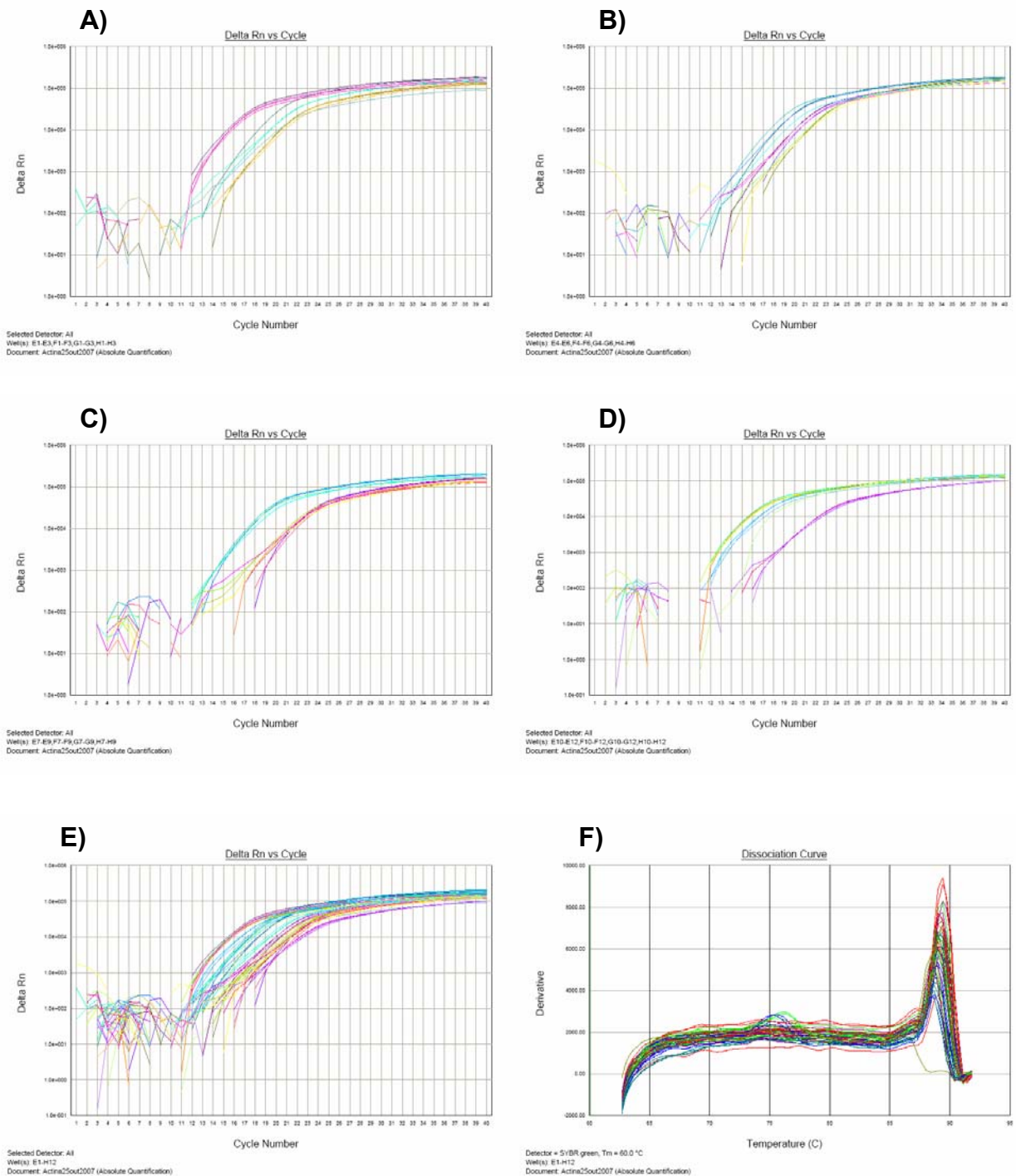
A especificidade das ampliações assim como uma estimativa da qualidade dos cDNAs utilizados podem ser verificadas pelas curvas de dissociações de todas as ampliações (Figura 1F). Podemos observar a formação de apenas um pico de dissociação, demonstrando que os *primers* desenhados para  $\beta$ -Actina são específicos para apenas uma região, que não ocorreu a formação de dímeros de *primers* e também que os cDNAs não apresentam contaminações por DNAs exógenos.



**Figura 1)** Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de  $\beta$ -Actina para *D. willistoni Sepia* em Larvas. **A)** Controle; **B)**  $(\text{PhSe})_2$ ; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.

Em conjunto, avaliando as curvas de amplificação e de dissociação, podemos dizer que o experimento foi, tecnicamente bem conduzido, mostrando variações do total de cDNA das amostras, tanto entre as triplicatas biológicas como entre os tratamentos.

As amplificações dos cDNAs do gene de  $\beta$ -Actina em mutante *white* de *D. willistoni* são observadas na Figura 2. Na Figura 2A, observamos que houve diferença de alguns ciclos entre as amplificações das triplicatas biológicas dos cDNAs controle. Na Figura 2B, observamos o efeito do tratamento com  $(\text{PhSe})_2$ , e temos amplificações paralelas na fase exponencial, porém elas diferem em alguns ciclos. O efeito do tratamento com paraquat sobre a expressão de  $\beta$ -Actina é representado na Figura 2C, onde observamos que ocorreu separação das amplificações em dois grupos distintos demonstrando que ocorreu diferenças nas quantidades de cDNAs produzidas. Na Figura 2D observamos a expressão do gene de  $\beta$ -Actina sobre as larvas submetidas ao choque de calor, onde a amplificações mostram diferenças na quantidade de cDNA em cada amostra biológica. Na Figura 2E, observamos os quatro tratamentos em uma mesma figura e temos amplificações que diferem em vários ciclos indicando uma grande variação na quantidade de cDNA produzido entre as amostras biológicas e entre os tratamentos. A especificidade das amplificações assim como uma estimativa da qualidade dos cDNAs utilizados podem ser verificados pelas as curvas de dissociações de todas as amplificações (Figura 2F). Podemos observar também a formação de apenas um pico de dissociação, demonstrando que os *primers* desenhados para  $\beta$ -Actina são específicos para apenas uma região e que não ocorreu a formação de dímeros de *primers* e que os cDNAs não apresentam contaminações por DNAs exógenos.



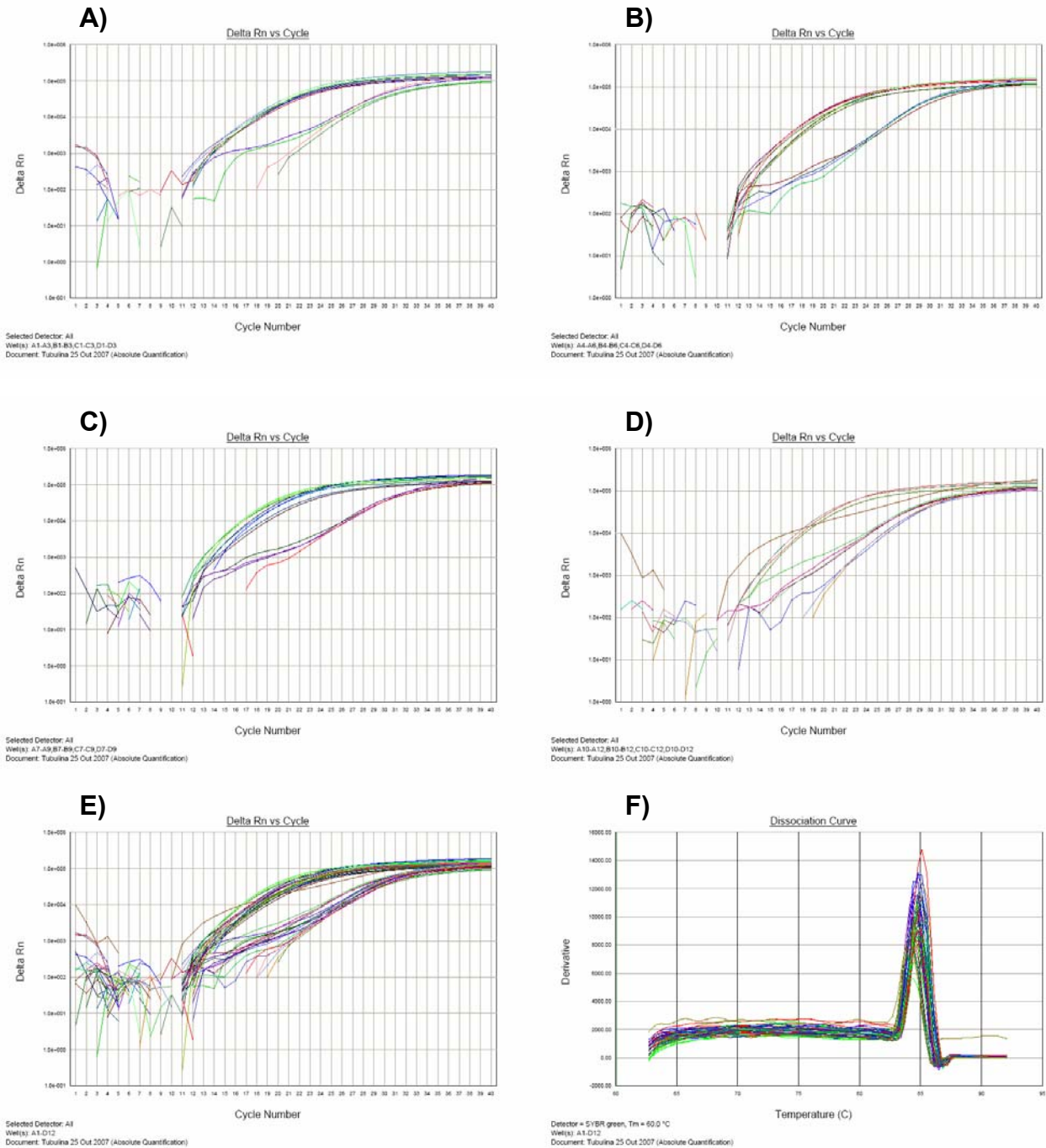
**Figura 2)** Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de  $\beta$ -Actina para *D. willistoni white* em Larvas. **A)** Controle; **B)** (PhSe)<sub>2</sub>; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.

O efeito dos tratamentos com  $(\text{PhSe})_2$  e paraquat no mutante *Sepia* de *D. willistoni*, sobre a expressão do gene constitutivo de Tubulina foram avaliados através da técnica *Real Time PCR*, e podem ser observadas na Figura 3. Observamos na Figura 3A a expressão desses genes em larvas Controles, onde as amplificações formaram dois grupos separados por alguns ciclos, mostrando uma grande diferença nas quantidades de cDNAs entre as amostras biológicas. No tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  ocorre o aparecimento de dois grupos de amplificações, demonstrando existir diferença de quantidade de cDNAs dentro do mesmo conjunto de amostras biológicas (Figura 3B). Na Figura 3C estão demonstradas as curvas de amplificações dos cDNAs provenientes do tratamentos das larvas com paraquat, onde observamos a mesma tendência de amplificação da figura anterior. Já na Figura 3D observamos o efeito do choque de calor sobre a quantidade de cDNA do gene da Tubulina. As amplificações ficaram separadas em três grupos distintos mostrando divergência nas quantidades de mRNA extraído dos tratamentos. Na Figura 3E, é mostrado um panorama geral de todas as amplificações, observamos que todas as amostras apresentaram um mesmo padrão de amplificação, separando de forma geral em dois grupos distintos. As curvas de dissociações para esse gene podem ser observadas na Figura 3F, a qual demonstra que o par de *primers* desenhados para esse gene apresenta-se específico para somente uma região do cDNA levando a apenas um produto amplificado e com o mesmo peso molecular.

A quantificação da expressão do gene de Tubulina por *Real Time PCR* com cDNAs de larvas do mutante *white* de *D. willistoni* são demonstradas na Figura 4. Na Figura 4A temos as amplificações com cDNAs controle, apresentando dois conjuntos separados por vários ciclos, demonstrando divergências na quantidade de mRNA extraídos e conseqüentemente nos cDNAs produzidos dos mesmos tratamentos. O efeito do tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  sobre a nível de mRNA do gene de Tubulina é apresentado na Figura 4B. As amplificações ocorreram de três formas separadas por alguns ciclos, demonstrando grande diferença na quantidade de cDNA utilizado entre as mesmas amostras biológicas, situação também observada no tratamento com paraquat (Figura 4C). Os cDNAs produzidos a partir do tratamento com choque



de calor (Figura 4D), amplificaram corretamente e indicaram que ocorreu variação na produção de mRNA entre as amostras.



