

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Elementos transponíveis e o envelhecimento: Excisão e
inserção de *mariner* em *Drosophila simulans***

Mariana Cancian

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

Orientador: Élgion Lúcio da Silva Loreto

Porto Alegre, RS

Novembro, 2020

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Sequenciamento (LabDros) no Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sendo financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e pelo PPGBM (Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Agradecimentos

Este trabalho foi um dos mais desafiadores da minha formação acadêmica, no qual o aprendizado foi ainda maior do que eu podia imaginar. Para tanto, tive ajuda de pessoas muito especiais que sem dúvida merecem todo o meu carinho e agradecimento.

À Mônica que me auxiliou desde o entendimento do projeto até o desenvolvimento de cada etapa da esfera molecular, sempre disponível e atenciosa.

Ao Tiago que não mediu esforços para me ajudar a analisar todos os dados, importando-se em me fazer entender cada etapa e desenvolvê-las da melhor maneira possível.

Ao Daniel, pelas contribuições e ajuda para finalizar esta dissertação, bem como pelo carinho, incentivo e discussões.

À Taís, por compartilhar e entender todas as minhas dúvidas e sempre me incentivar e encorajar nos momentos mais difíceis. Também pela amizade maravilhosa que compartilhamos, por sempre me acolher afetivamente e fisicamente, até em meio a uma pandemia.

A Dani, Nader, Karen, Raquel e Nathali pelo apoio, carinho e momentos especiais ao longo desses dois anos.

Ao Labdros-UFSM - no qual incluo Lari, Nader, Kátia, Estéfani, Tai, Pedro, Marcos - por todo o carinho e apoio nos momentos difíceis e por fazerem meus dias no lab mais alegres, discutindo e auxiliando no desenvolvimento do projeto. E também, por nesses últimos dois anos serem em mim uma referência e uma amiga para discutir e ajudar nos trabalhos de cada um, sou muito grata pela consideração e carinho.

Ao Labdros-UFRGS por me acolherem em POA numa das mudanças mais desafiadoras da minha formação e partilharem momentos especiais. Em especial a Prof^a Vera Valente e Prof^a Maríndia Deprá por me fazerem parte do lab e pelo carinho.

Ao Prof Élgion, por me confiar trabalhos desafiadores que me fazem crescer como cientista e como pessoa e pela liberdade e auxílio no desenvolvimento do mestrado. Acredito que uma boa formação depende não só de cobranças e prazos, mas também da liberdade de escolher nossos próprios caminhos dentro de um laboratório, com pessoas que confiem em nosso potencial e que nos amparem. Acredito e admiro a

forma como o Prof Elgion soube medir a liberdade e a cobrança da forma certa para o bom desenvolvimento dos trabalhos ao longo da minha formação acadêmica.

A Neoprospecta, pelo suporte na montagem e no desenvolvimento do projeto, bem como no sequenciamento das amostras.

A farmácia do DI/HUSM, pela ceder, gentilmente, os medicamentos para os experimentos.

Ao Elmo, Gabriel e colegas da secretaria do PPGBM, por toda disponibilidade e atenção para resolver todos os problemas ao longo da minha formação.

Aos colegas e professores do PPGBM, por todo o conhecimento dividido, pelas aulas e discussões incríveis que me fazem amar ter escolhido essa profissão. Em especial a Jéssica, Gabriel e Luiz Eduardo, amizades que foram importantíssimas para além das disciplinas.

Ao Luan, Jamile e Vini, por me acolherem e apresentarem Porto Alegre e por fazerem meus dias mais leves enquanto estive lá. O carinho e a consideração que tenho por vocês é imensurável.

Aos meus pais Adilson e Nelci que não medem esforços para que eu nunca desista dos meus planos e por torcerem por mim o tempo todo. Sou grata por poder contar com o carinho e amor de vocês em todas as situações e por sempre me proporcionarem as melhores oportunidades. Esse trabalho e todas as minhas conquistas eu devo muito a vocês dois, que me incentivaram desde muito cedo e me deixaram voar para alcançar todas as coisas que quero. Amo vocês.