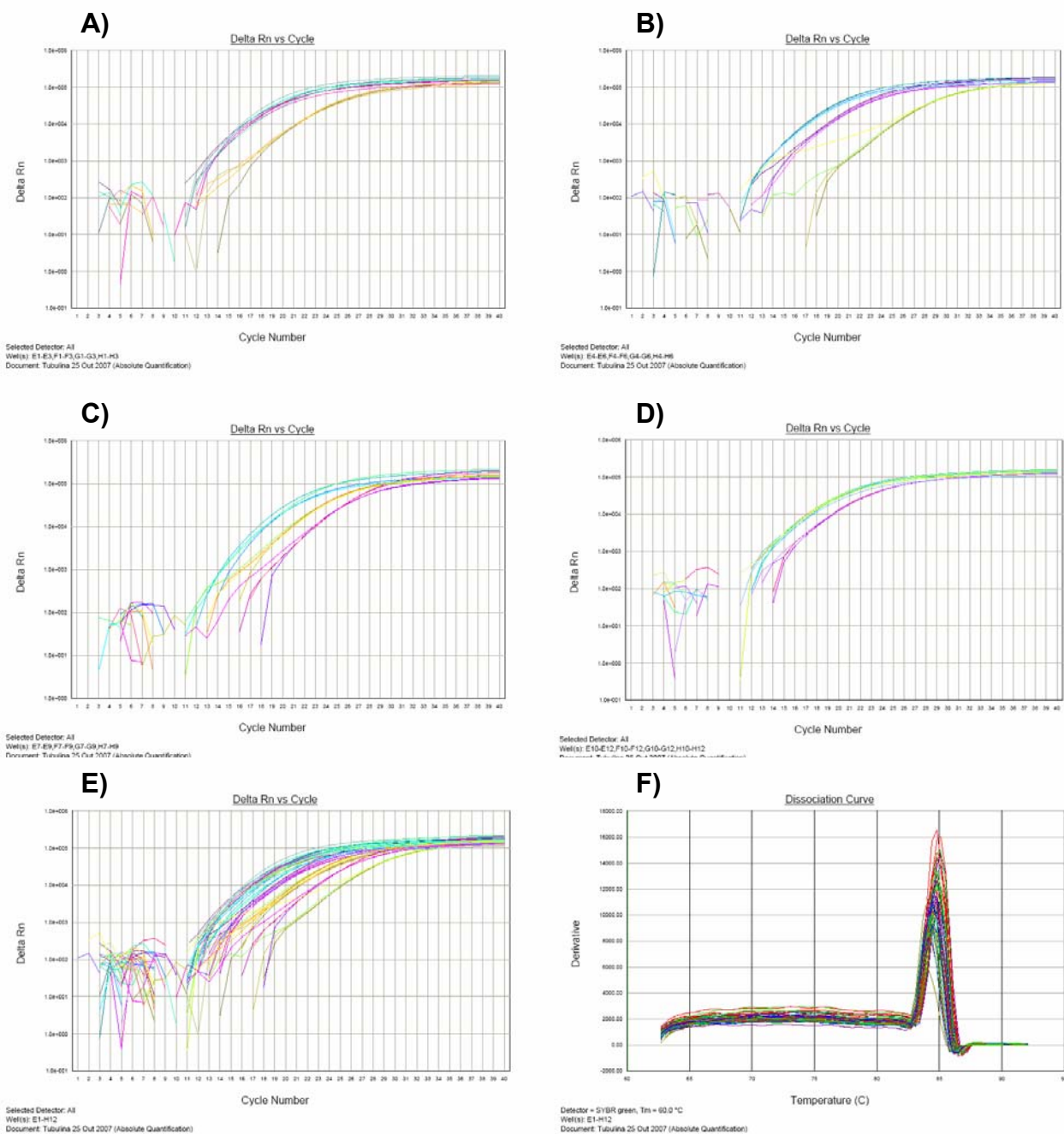
**Figura 3) Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de Tubulina para *D. willistoni* Sepia em Larvas. A) Controle; B)  $(\text{PhSe})_2$ ; C) Paraquat; D) Heat Shock; E) As 4 amplificações; F) Curvas de dissociações.**

Na Figura 4E, temos as quatro amplificações em uma única figura, demonstrando a ampla variação da amplificação desse gene nas amostras. A especificidade das amplificações assim como uma estimativa da qualidade dos cDNAs utilizados podem ser verificados pelas as curvas de dissociações de todas as amplificações (Figura 4F). Observamos aqui a formação de apenas um pico de dissociação, demonstrando novamente a especificidade da amplificação, como comentado anteriormente.

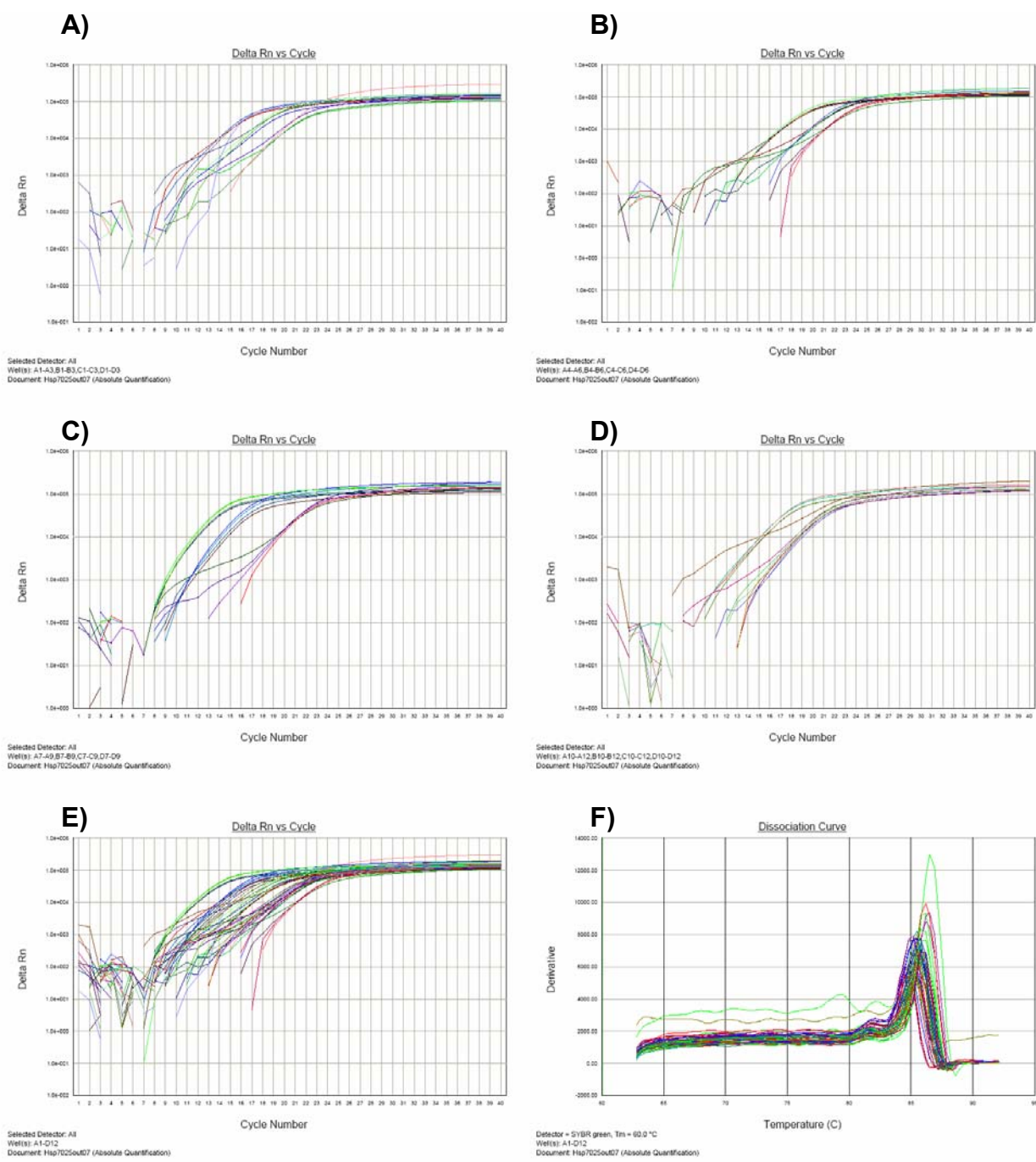
A quantificação da expressão do gene da proteína de choque térmico, *hsp70*, em larvas de mutante *Sepia* de *D. willistoni*, por *Real Time PCR*, está demonstrada na Figura 5. Na Figura 5A observamos que a amplificação desse gene em amostras controle. Ocorreram diferentes quantidades de cDNAs, separando as triplicadas biológicas em três grupos. A Figura 5B representa a curvas de amplificação de *hsp70* em larvas tratadas com  $(\text{PhSe})_2$ . Considerando a fase exponencial da amplificação, cuja região é utilizada para os cálculos de expressão, observou-se que as amostras biológicas foram separadas em três grupos, significando quantidades diferentes de mRNA produzido. Da mesma forma, também ocorreu separação em três grupos, quando analisadas as curvas de amplificações de *hsp70* em larvas tratadas com paraquat (Figura 5C). O tratamento com choque de calor, atuou sobre os níveis de mRNA de *hsp70* como demonstrado na Figura 5D. Também ocorreu a separação das expressões em dois grupos separados por alguns ciclos o que é suficiente para apresentar diferenças significativas na quantidade de mRNA extraído entre as amostras. Na Figura 5E, estão o conjuntos das quatro amplificações onde se observa a ampla diferença de amplificação entre as amostras. A especificidade dos *primers* e quantidade de produto formado é observado na Figura 5F. Os picos de dissociação apresentaram uma mesma tendência caracterizando a presença de apenas um tamanho de fragmento formado.

A quantificação da expressão do gene das proteínas de choque térmico, *hsp70*, em larvas do mutante *white* de *D. willistoni*, está demonstrada na Figura 6. Podemos ver na Figura 6A, as curvas de amplificação a partir do cDNA do tratamento controle, onde se formaram três grupos de amplificações separando as amostras biológicas, mostrando uma diferença de alguns ciclos (14 e 23) para

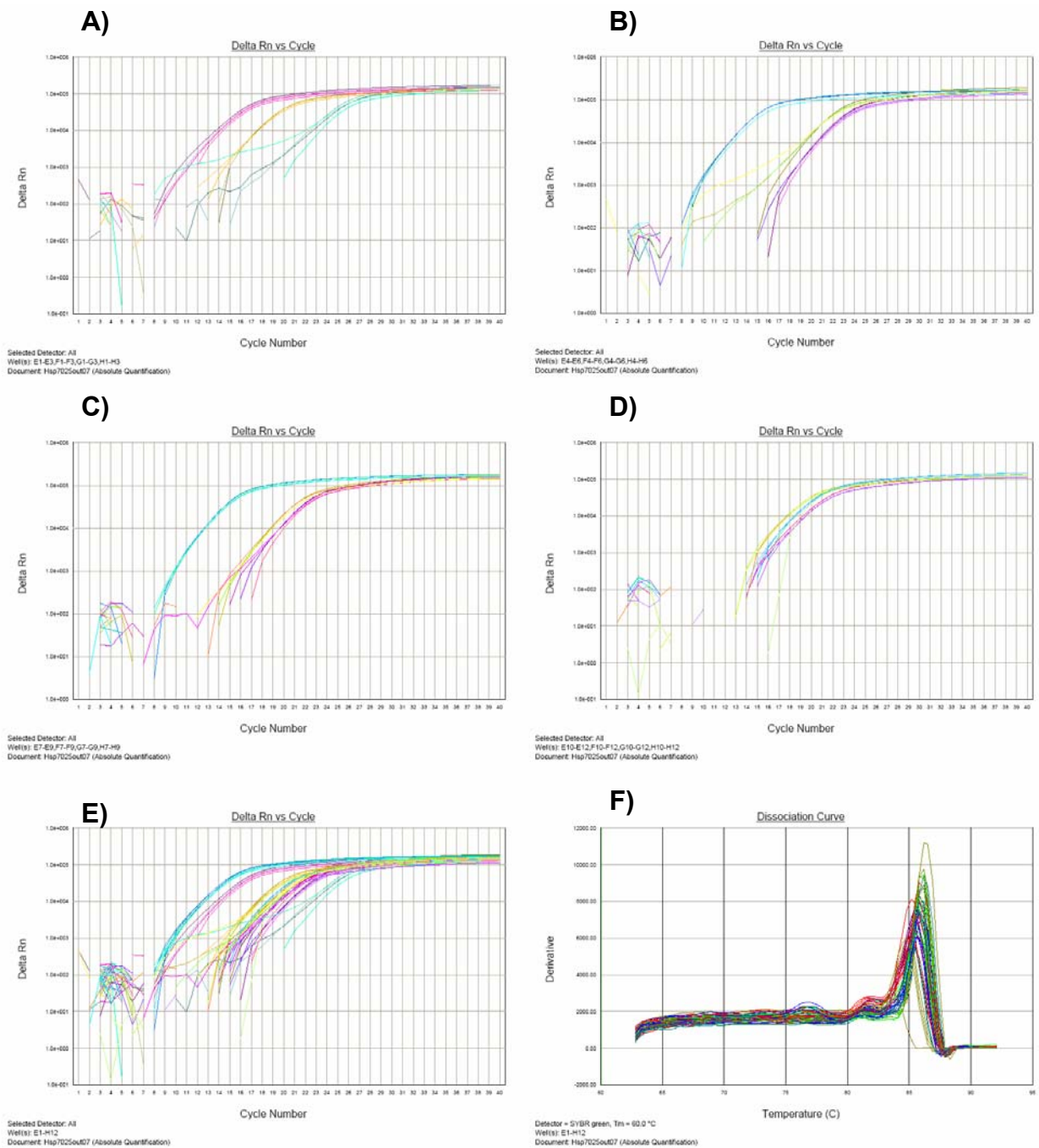
alcançar o ciclo limiar (“Cycle threshold, Ct”). Estas variações entre as amostras biológicas são esperadas e indicam diferenças no rendimento das produções de cDNA entre as amostras. Na Figura 6B, vemos as amplificações dos cDNAs de *hsp70* provenientes do tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  e observamos que as amostras separaram-se em dois grupos não formando um conjunto homogêneo.



**Figura 4)** Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de **Tubulina** para *D. willistoni white* em Larvas. **A)** Controle; **B)** (PhSe)<sub>2</sub>; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.



**Figura 5)** Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de *hsp70* para *D. willistoni* Sepia em Larvas. **A)** Controle; **B)** (PhSe)<sub>2</sub>; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.



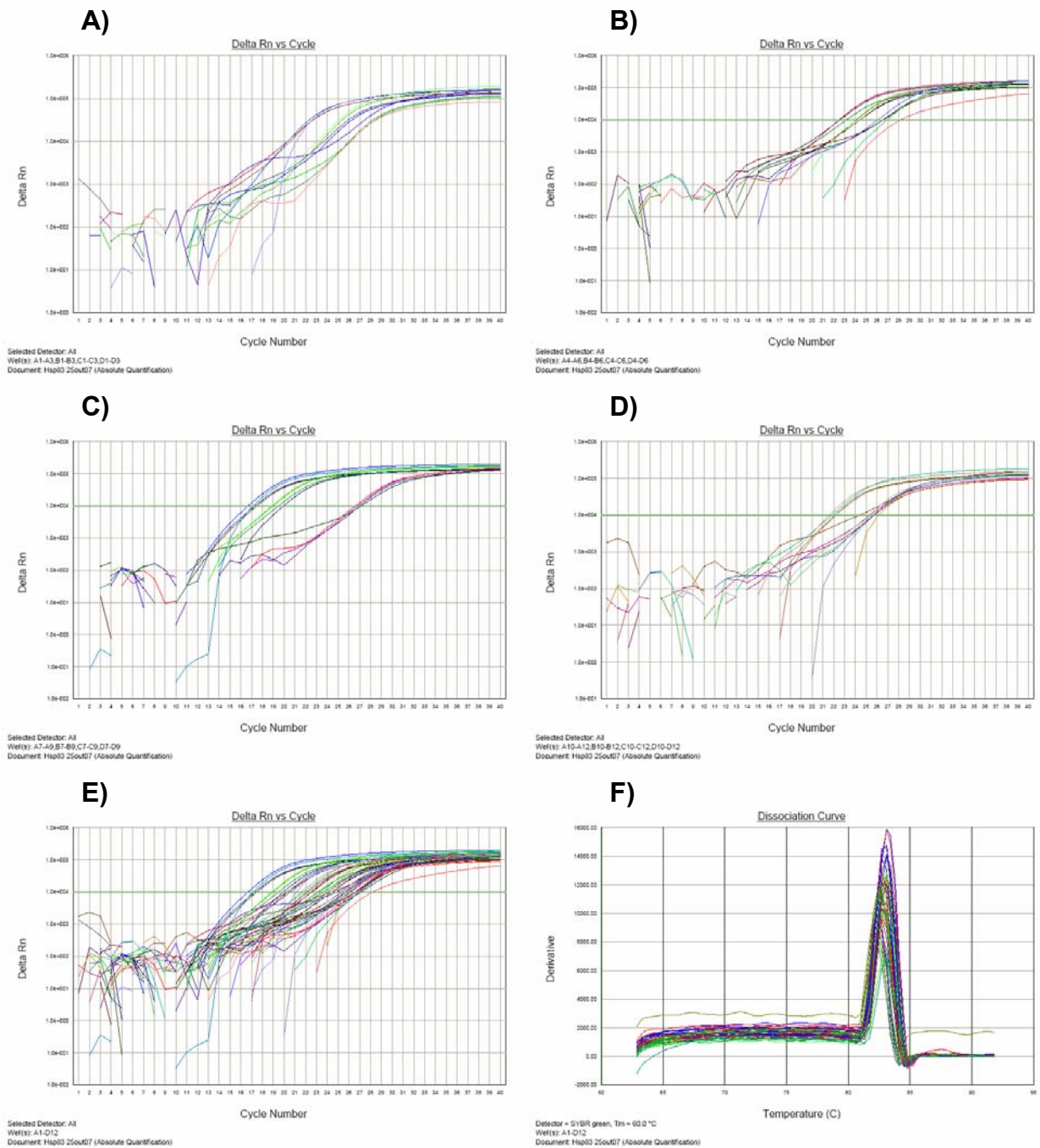
**Figura 6)** Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de *hsp70* para *D. willistoni white* em Larvas. **A)** Controle; **B)**  $(\text{PhSe})_2$ ; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.

Já na Figura 6C, com o tratamento com paraquat, ocorreu a amplificação com dois perfis diferentes, separando as três amostras biológicas. Na Figura 6D, temos a amplificação do cDNAs de larvas submetidas ao choque de temperatura, *Heat Shock*, onde a quantidade de cDNA variando em torno de 4 vezes entre as amostras. Na Figura 6E, os 4 tratamentos estão representados na mesma figura, e vemos amplificações que diferem em vários ciclos indicando uma grande variação na quantidade de cDNA produzido entre as amostras biológicas e entre os tratamentos. Nos gráficos das curvas de dissociações (Figura 6F), este par de *primers* apresentou um produto único e sem formação de dímeros e com ausência de contaminantes.

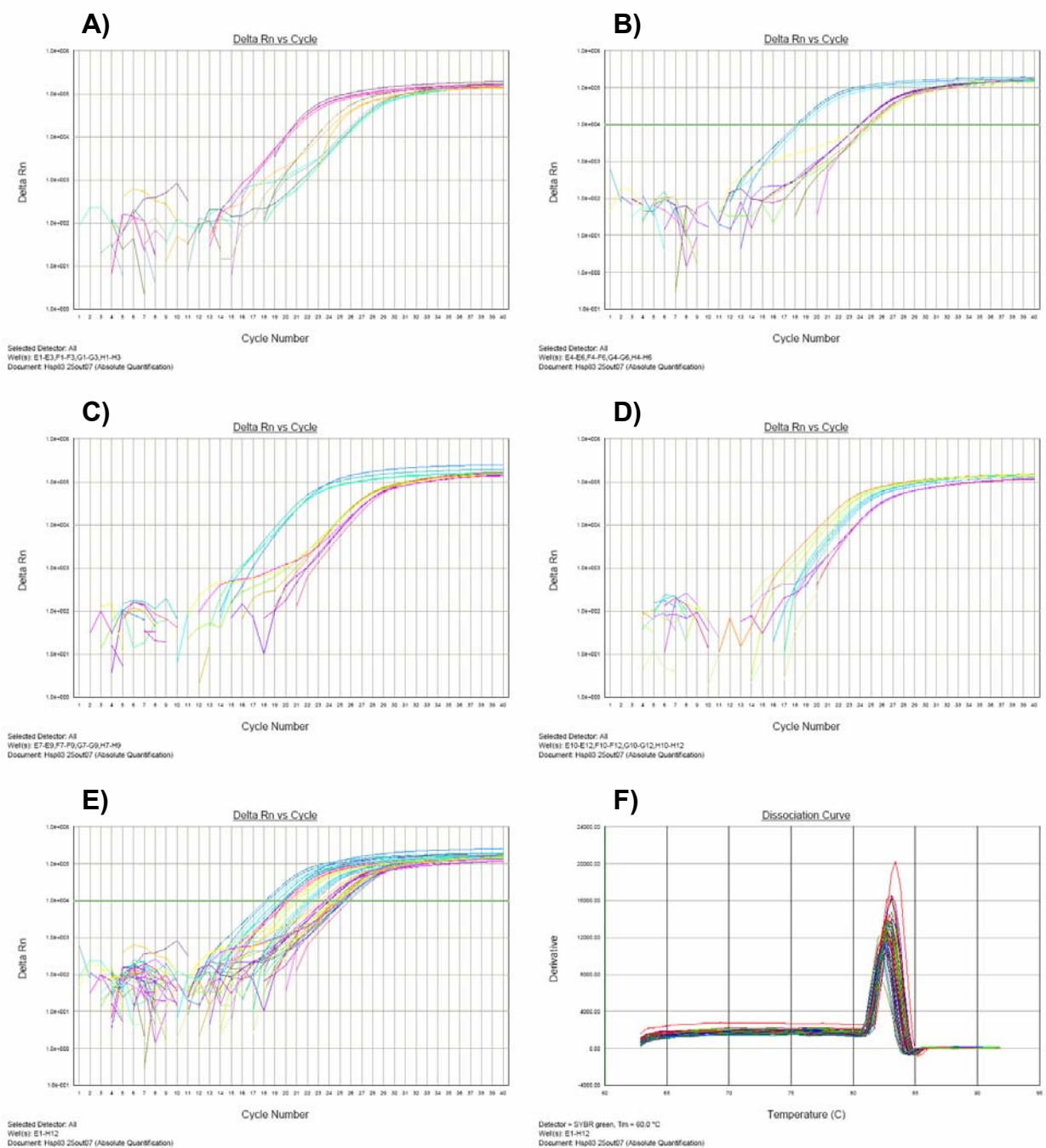
A quantificação da expressão do gene das proteínas de choque térmico, *hsp83*, em mutantes *Sepia* de *D. willistoni*, por *Real Time PCR*, está demonstrada na Figura 7. Os experimentos de amplificação do cDNA de *hsp83* no grupo controle resultaram em diferenças na quantidade de cDNA de vários ciclos entre as amostras. Na figura 7B, observamos o efeito do tratamento de  $(\text{PhSe})_2$  sobre a produção de mRNA do gene *hsp83*, que atuou de forma diferente em cada amostra biológica, mostrando grande a amplitude na quantidade de cDNA utilizado mesmo dentro da mesma amostra. Nas amostras tratadas com paraquat (Figura 7C), a análise das amplificações por *Real Time PCR* demonstrou uma não uniformidade na quantidade de mRNA produzido entre as triplicatas biológicas. Na Figura 7D, temos a amplificação do cDNAs de larvas submetidas ao choque de temperatura, *Heat Shock*, onde aparecem dois grupos distintos de amplificações. Na Figura 7E estão demonstradas todas as amplificações para o gene de *hsp83*, observamos os quatro tratamentos em uma mesma figura, e verificamos amplificações que diferem em vários ciclos indicando uma grande variação na quantidade de cDNA produzido entre as amostras biológicas e entre os tratamentos. A especificidade das amplificações assim como uma estimativa da qualidade dos cDNAs utilizados podem ser verificadas pelas curvas de dissociações de todas as amplificações (Figura 7F). Em todas, podemos observar a especificidade das amplificações pela formação de um único pico, como comentado anteriormente.

A quantificação da expressão do gene da proteína de choque térmico, *hsp83*, em larvas do mutante *white* de *D. willistoni*, por *Real Time PCR*, está demonstrada na Figura 8. A expressão no grupo Controle pode ser observada na Figura 8A, onde as curvas de amplificações diferem em vários ciclos, mostrando serem amostras heterogêneas quanto à quantidade de cDNA. Na Figura 8B temos as curvas de amplificações em amostras tratadas com  $(\text{PhSe})_2$ , que formaram dois grupos que diferiram em torno de 128 vezes.





**Figura 7)** Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de *hsp83* para *D. willistoni* Sepia em Larvas. **A)** Controle; **B)**  $(\text{PhSe})_2$ ; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.



**Figura 8)** Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de *hsp83* para *D. willistoni white* em Larvas. **A)** Controle; **B)**  $(\text{PhSe})_2$ ; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.

No tratamento com paraquat (Figura 8C), a amplificação da *hsp83* mostrou diferenças de quantidade entre as amostras biológicas, ficando em torno do 64 vezes de um grupo para o outro. No choque de calor, as amplificações foram mais homogêneas (Figura 8D) em relação as anteriores, porém a diferença entre algumas curvas poderá chegar a uma diferença em torno de 32 vezes. Na Figura 8E esta demonstrada os quatro conjuntos de amplificações, observamos a grande amplitude entre os “Cts”. Na Figura 8F, podemos observar a formação de apenas um pico de dissociação, demonstrando que os *primers* desenhados para *hsp83* são específicos para apenas uma região e que não ocorreram a formação de dímeros de *primers* e também que os cDNAs não apresentam contaminações por DNAs exógenos.

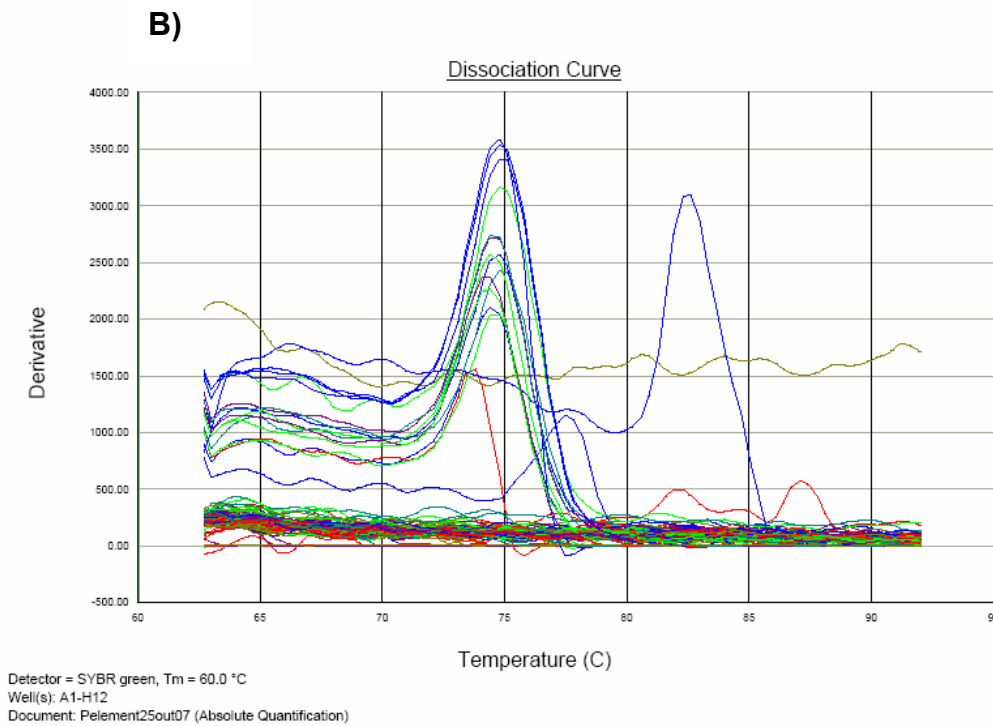
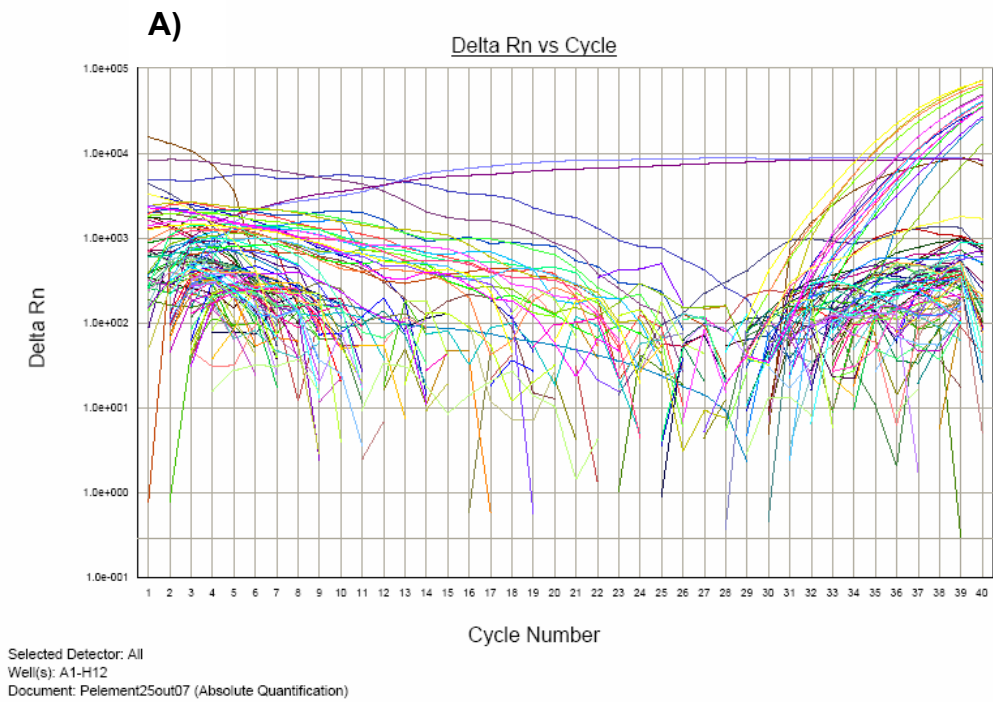
A análise da expressão do elemento transponível *P* em larvas dos mutantes *Sepia* e *white* de *D. willistoni* são demonstrados na Figura 9. Pode-se observar na Figura 9A que os *primers* utilizados não foram adequados para essa técnica, pois não ocorreu uma fase exponencial de amplificações nas amostras. Os sinais que aparecem sugerem que são apenas amplificações inespecíficas, fato que pode ser explicado pelas curvas de dissociações (Figura 9B). Observa-se que apenas em poucas amostras ocorreu a formação de algum produto, porém não é específico, já que a temperatura de dissociação está abaixo do esperado. Além disso, na grande maioria das amostras não ocorreram amplificações.