A minha irmã Laisa que conviveu de perto com toda a minha frustração dos experimentos fracassados e que sempre soube me acalmar, incentivar e encorajar. Sou muito feliz de contar com a tua amizade, além da irmandade, e por dividirmos muito mais que um apartamento, mas todos os sonhos e angústias da vida acadêmica.

Ao longo desses dois anos, muitas pessoas tiveram palavras para me encorajar, souberam entender os momentos que estive longe e comemorar comigo cada pequeno experimento que deu certo, bem como estar comigo nos experimentos que deram errados (bem mais frequente). À essas pessoas, toda a minha admiração e reconhecimento!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Elementos Transponíveis.....	11
1.1.1 Classificação dos elementos transponíveis.....	12
1.1.2 Transposons de DNA: superfamília Tc1- <i>mariner</i>	15
1.1.3 <i>mariner</i> e a mutação <i>white-peach</i>	17
1.2 Impacto dos elementos transponíveis nos genomas.....	19
1.2.1 Elementos transponíveis: tamanho e variabilidade dos genomas.....	19
1.2.3 Domesticação/exaptação de elementos transponíveis	20
1.2.4 Elementos transponíveis e evolução	21
1.2.5 Elementos transponíveis e regulação gênica.....	22
1.3 Envelhecimento: causas e consequências	24
1.4 Transposição, instabilidade genômica e envelhecimento.....	25
1.4.1 Instabilidade genômica e envelhecimento.....	25
1.4.2 Transposição somática e germinativa	27
1.4.3 Elementos transponíveis: consequências de inserções somáticas e germinativas	28
1.4.4 Transposição somática e envelhecimento	30
1.5 Controle de elementos transponíveis.....	31
1.5.1 Controle pré e pós-transcricional	32
1.6 Drogas inibidoras de transposição	33
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Descrição da linhagem	35
3.2 Tratamentos com temperatura	35
3.3 Extração de DNA.....	36
3.4 Análise de excisão somática de <i>mariner</i> por qPCR.....	36

3.5 Sequenciamento de regiões <i>upstream</i> e <i>downstream</i> a <i>mariner</i>	38
3.5.1 Clivagem com enzimas de restrição.....	39
3.5.3 Ligação dos adaptadores ao DNA clivado	40
3.5.4 Primers e amplificação.....	41
3.5.5 Sequenciamento	42
3.5.6 Análise do sequenciamento	43
3.5.6.1 Descrição do <i>pipeline</i> TISseq-Pipe.....	43
3.6 Dolutegravir e longevidade	51
4 RESULTADOS E DISCUSS�O.....	52
4.1 Excisão de <i>mariner-peach</i> por qPCR.....	52
4.2 Inserção de <i>mariner</i> por TISseq.....	54
4.2.1 <i>Pipeline</i> TISseq – <i>Multihit</i>	55
4.2.2 <i>Pipeline</i> TISseq – <i>Multihit</i> e <i>Onehit</i>	61
4.2.3 <i>Pipeline</i> TISseq – Concatenado	63
4.2.4 <i>Velvet assembly</i>	64
4.3 Análise de longevidade e Dolutegravir.....	67
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	68
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
7 MATERIAL SUPLEMENTAR.....	79

RESUMO

Elementos transponíveis e o envelhecimento: Excisão e inserção de *mariner* em *Drosophila simulans*