Na análise comparativa de amplificação entre *hsp70* e o gene constitutivo tubulina no mutante *Sepia* (Figura 10A), observa-se que ocorreu uma diminuição da expressão desse gene no tratamento com  $(\text{PhSe})_2$ . No entanto, para os tratamentos com paraquat e *heat shock* ocorreu um aumento na expressão do gene *hsp70*. Já para o mutante *white* houve um aumento da expressão desse gene nos tratamentos com  $(\text{PhSe})_2$  e paraquat e uma diminuição no tratamento *heat shock*.

Na figura 10B, está representada a quantificação de *hsp70* e normalizado pelo gene constitutivo  $\beta$ -actina no mutante *Sepia*, onde se observa que ocorreu uma diminuição na expressão nos tratamentos com  $(\text{PhSe})_2$  e *heat shock* e, um aumento no tratamento com paraquat. Nas linhagens mutante *white*, ocorreu um

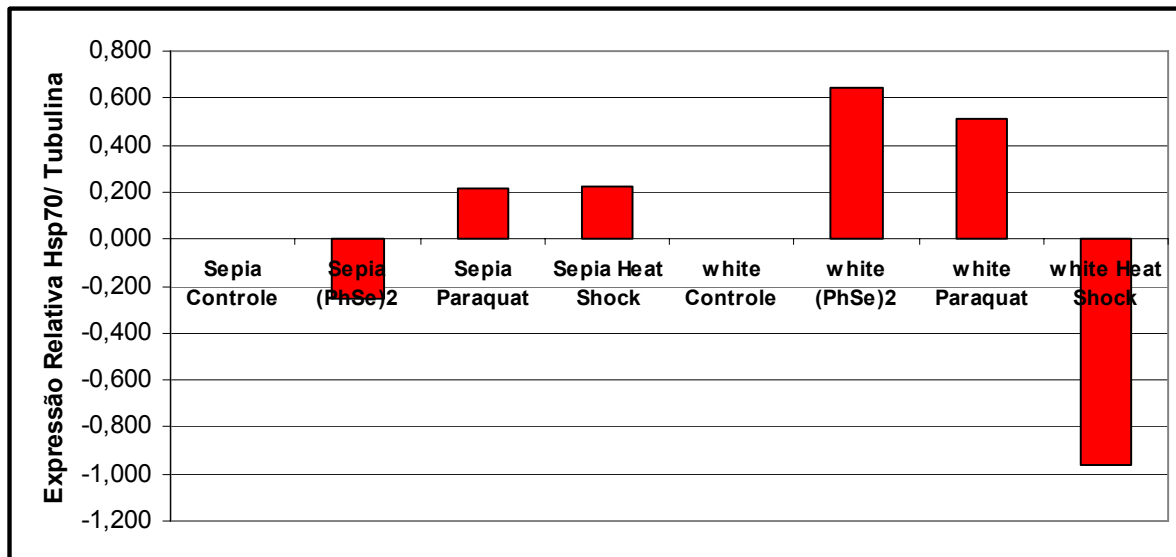
aumento na expressão do gene nos tratamentos (PhSe)<sub>2</sub> e paraquat, mas uma diminuição no tratamento *heat shock*.

Na Tabela 1 encontram-se os valores médios da expressão de *hsp70* representados na Figura 10 (A e B).

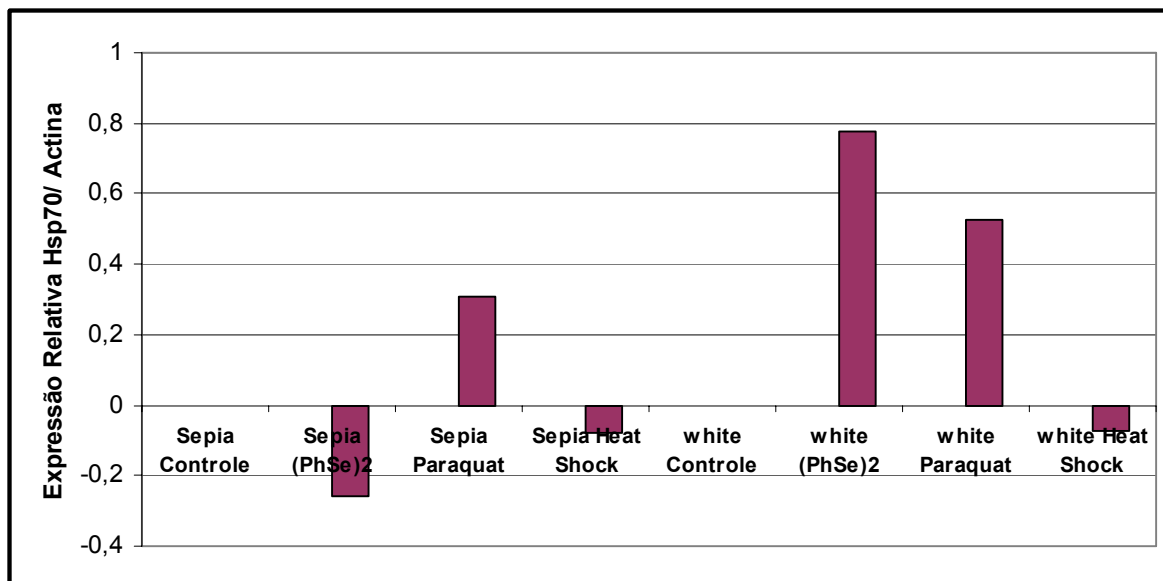


**Figura 9)** *Real Time PCR*, Amplificação do cDNA do elemento transponível *P* em Larvas; **A)** Amplificações com todas as amostras biológicas dos mutantes *Sepia* e *white*; **B)** Curva de dissociação das amplificações.

A)



B)



**Figura 10** – Representação logarítmica da expressão de *hsp70*. **A)** Quantificação de *hsp70* em relação ao gene de *tubulina*; **B)** Quantificação de *hsp70* em relação ao gene de  $\beta$ - *actina*.

**Tabela 1** - Valores médios da expressão de *hsp70* em relação aos genes constitutivos obtidos nos tratamentos.

		<i>Hsp70</i> /tubulina	<i>Hsp70</i> / $\beta$ -actina
<b><i>Sepia</i></b>	<b>Controle</b>	9,98 $\pm$ 1,32	1,37 $\pm$ 0,70
	<b>(PhSe)<sub>2</sub></b>	1,11 $\pm$ 1,03	0,76 $\pm$ 0,53
	<b>Paraquat</b>	3,22 $\pm$ 2,15	2,78 $\pm$ 1,08
	<b>Heat Shock</b>	3,29 $\pm$ 1,78	1,13 $\pm$ 0,34
<b><i>white</i></b>	<b>Controle</b>	5,24 $\pm$ 3,05	2,49 $\pm$ 1,55
	<b>(PhSe)<sub>2</sub></b>	23,13 $\pm$ 14,23	14,92 $\pm$ 13,09
	<b>Paraquat</b>	16,98 $\pm$ 11,82	8,37 $\pm$ 5,24
	<b>Heat Shock</b>	0,57 $\pm$ 0,12	2,11 $\pm$ 1,92

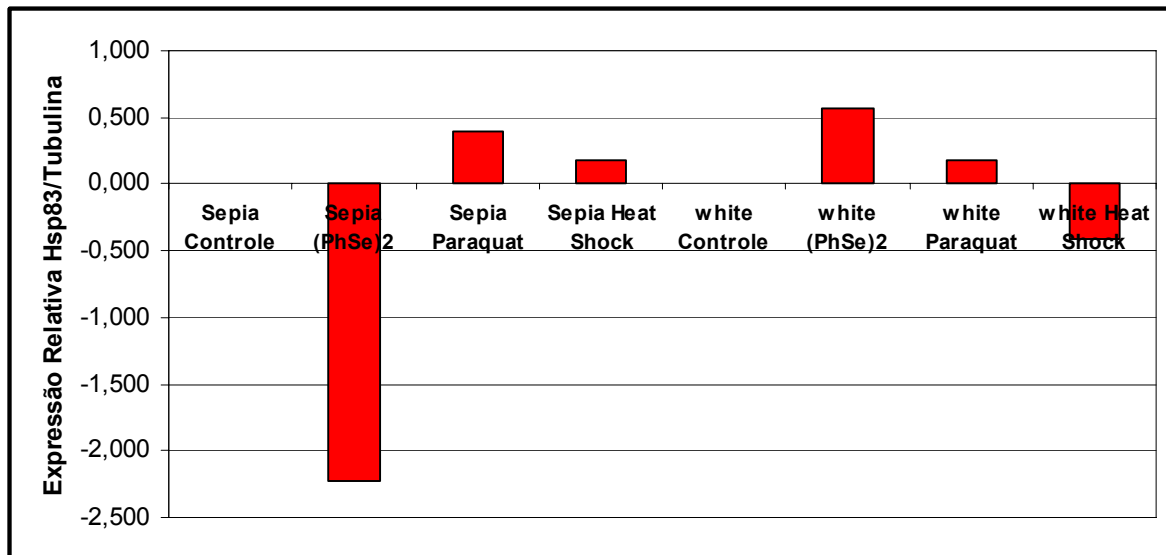
\* Média  $\pm$  Desvio Padrão.

Os padrões comparativos para *hsp83* para os genes constitutivos tubulina e  $\beta$ -actina encontram-se na Figura 11, onde para tubulina (Figura 11A) houve diminuição da expressão para a linhagem mutante *Sepia* no tratamento com (PhSe)<sub>2</sub> e aumento para os tratamentos paraquat e *heat shock*. Para a mutante *white* ocorreu aumento na expressão do gene para (PhSe)<sub>2</sub> e paraquat, e diminuição no tratamento *heat shock*.

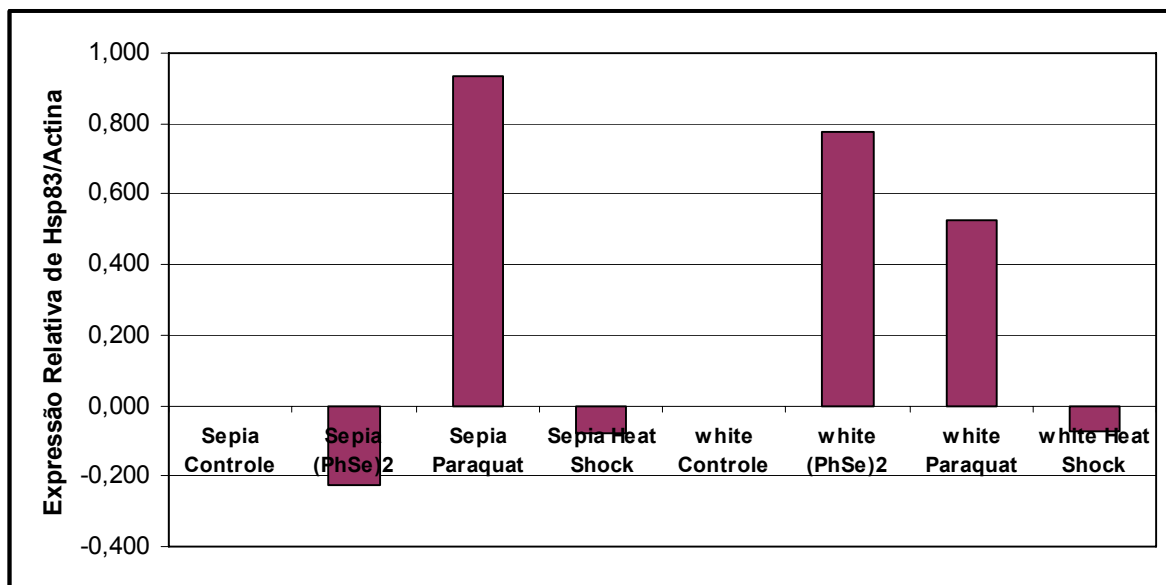
Já, quando se utilizou o gene constitutivo da  $\beta$ -actina para normalizar a expressão de *hsp83* (Figura 11B), observou-se que para as moscas da linhagem mutante *Sepia* o tratamento com (PhSe)<sub>2</sub> e *heat shock* diminuiu a expressão de *hsp83* e aumentou para o tratamento com paraquat. Nas moscas da linhagem *white* ocorreu aumento na expressão desse gene para os tratamentos (PhSe)<sub>2</sub> e paraquat e diminuição em *heat shock*.

Na tabela 2 encontram-se os valores médios da expressão de *hsp70* representados na Figura 11 (A e B).

A)



B)



**Figura 11** - Representação logarítmica da expressão de *hsp83*. **A)** Quantificação de *hsp83* em relação ao gene de **tubulina**; **B)** Quantificação de *hsp83* em relação ao gene de  **$\beta$ - actina**.



**Tabela 2** - Valores médios da expressão de *hsp83* em relação aos genes constitutivos obtidos nos tratamentos.

		<i>Hsp83</i> /tubulina	<i>Hsp83</i> / $\beta$ -actina
<b><i>Sepia</i></b>	<b>Controle</b>	2,04 $\pm$ 1,24	1,64 $\pm$ 1,03
	<b>(PhSe)<sub>2</sub></b>	1,22 $\pm$ 1,06	0,97 $\pm$ 0,47
	<b>Paraquat</b>	5,06 $\pm$ 2,37	14,14 $\pm$ 11,95
	<b>Heat Shock</b>	3,08 $\pm$ 1,69	1,08 $\pm$ 0,28
<b><i>white</i></b>	<b>Controle</b>	3,06 $\pm$ 1,96	1,55 $\pm$ 0,95
	<b>(PhSe)<sub>2</sub></b>	11,42 $\pm$ 6,81	7,56 $\pm$ 6,09
	<b>Paraquat</b>	4,62 $\pm$ 1,93	2,38 $\pm$ 0,73
	<b>Heat Shock</b>	1,18 $\pm$ 0,31	3,72 $\pm$ 2,60

\* Média  $\pm$  Desvio Padrão.

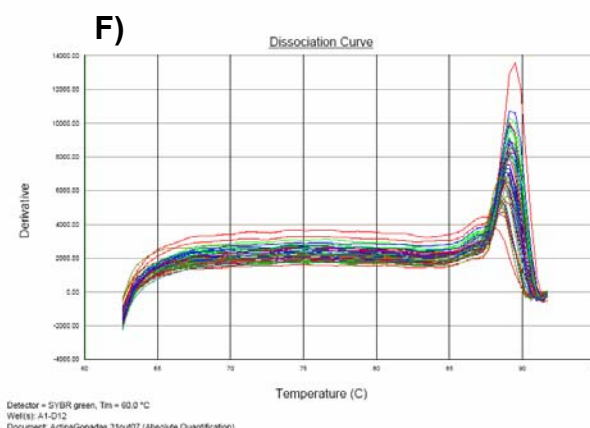
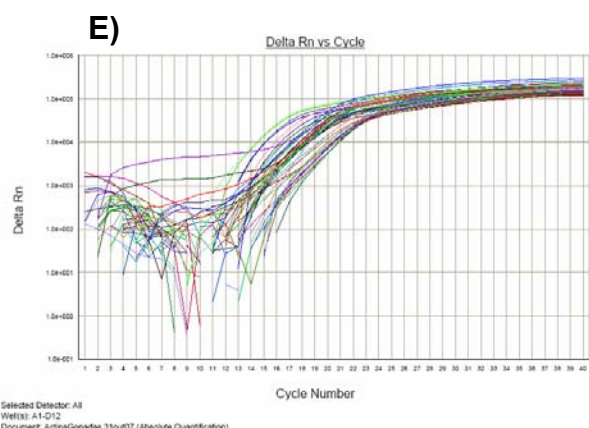
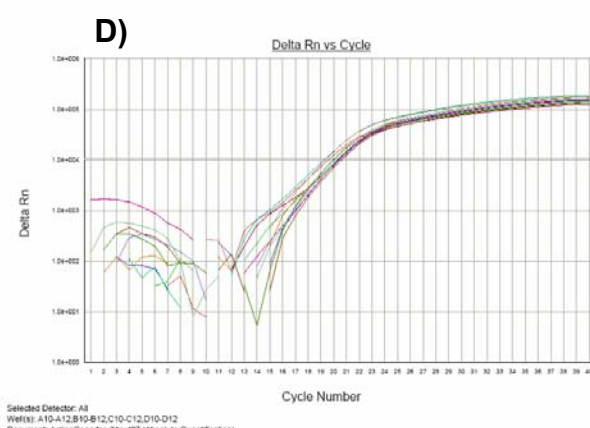
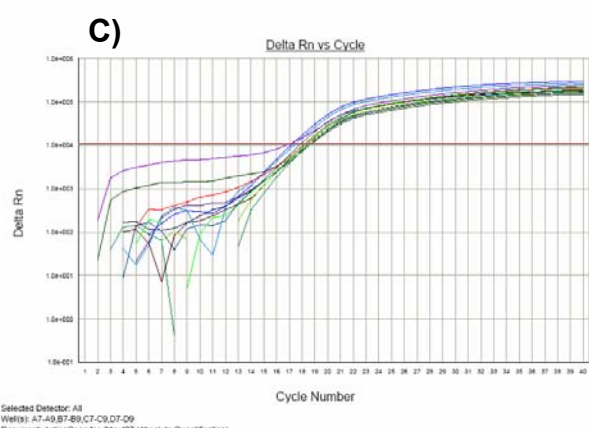
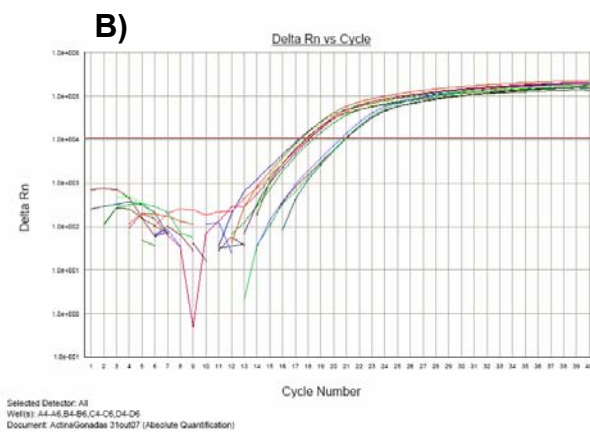
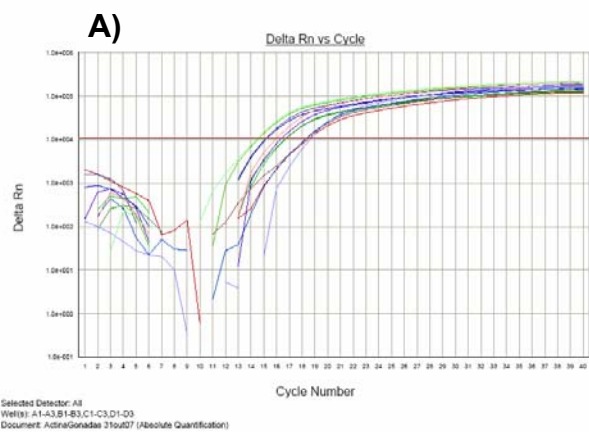
### **Análise da expressão do elemento *P* em tecido gonadal dos mutantes de *D. willistoni Sepia* e *white*.**

A possível indução da expressão do elemento *P* em gônadas, pelos compostos disseleneto de difenila e paraquat foi avaliado quantificando-se comparativamente o total de mRNA produzido por esse gene, na presença dos compostos e na sua ausência, com aqueles produzidos por genes de expressão constitutiva (“house keeping”). Os genes de expressão constitutiva escolhidos foram o da  $\beta$ -Actina e da tubulina.

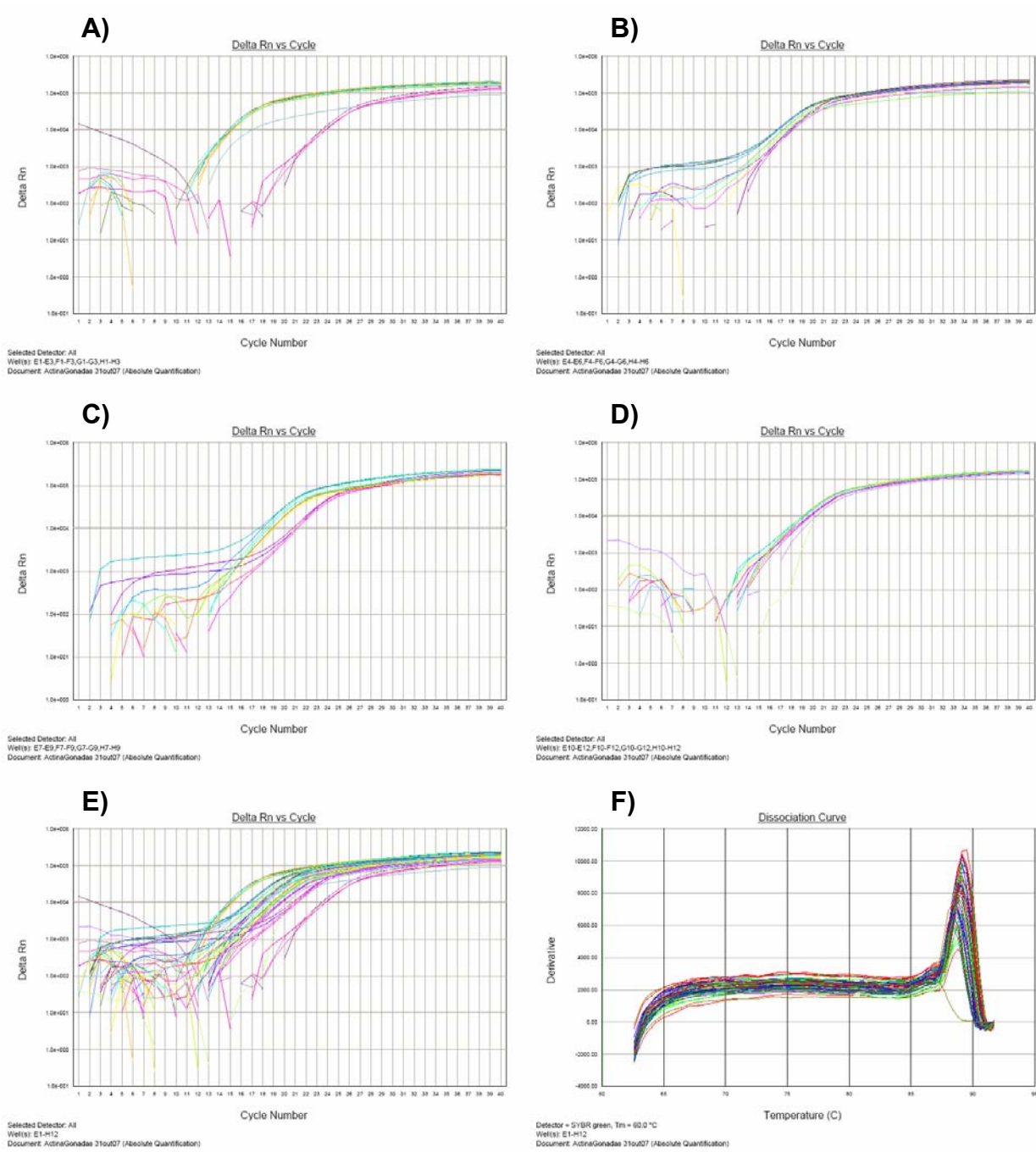
A análise da expressão do elemento *P* em gônadas, iniciou-se pela quantificação da expressão do gene constitutivo  $\beta$ -Actina (Figura 12) no mutante *Sepia* de *D. willistoni*. Em gônadas Controle (Figura 12A), a amplificação de  $\beta$ -Actina demonstrou uma variação dentro das amostras biológicas, ocorrendo a formação de três grupos de amplificações com um diferença em torno de oito vezes. O tratamento com (PhSe)<sub>2</sub> (Figura 12B) ocorreu de forma semelhante a figura anterior, porém com a formação de dois grupos distintos. Na figura 12C, a

amplificação dos cDNAs dos tratamentos com paraquat, demonstrou ser mais homogênea, estando as curvas muito próximas e paralelas. Na Figura 12D, não ocorreram grandes diferenças de ciclos entre as amostras biológicas, demonstrando que a quantidade de mRNA extraída foi semelhante. As quatro amplificações estão reunidas na Figura 12E e pode-se observar a variação nas amplificações. A especificidade das amplificações assim como uma estimativa da qualidade dos cDNAs utilizados podem ser verificados pelas curvas de dissociação de todas as amplificações (Figura 12F). Pode-se observar a formação de apenas um pico de dissociação, demonstrando que os *primers* desenhados para  $\beta$ -Actina são específicos para apenas uma região e que não houve a formação de dímeros de *primers* e também que os cDNAs não apresentam contaminações por DNAs exógenos.

A análise da expressão do gene constitutivo  $\beta$ -Actina em gônadas do mutante *white* de *D. willistoni* está exposta na Figura 13. A expressão de  $\beta$ -Actina no grupo Controle (Figura 13A) demonstrou que ocorreu uma diferença de vários ciclos na amplificação dentro das amostras biológicas, separando em dois grupos. No tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  (Figura 13B), a expressão da  $\beta$ -Actina demonstrou-se semelhante em todas as amostras biológicas, obtendo uma diferença dentro do grupo em torno de duas vezes. Nas amplificações dos cDNAs provenientes do tratamento com paraquat (Figura 13C), ocorreu uma separação das amplificações em dois grupos distintos devido as quantidades de cDNA serem diferentes. Na Figura 13D, está demonstrado o efeito do tratamento do choque de calor sobre a produção de mRNA de  $\beta$ -Actina, onde ocorreu pouca variação na amplificação, indicando que as quantidades de cDNAs utilizadas foram bastante próximos. Os conjuntos das amplificações estão colocados na Figura 13E, onde observamos todas as amplificações juntas. A especificidade das amplificações assim como uma estimativa da qualidade dos cDNAs utilizados podem ser verificados pelas as curvas de dissociações de todas as amplificações (Figura 13F). Podemos observar a formação de apenas um pico de dissociação, demonstrando que os *primers* desenhados para  $\beta$ -Actina são específicos para apenas uma região e que não ocorreram a formação de dímeros de *primers* e também que os cDNAs não apresentam contaminações por DNAs exógenos.