Autora: Mariana Cancian

Orientador: Prof. Dr. Élgiun Lúcio da Silva Loreto

Elementos transponíveis (TEs) são sequências de DNA capazes de mudar de posição no genoma ou entre genomas. Ao mobilizarem-se, são responsáveis por gerar diversos impactos às células. Dentre eles, os TEs podem gerar instabilidade genômica, induzindo quebras cromossômicas, interrompendo genes, bem como estarem relacionados a doenças e ao envelhecimento. Vários estudos sugerem maior mobilidade de TEs ao longo do envelhecimento dos indivíduos, muito devido ao menor silenciamento dos TEs e alteração do estado da cromatina, podendo interferir e acelerar o envelhecimento e o aparecimento de doenças relacionadas a idade. Analisou-se se drosófilas senescentes apresentam uma maior taxa de transposição - excisão e inserção - do elemento *mariner* em relação às mais jovens a 20 e 28°C. Além disso, verificou-se se os elementos *mariner* excisados inserem-se em novos sítios de inserção. Ademais, desenvolveu-se uma metodologia de análise nova, utilizando bioinformática, para verificar as inserções. Por fim, utilizou-se Dolutegravir (DTG), uma droga capaz de silenciar *mariner*, para tratar as moscas durante o envelhecimento buscando aumentar a expectativa de vida. Utilizou-se como organismo modelo *Drosophila simulans* *W^{pch} teste*, que possui duas cópias de *mariner*, sendo a cópia *peach* não-autônoma inserida no gene *white*, responsável pela mutação. Essa mutação altera a coloração dos olhos das moscas para pêssego e a reversão da mutação produz fenótipo mosaico. Além disso, a cópia *peach* é capaz de mobilizar-se por transposases da cópia autônoma *mos1*, que é ativada por temperaturas mais altas. A taxa de excisão foi medida utilizando-se mosaicismo do gene *white* através de RT-qPCR, comparando moscas jovens e senescentes. Para inserção, utilizou-se sequenciamento de fragmentos *upstream* e *downstream* ao TE afim de localizar o elemento em moscas jovens e senescentes. Para tal, foi realizada extração de DNA, clivagem, ligação de adaptadores e PCR em moscas jovens e senescentes nas duas temperaturas. Encontrou-se uma maior taxa de excisão de *mariner* proporcionalmente ao aumento de idade e temperatura, indicando a ocorrência de um acúmulo de transposição somática. Para inserção, sugere-se uma mudança de posições dos elementos tanto em jovens a 20 e 28°C, como em moscas senescentes quando comparadas as jovens nas duas temperaturas. Entretanto, não foi possível determinar as relações envelhecimento-inserção somática e temperatura-inserção somática devido a uma taxa de inserção somática muitas vezes maior do que o hipotetizado, implicando em uma cobertura de sequenciamento insuficiente. Por fim, o tratamento com DTG, capaz de diminuir a mobilização somática de *mariner*, não foi suficiente para prolongar a expectativa de vida das drosófilas.

Palavras-chave: elementos transponíveis, *mariner*, envelhecimento, excisão, inserção, *Drosophila*.

ABSTRACT**Transposable elements and aging: Excision and insertion of *mariner* in *Drosophila simulans*****Author: Mariana Cancian****Advisor: Prof. Dr. Élgion Lúcio da Silva Loreto**

Transposable elements (TEs) are DNA sequences capable of changing positions in the genome or between genomes. When mobilizing, they are responsible for generating several impacts to the cells. Among them, TEs can generate genomic instability, inducing chromosomal breaks, interrupting genes, as well as being related to diseases and aging. Several studies suggest greater mobility of TEs over the aging of individuals, much due to lower silencing of TEs and altered chromatin status, which can interfere and accelerate aging and the appearance of age-related diseases. It was analyzed whether old flies have a higher rate of transposition - excision and insertion - of *mariner* element in relation to the younger ones at 20 and 28°C. In addition, it was checked whether the excised *mariner* elements are inserted in new insertion sites. Also, a new methodological analysis was developed, using bioinformatics, to verify insertions. Finally, Dolutegravir (DTG), a drug capable of silencing *mariner*, was used to treat flies during aging seeking to increase life expectancy. The *Drosophila simulans* *W^{pch} test* model organism was used, which has two copies of *mariner*, the non-autonomous peach copy inserted in the *white* gene, responsible for the mutation. This mutation changes the flies' eyes to peach color and mutation reversion produces a mosaic phenotype. Furthermore, the peach copy is able to mobilize itself by transposases of autonomous copy *mos1*, which is activated by higher temperatures. Excision was measured using *white* gene mosaicism through comparison of RT-qPCR from young and old flies. For insertion, sequencing of fragments upstream and downstream to the TE was used in order to locate the element in young and old flies. For this purpose, DNA extraction, cleavage, connection of adapters and PCR were performed on young and old flies at both temperatures. A higher rate of excision was found in proportion to aging and temperature, indicating the occurrence of an accumulation of somatic transposition. For insertion, a change in the positions of elements is suggested both in young at 20 and 28°C, and in old flies when compared to young at both temperatures. However, it was not possible to determine the aging-somatic insertion and temperature-somatic insertion relationships due to a somatic insertion rate many times higher than the hypothesized, implying insufficient sequencing coverage. Finally, treatment with DTG, capable of decreasing somatic *mariner* mobilization, was not sufficient to prolong the life expectancy of *Drosophila*.