**Figura 12 - Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de  $\beta$ -Actina para *D. willistoni* Sepia em Gônadas; **A)** Controle; **B)**  $(\text{PhSe})_2$ ; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.**

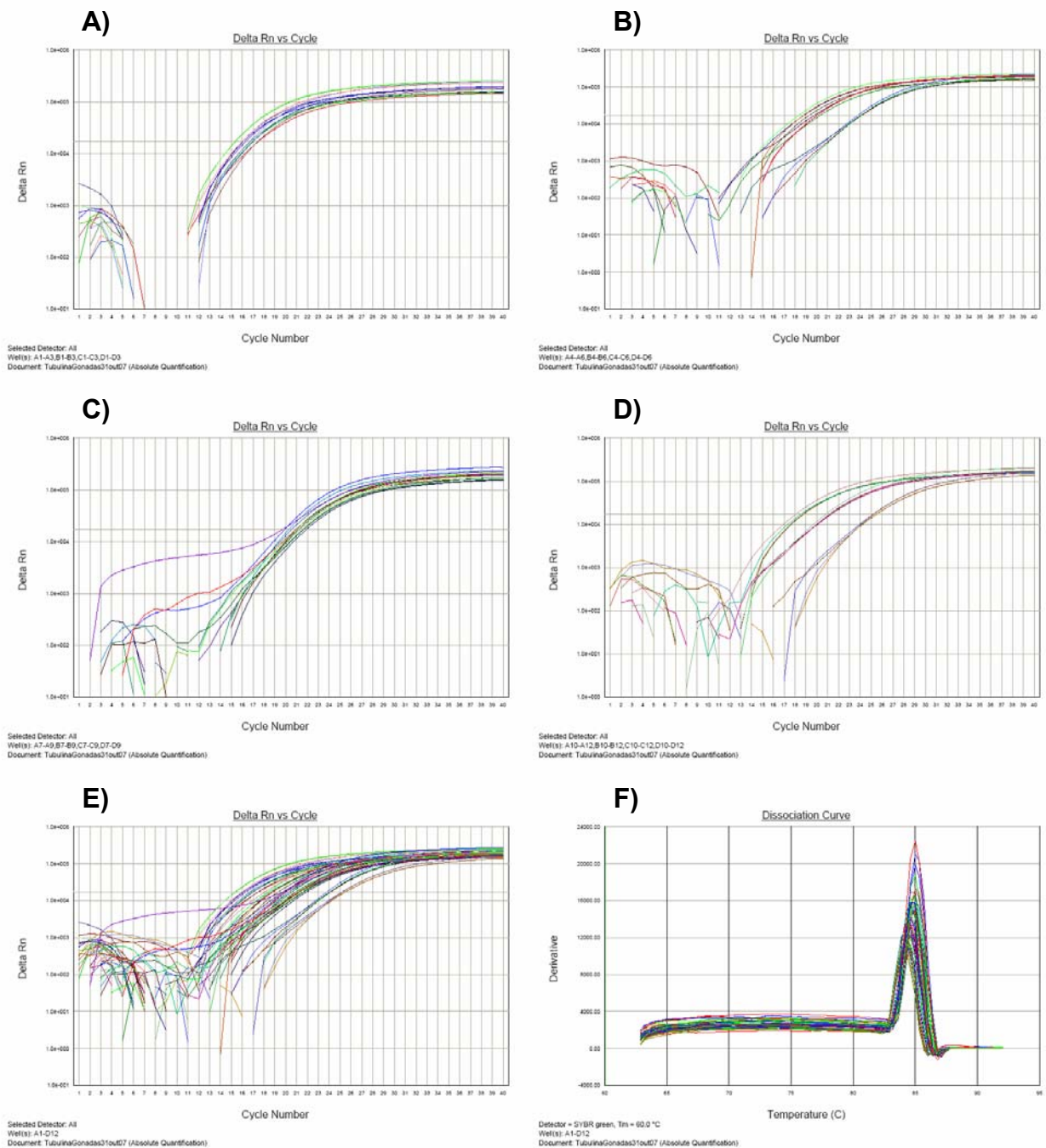


**Figura 13** - Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de  $\beta$ -Actina para *D. willistoni white* em Gônadas; **A)** Controle; **B)**  $(\text{PhSe})_2$ ; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.

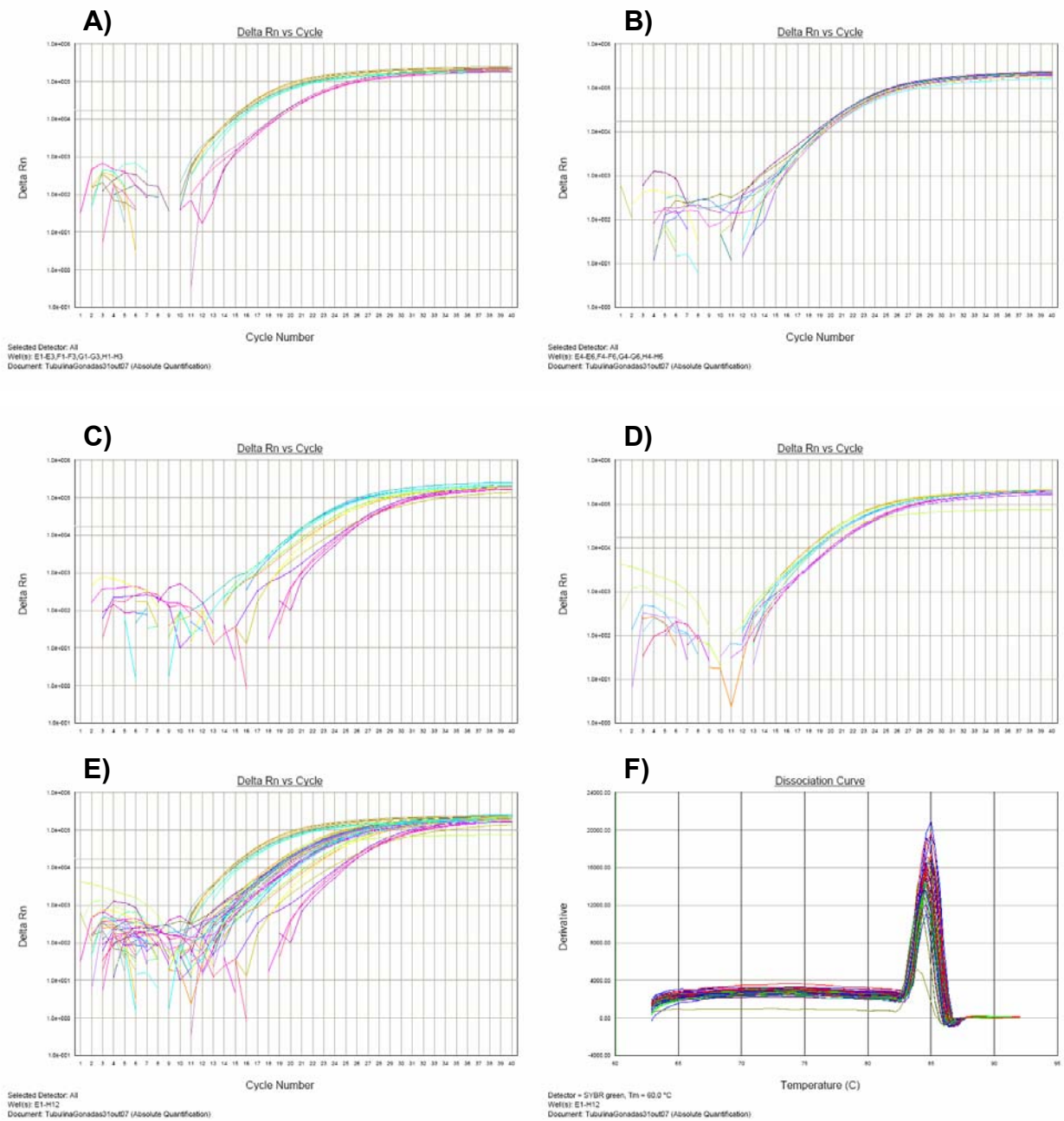
Outro gene utilizado como Controle e padronização da expressão foi o gene da Tubulina. As curvas de amplificação do cDNA de Tubulina para o mutante *Sepia D. willistoni* em gônadas estão expostas na Figura 14. As amplificações das amostras controle (Figura 14A) demonstraram um mesmo padrão de amplificação, ficando agrupadas em um único bloco de amplificação, embora possam notar que ocorreu uma diferença de até quatro vezes na quantidade de cDNAs. Na Figura 14B, está demonstrado as amplificações dos cDNAs de gônadas provenientes do tratamento com  $(\text{PhSe})_2$ , onde observa-se que ocorreu diferença nas amplificações dentro do mesmo tratamento. Na Figura 14C, tratamento com paraquat as amplificações das amostras demonstraram um mesmo padrão de amplificação, ficando agrupadas em um único bloco de amplificação, embora possam notar que ocorreu uma diferença de até quatro vezes. Já na Figura 14D, tratamento com choque de calor, ocorreram separações das amostras biológicas em três grupos, sem apresentar uma amplificação homogênea. O padrão geral de amplificações estão representadas na Figura 14E. Na Figura 14F, as curvas de dissociações estão demonstrando a especificidade da amplificação, com a formação de apenas um produto.

As curvas de amplificação do cDNA de Tubulina para mutante *white* de *D. willistoni* em gônadas estão expostas na Figura 15. Nas amostras Controle (Figura 15A), a amplificação de Tubulina demonstrou uma variação dentro das amostras biológicas, ocorrendo a formação de dois grupos de amplificações com um diferença em torno de 32 vezes. Na Figura 15B, está demonstrado as amplificações dos cDNAs de gônadas provenientes do tratamento com  $(\text{PhSe})_2$ , onde observa-se que as curvas de amplificações de Tubulina mostraram-se semelhante em todas as amostras biológicas, tendo uma diferença dentro do grupo em torno de duas vezes. Figura 15C, tratamento com paraquat as amplificações das amostras mostram uma ampla variação na amplificação em torno de 32 vezes. Já na Figura 15D, tratamento com choque de calor, ocorreu variação na amplificação em torno quatro vezes. O padrão geral de amplificações estão representadas na Figura 15E. Na Figura 15F, as curvas de dissociações estão demonstrando a especificidade da amplificação, com a formação de apenas um produto.

A análise da expressão do elemento transponível *P* em gônadas dos mutantes de *D. willistoni*, *Sepia* e *white* são demonstrados na Figura 16. Podemos observar na Figura 16A que os *primers* utilizados não foram adequados para essa técnica, pois não ocorreu uma fase exponencial de ampliações nas amostras. Os sinais que aparecem sugerem que são apenas formações inespecíficas, fato que pode ser explicado pelas curvas de dissociações (Figura 16B). Podemos observar que apenas em poucas amostras ocorreram a formação de algum produto, porém não é específico, pois a temperatura de dissociação está abaixo do esperado e não devem ser consideradas. Também observamos, de forma geral, que na grande maioria das amostras não ocorreram ampliações.

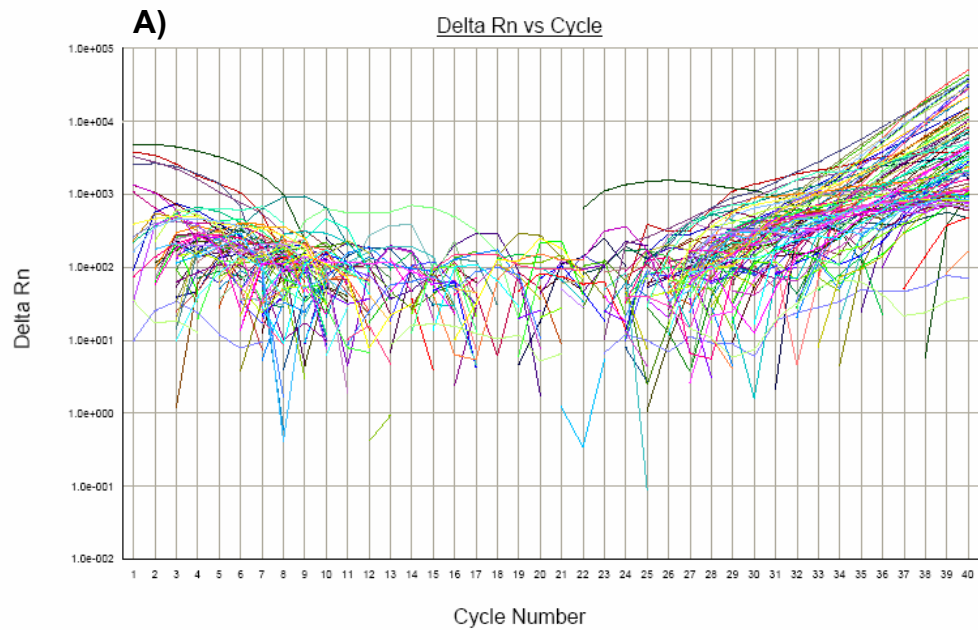


**Figura 14 - Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de Tubulina para *D. willistoni* Sepia em Gônadas; A) Controle; B) (PhSe)<sub>2</sub>; C) Paraquat; D) Heat Shock; E) As 4 amplificações; F) Curvas de dissociações.**

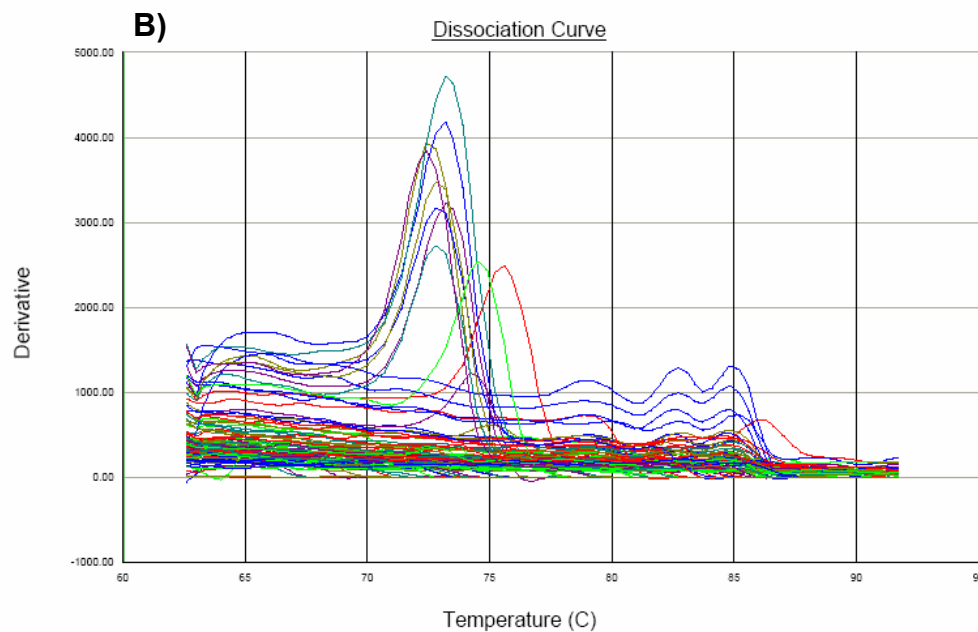


**Figura 15** - Real Time PCR, Curvas de amplificação do cDNA de **Tubulina** para *D. willistoni white* em Gônadas; **A)** Controle; **B)**  $(\text{PhSe})_2$ ; **C)** Paraquat; **D)** Heat Shock; **E)** As 4 amplificações; **F)** Curvas de dissociações.