Key words: transposable elements, *mariner*, aging excision, insertion, *Drosophila*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ago - Argonautas

DDD – três resíduos de aminoácido de ácido aspártico

DDE - dois resíduos de aminoácidos de ácido aspártico e um resíduo de ácido glutâmico

DTG - Dolutegravir

En – endonuclease

ERV – retrovírus endógeno

HTH - do inglês, *Helix-Turn-Helix*

HSP- do inglês, *Heat Shock Protein*

IDs – identificador de cada sequência

ICE – elementos conjuntivos integrativos

Kb – quilobases

L1 – elemento transponível LINE-1

LTR – do inglês, *Long Terminal Repeat*

miRNAs - microRNAs

ORF - do inglês, *Open Reading Frame*

Pb – par de base

piRNA – do inglês, *Piwi-interacting RNA*

RPL - gene ribossomal endógeno

siRNA - do inglês, *small interfering RNA*

SVs – Variantes estruturais

TEs – Elementos transponíveis

TIR(s) – do inglês, *Terminal Inverted Repeats*

TISseq – do inglês, *Transposon Insertion Site sequencing*

TS – transposição somática

TSD - do inglês, *Target Site Duplication*

Tsv – do inglês, *Tab Separated Values*

RISC - complexo de silenciamento induzido por RNA

RNAi – RNA de interferência

RT – Transcriptase Reversa

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

qcov – do inglês, *query coverage*

scov – do inglês, *subect coverage*

W^{pch} – mutação *white-peach*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Elementos Transponíveis

Os elementos transponíveis (TEs) são sequências capazes de mudar de posição no genoma (Kidwell e Lisch, 2001) ou entre diferentes genomas (Haren *et al*, 1999). Piégu e colaboradores (2015) expandem o conceito de TEs para “segmentos discretos de DNA capazes de se mover dentro de um genoma hospedeiro de um local cromossômico ou plasmídico para outro e que não usam uma maquinaria molecular específica que eles codificam para infectar o genoma de novos hospedeiros por transferência horizontal”. Essa definição, segundo os autores, limita que vírus, fagos e elementos conjuntivos integrativos (ICE), embora com muitas semelhanças aos TEs, não entrem no conceito de TEs visto que não o são.

Os TEs foram descobertos por Barbara McClintock em meados de 1940 em suas pesquisas com milho. Ela estudava o padrão de coloração do milho e foi pioneira no estudo de citogenética (Pray e Zhaurova, 2008). McClintock descobriu o primeiro elemento de transposição conhecido como sistema Ac/Ds, observando quebras cromossômicas que ocorriam em locais específicos. Essa quebra cromossômica acontecia devido à mobilização de um elemento que ela chamou de Ds – devido ao fato de causar dissociação – e percebeu que para que esse elemento se mobilizasse um outro elemento era necessário, que ela chamou de Ac - de ativador (Pray & Zhaurova, 2008; Fedoroff, 1993). Também descobriu que esse elemento ativador podia saltar sem a presença de Ds, sendo o que chamamos hoje de um elemento autônomo.

A mudança de posição de elementos de um lugar para outro ou de um cromossomo para outro, McClintock chamou de transposição. Ao se transporem de uma região para outra, os elementos podem gerar muitas mudanças no genoma hospedeiro, trazendo algumas vezes consequências biológicas que serão discutidas no decorrer do trabalho. A grande descoberta de McClintock com milho e elementos de transposição só foi reconhecida nos anos seguintes em que se descobriram muitos elementos com características únicas, em diferentes organismos e com muitas implicações aos hospedeiros.

Nos anos 1967 e 1968 os trabalhos de Mell Green mostraram a descoberta de eventos de transposição envolvidos nas mutações do gene *white* em drosófila,

mostrando as descobertas de McClintock em outro organismo. Hoje, a distribuição de TEs é conhecida nos mais diferentes organismos, variando de fungos a humanos, presentes em variadas proporções em seus genomas como, por exemplo, ~40% em camundongos (Biémont, 2010), ~20% em *Drosophila melanogaster* (Biémont, 2010; Mérel *et al*, 2020), em humanos cerca de 45% a 48% do genoma (Biémont, 2010; Nishihara, 2019) e alguns organismos passando de 80%, como é o caso do milho (Schnable *et al*, 2009; Chénais *et al*, 2012).

1.1.1 Classificação dos elementos transponíveis

Para melhor estudar os TEs, diversas classificações foram estabelecidas ao longo dos anos, sendo a primeira proposta por Finnegan (1989, 1992) que agrupou os TEs em duas classes de acordo com o mecanismo de transposição e cada classe era subdividida de acordo com características estruturais. Visto que os conhecimentos acerca dos elementos foram complementados com o avanço das pesquisas, propostas novas e mais complexas foram necessárias para classificá-los. As propostas mais clássicas que se seguiram foram de Curcio e Derbyshire (2003), do Repbase (Jurka *et al*, 2005; Kapitonov e Jurka, 2008) e de Wicker e colaboradores (2007).

A proposta de Curcio e Derbyshire (2003) categoriza os elementos pela maneira como eles se movem, o que é ditado por suas transposases. Eles categorizam os TEs em 5 classes de acordo com as proteínas envolvidas na transposição, que são elas: (1) DDE-transposases, (2) Rolling-circle ou Y2-transposases, (3) Tirosina Y1-transposases, (4) Serina S-transposases e a quinta que codifica uma combinação de atividades de (5) transcriptase reversa e endonuclease (RT/En).

Dentro dessas 5 classes, propuseram critérios adicionais de classificação baseados em características particulares dos mecanismos de transposição, além de investigarem se os TEs são duplicados durante a transposição. Também analisaram critérios de classificação com base no número de intermediários de transposição, sua natureza - RNA, DNA de fita dupla ou DNA de fita simples - e sua configuração - linear versus circular - (Curcio e Derbyshire, 2003; Piégu *et al*, 2015). Os critérios desenvolvidos por Curcio e Derbyshire (2003) podem ser considerados adequados ao contexto evolutivo, pois apontam convergências evolutivas no mecanismo de

transposição de TEs podendo seus mecanismos de mobilidade terem origens evolutivas diferentes (Piégu *et al*, 2015).

A proposta Repbase (Jurka *et al*, 2005; Kapitonov e Jurka, 2008) dividiu os TEs em dois tipos de acordo com o suposto mecanismo de transposição. O Tipo 1 são os transposons de DNA e o Tipo 2, os retrotransposons e, dentro desses dois tipos, foram estabelecidas 5 classes e posteriormente ampliadas para 7 (Kapitonov e Jurka, 2008; Piégu *et al*, 2015). Estas classes são divididas em superfamílias (ou clados) e famílias (Jurka *et al*, 2005; Kapitonov e Jurka, 2008).

Semelhante a proposta inicial descrita por Finnegan (1989, 1992), Wicker e colaboradores (2007) propuseram uma classificação hierárquica dos TEs baseada nas características estruturais e modos de replicação. A divisão continua em duas classes distintas de acordo com a presença ou ausência de um intermediário de RNA na transposição. A classe I é subdividida em 5 ordens e a classe II em 2 subclasses compreendendo 2 ordens cada.

A classe I é composta por elementos que utilizam um intermediário de RNA para realizarem a transposição e é composta pelas ordens: LTR (do inglês, *long terminal repeat*), DIRS (do inglês, *Dictyostelium intermediate repeat sequence*), PLEs (do inglês, *Penelope-like elements*), LINEs (do inglês, *long interspersed nuclear elements*) e SINEs (do inglês, *short interspersed nuclear elements*). A forma de mobilização característica da classe I é “copia-e-cola”, também conhecida por ser uma transposição replicativa, aumentando o número de cópias dos elementos a cada transposição. Por outro lado, a classe II de elementos transponíveis não utiliza intermediário de RNA, sendo conhecida pelo mecanismo “recorta-e-cola”. Esta classe possui divisão em duas subclasses de acordo com o número de fitas que é cortada durante a transposição, mas nunca usando intermediário de RNA (Wicker *et al*, 2007).