Selected Detector: All  
Well(s): A1-H12  
Document: GonadasElementP31out07 (Absolute Quantification)



Detector = SYBR green, Tm = 60.1 °C  
Well(s): A1-H12  
Document: GonadasElementP31out07 (Absolute Quantification)

**Figura 16** - *Real Time PCR*, Amplificação do cDNA do elemento transponível *P* em Gônadas. **A)** Amplificações com todas as amostras biológicas; **B)** Curva de dissociação das amplificações.

### III.5. Discussão, Conclusões e Perspectivas

Em populações naturais, a maioria dos organismos regularmente está exposta a ameaças agudas à sobrevivência, como temperaturas extremas e privação alimentar, por exemplo. Estresses são fatores ambientais que provocam mudanças no sistema biológico, sendo potencialmente prejudiciais.

Os dados obtidos na presente tese nos mostram primeiramente que *Drosophila melanogaster* e as espécies do subgrupo *willistoni*, são bastante diferentes quanto à sua sensibilidade à intoxicação por selênio. Assim, as concentrações de disseleneto de difenila aplicadas às cinco espécies do subgrupo *willistoni* e às três linhagens de *D. willistoni* (Capítulo III), necessitaram ser bem menores do que as aplicadas em *D. melanogaster* (Capítulo II) conforme resultados de nossos experimentos pilotos (dados não mostrados). O fato dessas espécies serem neotropicais, tendo evoluído num ambiente potencialmente mais rico em substratos alimentares e a variações climáticas ao longo dos 50 milhões de anos de separação da radiação *melanogaster-willistoni*, pode em parte explicar as diferenças encontradas. Um achado extremamente relevante foi propiciado pelo recente sequenciamento do genoma de onze novas espécies de *Drosophila* comparativamente com *D. melanogaster* (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007): apenas na *D. willistoni* não foram encontradas seqüências homólogas às dos genes que produzem selenoproteínas. Considerando que selenoproteínas estão presentes em todos os animais, *D. willistoni* parece ser o primeiro animal conhecido a “perder” essas proteínas. Considerando ainda, que selenoproteínas são responsáveis pela redução das quantidades excessivas de selênio presentes numa grande variedade de substâncias alimentares, fica claro que *D. willistoni* (e talvez suas crípticas ainda não sequenciadas) não pode prescindir de um mecanismo de defesa como as selenoproteínas. Portanto, nossos dados dão suporte à idéia de que *D. willistoni* possa codificar proteínas com função semelhante por uma via alternativa, abrindo caminho para novas pesquisas, que incluam as suas espécies crípticas.

Cabe comentar, que a resposta ao selênio foi muito mais drástica nos estágios ovo-pupa do que nos estágios pupa-mosca de todas as espécies

estudadas, sugerindo que no começo do desenvolvimento, incluindo a morfogênese e fase de alimentação, a toxicidade do selênio seja mais efetiva. Diferenças de sensibilidade nessas fases, entretanto, foram encontradas entre *D. melanogaster* e as espécies do subgrupo *willistoni*. Em *D. melanogaster* verificou-se um pequeno incremento na viabilidade na fase pupa-mosca em resposta ao selênio na concentração de 300  $\mu\text{mol}$ , possivelmente por ela possuir um sistema de proteção via selenoproteínas mais eficiente do que os possivelmente existentes no subgrupo *willistoni*.

Diferenças de sensibilidade ao selênio, entre linhagens de *D. willistoni* também foram detectadas, sendo o maior efeito mostrado nas linhagens mutantes *Sepia* e *white*, como normalmente esperado, considerando a menor adaptabilidade dos fenótipos mutantes.

Entre as espécies crípticas, a *D. equinoxialis* foi a mais resistente à intoxicação por selênio, e *D. insularis* a mais sensível. Uma explicação mais precisa para essas diferenças ainda não está disponível, mas pode se conjecturar que possivelmente elas reflitam diferenças ambientais atuantes em seus locais de origem. Por exemplo, *D. insularis* é endêmica das ilhas do Caribe, enquanto *D. equinoxialis* ocupa um amplo território que vai da América Central até a metade da América do Sul (Spassky *et al.*, 1971).

Quanto à resistência ao paraquat [dichloride.(1,1-dimethyl-4,4-bipyridinium)], composto que age gerando radicais livres de oxigênio, novamente observamos que as espécies do subgrupo *willistoni* foram mais sensíveis a esse composto quando tratadas nos estágios ovo-pupa. As concentrações utilizadas chegaram até a 50 mM apenas em *D. paulistorum* e *D. tropicalis*, as mais resistentes, enquanto as linhagens mutantes *Sepia* e *white* de *D. willistoni* que foram as mais sensíveis resistiram até o máximo de 30 mM. Na *D. willistoni* selvagem concentrações de até 40 mM foram toleradas. Essas diferenças talvez reflitam diferentes estratégias de defesa contra o dano oxidativo, utilizadas por espécies que evoluíram sob pressões seletivas diferentes.

Entre os mecanismos de defesa contra estresses químicos, nos propusemos a estudar os níveis de expressão das proteínas de choque térmico, Hsp70 e Hsp83, envolvidas em importantes processos celulares, como a

manutenção da conformação tridimensional das proteínas (Feder e Hofmann 1999). Quanto a Hsp83, que corresponde a Hsp90 em vertebrados, sabe-se de uma nova função a ela atribuída por Rutherford e Lindquist (1998) que seria a de tamponar a variabilidade fenotípica devida a mutações em rotas críticas para o desenvolvimento embrionário. Talvez por interferir com a proteção da Hsp83, os compostos utilizados tenham sido mais tóxicos no período ovo-pupa de todas as espécies estudadas.

O uso da metodologia do *PCR* em tempo real, foi uma tentativa de detectar a variação da expressão dos genes *hsp70* e *hsp83*, em resposta aos tratamentos. Os resultados demonstram que ocorreram variações nas expressões dos genes de choque térmico, mas também na dos genes constitutivos tubulina e  $\beta$ -actina, para todos os tratamentos testados ((PhSe)<sub>2</sub>, paraquat e *heat shock*), inclusive o tratamento controle. Assim diferentemente da hipótese inicial e do que é referido na literatura, nossos resultados não foram totalmente conclusivos. Apesar disso, foram estabelecidas condições experimentais para estudos futuros após os ajustes necessários.

Observou-se nesses experimentos que ocorreu uma ampla variação de amplificação em todos os genes estudados dentro do mesmo tratamento, levando a um grande desvio padrão na expressão desses, como demonstrado nas tabelas 1 e 2. Entretanto, Golombieski *et al.* (2008- Capítulo II desta tese) trabalharam com *D. melanogaster* expostas a (PhSe)<sub>2</sub> e encontraram um aumento em torno de 15% na expressão do gene de *hsp83*, utilizando *Northern blot* o que é sugestivo do uso desse sistema de proteção também no grupo *willistoni*. Em experimentos futuros se utilizará *Northern blot* para detectar a expressão de *hsp70* e *hsp83* nas espécies anteriormente citadas.

Ainda quanto as amplificações por *PCR Real time* observou-se uma grande variação dos genes estudados entre as linhagens *Sepia* e *white* de *D. willistoni*, o que foi atribuído a diferenças genéticas no desenvolvimento das larvas, intrínsecas às linhagens.

Também foi encontrada uma diferença de comportamento das larvas tratadas de todas as espécies em relação ao tratamento controle. Essas diferenças se expressaram desde o momento da eclosão até o terceiro instar, que

é a fase em que elas ingerem alimento no meio de cultura. Muitas vezes observou-se nas larvas de primeiro instar um comportamento de fuga, saindo do meio de cultura e ficando nas laterais do vidro até buscarem novamente o alimento. Isto ocorreu até o terceiro instar, quando então as larvas subiam nas laterais dos vidros para atingir o estágio de pupa. Esse comportamento não é o padrão da espécie que se observa nas culturas mantidas em condições ótimas.

No caso dos tratamentos com choque de temperatura (*Heat shock*) foram encontrados resultados que demonstram a diminuição da expressão gênica de *hsp70* e *hsp83*, o que contraria totalmente a literatura sobre o assunto. Todos os estudos realizados mostram que as proteínas de choque térmico (Hsp) são induzidas por temperaturas críticas para a sobrevivência dos organismos, ocorrendo um acentuado aumento na expressão desses genes (Lindquist, 1980; Lindquist e Craig, 1988; Feder e Hofmann, 1999; Sørensen *et al.*, 2003).

Cabe ressaltar que ao utilizar-se a técnica de *Real Time PCR* (RT-PCR) a qualidade das amplificações foi excelente demonstrando também que os cDNAs utilizados foram bons, mas que as variações de amplificação mostradas dentro dos tratamentos comprometem a análise biológica dos resultados apresentados. De acordo com Bustin (2000), Schmittgen e Zakrajsek (2000) e Nicot *et al.* (2005), para a técnica de RT-PCR os genes *housekeeping* não devem sofrer variações nas expressões.

Finalmente, a tentativa de detectar a possível mobilização do elemento *P* paralelamente aos tratamentos através de *PCR* em tempo real, produziu resultados inconclusivos. Isso se deve possivelmente ao fato de os *primers* utilizados para amplificar a transposase não terem se mostrado os mais adequados. No entanto, experimentos futuros serão realizados buscando o emprego de outros *primers* para essa técnica, além de outras metodologias.

#### IV. Referências bibliográficas

- Alsina B, Corominas M, Berry MJ, Baguña J and Serras F (1999) Disruption of selenoprotein biosynthesis affects cell proliferation in the imaginal discs and brain of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 112:2875-2884.
- Alsina B, Serras F, Baguña J and Corominas M (1998) *patufet*, the gene encoding the *Drosophila melanogaster* homologue of selenophosphate synthetase, is involved in imaginal disc morphogenesis. *Mol Gen Genet* 257: 113-123.
- Amir-Shapira D, Leustek T, Dalie B, Weissbach H and Brot N (1990) Hsp70 proteins, similar to *Escherichia coli* DnaK, in chloroplasts and mitochondria of *Euglena gracilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1749-1752.
- Arking R, Buck S, Berrios A, Dwyer S and Baker III (1991) Elevated paraquat resistance can be used as a bioassay for longevity in a genetically based long-lived strain of *Drosophila*. *Develop Genetics* 11:141-148.
- Artavanis-Tsakonas S, Moran L, Mirault ME, Schedl P and Lis J (1979) The genes for the 70,000 d heat shock protein in the cloned *Drosophila melanogaster* DNA Segments. *Cell* 17: 9-18.
- Ashburner M (1970) Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. V. Responses to environmental treatments. *Chromosoma* 31(3):356-376.
- Ashburner M (1972) Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. VI. Induction by ecdysone in salivary glands of *D. melanogaster* cultured in vitro. *Chromosoma* 38(3):255-281.
- Ayme A and Tissières A (1985) Locus 67B of *Drosophila melanogaster* contains seven, not four, closely related heat shock genes. *EMBO J* 4:2949-2954.
- Bächli G (2006) Taxodros, the database on taxonomy of Drosophilidae. <http://www.taxodros.unizh.ch>. Acesso em dezembro de 2006.
- Becker J and Craig EA (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219:11-23.
- Berendes HD (1965) Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. *Chromosoma* 17:35-77.
- Bier, E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6:9-23.

- Blauth ML (2005) Expressão de elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Bonorino CBC, Pereira M, Alonso CEV, Valente VLS, Abdelhay E (1993a) *In situ* mapping and the hsp70 locus in seven species of the *willistoni* group of *Drosophila*. Rev Bras Gen 16:561-571.
- Bonorino CBC, Silva T, Abdelhay E and Valente VLS (1993b) Heat shock genes in the *willistoni* group of *Drosophila*: induced puffs and proteins. Cytobios 73: 49-64.
- Burk RF, Lawrence RA and Lane JM (1980) Liver Necrosis and Lipid Peroxidation in the Rat as the Result of Paraquat and Diquat Administration: Effect of Selenium deficiency. J Clin Invest 65:1024-1031.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol 25:169-193.
- Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M and Anderson RL (1998) Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. J Biol Chem 273(27):17147-17153.
- Capy P, Bazin C, Higuier D and Langin T (1997) Dynamic and Evolution of Transposable Elements. R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA.
- Capy P, Gasperi G, Biémont C and Bazin C (2000) Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? Heredity 85:101-106.
- Carson HL (1971) The ecology of *Drosophila* breeding sites. Harold Lyon Arboretum Lecture, Number two, University of Hawaii, pp 1-28.
- Chakrani F, Capy P and David JR (1993) Developmental temperature and somatic excision rate of mariner transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. Genet Sel Evol 25:121-132.
- Cordeiro, AR and Winge H (1995) Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni*. In: Levine L (Ed). "Genetics of natural populations: the continuing importance of Theodosius Dobzhansky". Columbia University Press 262-280.
- Craig EA, Kramer J and Kosic-Smithers J (1987) SSC1, a Member of the 70-kDa Heat Shock Protein Multigene Family of *Saccharomyces cerevisiae*, is Essential for Growth. Proc Natl Acad Sci USA 84:4156-4160.

- Craig EA, Kramer J, Shilling J, Werner-Washburne M, Holmes S, Kosic-Smith J and Nicolet CM (1989) *SSC1*, an essential member of the *S. cerevisiae* HSP70 multigene family encodes a mitochondrial protein. *Mol Cell Biol* 9:3000-3008.
- Cunha GL, Da Cruz IB, Fiorino P and Oliveira AK (1995) Paraquat resistance and starvation conditions in the selection of longevity extremes in *Drosophila melanogaster* populations previously selected for long and short developmental period. *Dev Genet* 17:352-361.
- Daniels CJ, McKee AHZ and Doolittle WF (1984) Archaeobacterial heat shock proteins. *EMBO J* 3:745-749.
- David JR, Moreteau B, Gauthier JP, Pétavy G, Stockel J and Imasheva AG (1994) Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale lines analysis. *Genet Sel Evol* 26:229–251
- DÁvila MF, Loreto ELS, Garcia RN and Valente VLS (2008). Analysis of phenotypes altered by temperature stress and hypermutability in *Drosophila willistoni*. *Iheringia, Sér Zool (no prelo)*.
- Delpuech JM, Moreteau B, Ciche J, Pla E, Voudibio J and David JR (1995) Phenotypic plasticity and reaction norms in temperature and tropical populations of *Drosophila melanogaster*: ovarian size and developmental temperature. *Evolution* 49:670-675.
- DeLuca-Flaherty C, McKdy BB, Parham P and Hill BL (1990) Uncoating Protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell* 62:875-887.
- Drosophila* 12 genomes consortium (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450:203-218.
- Ehrman L and Powell JR (1982) The *Drosophila willistoni* species group. In: Ashburner M, Carson HL and Thompson JN (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, New York, pp 193-225.
- Engman D, Kirchhoff LV and Donelson JE (1989) Molecular cloning of *mtp70*, a mitochondrial member of the hsp70 family. *Mol Cell Biol* 9:5163-5168.
- Farrington JA, Ebert M, Land EJ and Fletcher K (1973) Bipyridylium quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of



- paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochim Biophys Acta* 314:372-381. *Abstract*.
- Fayet O, Ziegelhoffer T and Georgopoulos C (1989) The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* 171(3):1379-1385.
- Feder EM, Parsell AD and Lindquist S (1995) The stress response and stress proteins. In: Lemasters JJ and Oliver C (Eds) *Cell Biology of Trauma*. CRC Press. Boca Raton 177-191.
- Feder ME and Hofmann GE (1999) Heat-Shock Proteins, molecular chaperones and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243-282.
- Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet* 5:103–107.
- Fullilove SL and Jacobson AG (1978) Embryonic Development- Descriptive. In: Ashburner M. and Wright TRF (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, N. York. Vol 2c, pp106-229.
- Gaiesky VLSV and Loreto ELS (2003) Controle genético do desenvolvimento: o modelo *Drosophila*. In: Zaha A, Ferreira HB and Passaglia LMP (eds) *Biologia molecular básica*. Mercado aberto, Porto Alegre. 3 ed, pp362-378.
- Garza D, Medhora M, Koga A and Hartl DL (1991) Introduction of the transposable element *mariner* into the germline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 128:303-310.
- Gebhardt MD and Stearns SC (1988) Reaction norms for developmental time and weight at eclosion in *Drosophila mercatorum*. *J Evol Biol* 1:335-354.
- Georgopoulos CP, Hendrix RW, Casjens SR and Kaiser AD (1973) Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J Mol Biol* 76(1):45-60.
- Giraud T and Capy P (1996) Somatic activity of the *mariner* transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. *Proc Roy Soc Lond. (Biol)* 263:1481-1486.
- Gleason JM, Griffith EC and Powell JR (1998) A molecular phylogeny of the *Drosophila willistoni* group: conflicts between species concepts? *Evol* 52(4):1093-1103.

- Golombieski RM, Graichen DAS, Rocha JBT, Valente VLS and Loreto ELS (2008) Over-activation of the *Drosophila melanogaster hsp83* gene by selenium intoxication. *Genet Mol Biol. (No prelo)*
- Grandbastien MA (1998) Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plants Science* 3:181-187.
- Grandbastien MA, Lucas H, Morel JB, Mhiri C, Vernhettes S and Casacuberta JM (1997) The expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is linked to the plant defense responses. *Genetica* 100:241-252.
- Grimaldi DA (1990) A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bull AMNH*, 197.
- Griswold CM, Matthews AL, Bewley KE and Mahaffey JW (1993) Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134:781–788.
- Gunter C, Cesari F, Nath D, Chou I-H, Eccleston A and Dhand R (2007) Genome labours bear fruit. *Nature* 450, 7167:183.
- Haas IG and Wabl M (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306:387-389.
- Hall BG (1998) Adaptive mutagenesis: a process that generates almost exclusively beneficial mutations. *Genetica* 102-103:109-125.
- Hall BG (1999) Transposable elements as activators of cryptic genes in *E. Coli*. *Genetica* 107:181–187.
- Hatfield DL and Gladyshev VN (2002) How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 22(11):3565-3576.
- Helzlsouer K, Jacobs R and Morris S (1985) Acute selenium intoxication in the United States. *Proc Fed Am Soc Exp Biol* 44:1670.
- Hirosawa-Takamori M, Jäckle H and Vorbrüggen (2000) The class selenophosphate synthetase gene of *Drosophila* contains a functional mammalian-type SECIS. *EMBO rep* 1(5):441-446.
- Imasheva AG, Bosenko DV, Bubli OA (1999) Variation in morphological traits of *Drosophila melanogaster* (fruit fly) under nutritional stress. *Heredity* 82:2,187-192.

- Imasheva AG, Loeschcke V, Zhivotovsky LA and Lazeby OE (1997) Effects of extreme temperatures on phenotypic variation and developmental stability in *Drosophila melanogaster* and *D. buzzatii*. *Biol J Linn Soc* 61:117-126.
- Imasheva AG, Loeschcke V, Zhivotovsky LA and Lazeby OE (1998) Stress temperatures and quantitative variation in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 81:246-253.
- Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA and Pfanner N (1990) Requirement for Hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348:137:143.
- Keene MA, Corces V, Lowenhaupt K and Elgin SCR (1981) DNase I Hypersensitive Sites in *Drosophila* Chromatin Occur at the 5' Ends of Regions of Transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(1):143-146.
- Kidwell MG (1983) Evolution of Hybrid Dysgenesis Determinants in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1655-1659.
- Kidwell MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115:49-63.
- Kidwell MG and Lisch DR (2000) Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol* 15: 95–99.
- Kidwell MG and Lisch DR (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55:1–24.
- Kimpel JA and Key JL (1985) Presence of heat shock mRNAs in field grown soybeans. *Plant Physiol* 79:672-678.
- Klein CC (2002) Estudo de fenômenos possivelmente relacionados com a mobilização de elementos transponíveis e a presença de endoparasitas em populações de *Drosophila willistoni*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Klein CC, Essi L, Golombieski RM and Loreto ELS (1999) Disgenesia do híbrido em populações de *Drosophila melanogaster*. *Ciência & Natura* 21:51-64.
- Koehn RK and Bayne BL (1989) Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biol J Linn Soc* 37:157-171.

- Lazebny OE, Zakharchuk EB and Imasheva AG (1996) Larval density and variation of body size in laboratory lines of *Drosophila melanogaster*. Russ J Genet 32:1010-1012.
- Leustek T, Dalie B, Amir-Shapira D, Brot N and Weissbach H (1989) A member of the Hsp70 family is localized in Mitochondria and resembles *Escherichia coli* DnaK. Proc Natl Acad Sci USA 86:7805-7808.
- Li GC and Laszlo A (1985) Thermotolerance in mammalian cells: a possible role for the heat shock proteins. In: Atkinson BG and Walden DB (eds) Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress. Academic Press, London, pp 349-371.
- Lindquist S (1980) Varying patterns of protein synthesis during heat shock: implications for regulation. Dev Biol 77:463-479.
- Lindquist S (1986) The Heat-Shock Response. Ann Rev Biochem 55:1151-1191.
- Lindquist S and Craig EA (1988) The Heat-Shock Proteins. Annu Rev Genet 22:631-77.
- Lopez-Buesa P, Pfund C and Craig EA (1998) The biochemical properties of the ATPase activity of a 70-KDa heat shock protein (Hsp70) are governed by the C-terminal domains. Proc Natl Acad Sci 95:15253-15258.
- Macario AJL and Conway de Macario (2000) Stress and molecular chaperones in disease. Int J Clin Lab Res 30:49-60.
- Martin J, Langer T, Boteva R, Schramel A, Horwich AL and Hartl FU (1991) Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. Nature 352:36-42.
- Mayer MP and Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci 62:670-684.
- McClintock B (1984) The significance of responses to the genome to challenge. Science 226:792-801.
- Morey M, Serras F and Corominas M (2003) Halving the selenophosphate synthetase gene dose confers hypersensitivity to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. FEBS Lett 534:111-114.

- Morozova N, Forry EP, Shahid E, Zavacki AM, Harney JW, Kraysberg Y and Berry MJ (2003) Antioxidant function of a novel selenoprotein in *Drosophila melanogaster*. *Genes to Cells* 8:963–971.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C and Massie B (1997) Role of the human heat shock protein Hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17(9):5317-5327.
- Munro S and Pelham HRB (1986) An hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46:291 -300.
- Navarro-Alarcon M and Lopez-Martinez MC (2000) Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ* 249:347-371.
- Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L and Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56(421):2907-2914.
- Normington K, Kohno K, Kozutsumi Y, Gething MJ and Sambrook J (1989) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* 57:1223 - 1236.
- Ostermann J, Voos W, Kang PJ, Craig EA, Neupert W and Pfanner N (1990) Precursor proteins in transit through mitochondrial contact sites interact with hsp70 in the matrix. *FEBS Lett* 277:281-284.
- Painter EP (1941) The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. *Chem Rev.* 25:179-213.
- Parkes TL, Hilliker AJ and Phillips JP (1993) Genetic and biochemical analysis of glutathione-S-transferase in the oxygen defense system of *Drosophila melanogaster*. *Genome* 36:1007–1014.
- Parsell DA and Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27:437-496.
- Parsons PA (1961) Fly size, emergence time and sternopleural chaeta number in *Drosophila*. *Heredity* 16:455-473.

- Pauli D, Tonka C, Tissières A and Arrigo AP (1990) Tissue-specific Expression of the Heat Shock Protein HSP27 during *Drosophila melanogaster* Development. *J Cell Biol* 111:817-828.
- Pelham HR (1982) A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell* 2:517-528.
- Phillips JP, Campbell SH, Michaud D, Charbonneau M and Hilliker AJ (1989) Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2761-2765.
- Phillips JP, Parkes TL and Hilliker AJ (2000) Targeted neuronal gene expression and longevity in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 35:1157–1164.
- Regner LP, Abdelhay E , Rohde C, Rodrigues JJS and Valente VLS (1999) Temperature-Dependent Gonadal Hybrid Dysgenesis in *Drosophila willistoni*. *Genet Mol Biol* 22:205-211.
- Rieger TT (1999) Mapeamento por hibridação *in situ* e expressão no desenvolvimento, de genes de resposta a estresses e ao hormônio ecdisona em espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre pp 138.
- Rinehart JP, Li A, Yocum GD, Robich RM, Hayward SAL and Denlinger DL (2007) Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11130-11137.
- Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.
- Ritossa F (1964) Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp Cell Res* 35:601-607.
- Rose MD, Misra LM and Vogel JP (1989) *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homologue of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* 57:1211-1221.
- Rothman J (1989) Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* 59:591-601.
- Rubin GM and Lewis EB (2000) A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science* 287:2216–2218.

- Rutherford SL and Lindquist S (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396:336-342.
- Saavedra CCR (1999) Estudo de características associadas ao envelhecimento em espécies de *Drosophila* adaptadas a regiões termicamente distintas. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Schmittgen T and Zakrajsek BA (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46:69–81.
- Sørensen JG, Kristensen TN and Loeschcke V (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Lett* 6:1025-1037.
- Spassky B, Richmond RC, Pérez-Salas S, Pavlovsky O, Mourão CA, Hunter AS, Hoenigsberg H, Dobzhansky T and Ayala FJ (1971) Geography of the sibling species related with *Drosophila willistoni* and the semispecies of the *Drosophila paulistorum* complex. *Evol* 25:129-143.
- Tickoo S and Russell S (2002) *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery, and pathway screening. *Curr Opin Pharmacol* 2: 555–560.
- Trockmorton LH (1975) The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: King RC (ed). *Handbook of genetics*, Plenum Press, New York pp 421-469.
- Viera C and Biéumont C (1996) Geographical variation in insertion site number of retrotransposon 412 in *Drosophila simulans*. *J Mol Evol* 42:443-451.
- Wang H-D, Kazemi-Esfarjani P and Benzer S (2004) Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(34):12610-12615.
- Wilber CG (1980) Toxicology of selenium: A Review. *Clinical Toxicology* 17:171-230.
- Wu C (1985) An exonuclease protection assay reveals heat-shock element and TATA box DNA-binding proteins in crude nuclear extracts. *Nature* 317:84-87.
- Wu C (1995) Heat Shock Transcription Factors: Structure and Regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:441-469.
- Yang G, Wang S, Zhou R and Sun S (1983) Endemic selenium intoxication of humans in China. *A J Clin Nutr* 37:872-881.

Young D, Lathigra R and Mehlert A (1988) Stress-induced proteins as antigens in infectious diseases. In: Seramisco SL, Lindquist SL and Pardue ML (eds) UCLA Symposium on Molecular & Cellular Biology. Liss, New York, 96:275-285.

Young JC, Moarefi I and Hartl FU (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154:267-273.