A classe II divide-se em duas subclasses sendo: a subclasse I, que compreende elementos da ordem TIR (do inglês, *terminal inverted repeats*) e a ordem *Crypton*, em que as duas fitas de DNA são clivadas para a transposição, ocorrendo uma excisão completa; a subclasse II contém elementos em apenas uma das fitas de DNA é clivada para transposição, sendo uma transposição replicativa sem o intermediário de DNA e possui as ordens *Helitron* e *Maverick* (Wicker *et al*, 2007). Apesar de a subclasse I ser

conhecida pela mobilização conservativa ou não-replicativa, em que o número de cópias não aumenta a cada transposição, destaca-se que o número de cópias pode aumentar se a transposição ocorrer em um momento em que a cromátide-irmã estiver presente.

Piégu e colaboradores (2015) apontam para algumas fraquezas para as propostas do Repbase e Wicker. Cita que são meios pragmáticos de organizar anotações de sequências de DNA existentes dos TEs eucarióticos mais representativos e muitas vezes não levam em conta a história evolutiva (Piégu *et al*, 2015). Essas propostas incluem grupos de classes ou subclasses de TEs filogeneticamente não relacionadas nos fenótipos de retrotransposon e transposon de DNA, ou seja, a classificação não reflete a realidade evolutiva (Piégu *et al*, 2015). Outro ponto ressaltado por Piégu e colaboradores é que as propostas focam apenas em TEs eucarióticos, buscando um sistema de classificação universal, dificultando a difusão e assimilação de conceitos de transposição em TEs procarióticos.

Embora tenhamos muitas classificações para os TEs, muitos elementos ainda são deixados de fora da classificação como por exemplo os elementos *self-splicing* (SSE) que são segmentos de DNA inseridos em regiões hospedeiras expressas (Piégu *et al*, 2015). SSE não são nem retrotransposons e nem transposons de DNA, tendo uma forma única de transposição que depende da maquinaria da célula (Piégu *et al*, 2015). Dentro dos SSE temos ainda duas famílias caracterizadas, os inteins e os introns.

Por fim, os Piégu e colaboradores (2015) sugerem um sistema universal de classificação composta de 8 classes que compartilham características em comum, mas não necessariamente uma origem. As classes são: DDE-transposons, Y1-transposons, Y2-transposons, S-transposons, Retroposons, Intein, Group I intron, além de uma classe para elementos que não se tem informações suficientes para classificá-los adequadamente, chamada TEs pendentes de classificação. Além disso, cada classe é subdividida em ordens e superfamílias.

Com o avanço de metodologias tanto no que tange a capacidade de sequenciamento, quanto na parte molecular, novas classificações e conceitos foram necessários e ainda o serão afim de que se aperfeiçoe a classificação dos TEs. Uma

das novidades que auxiliam no entendimento dos TEs é o constante avanço da bioinformática aliada aos sequenciamentos. Arkhipova (2017) apresenta uma visão geral histórica e atual não só da classificação dos TEs, mas das relações evolutivas, bem como da diversidade de TEs descobertos nos últimos tempos.

Além disso, Arkhipova (2017) propõe considerar-se a classificação dos TEs baseada em três funções relacionadas a sua capacidade proliferativa, sendo elas: replicativa, integrativa e estrutural. Replicativa e integrativa são duas funções de natureza enzimática enquanto a função estrutural diz respeito a conservação da estrutura mais do que da sequência (Arkhipova, 2017).

Além das classificações no sentido de organizações hierárquicas, os TEs de maneira geral ainda podem ser divididos quanto a capacidade de se autotranspor, sendo chamados de elementos autônomos e não-autônomos. Os elementos autônomos, segundo Wicker e colaboradores (2007), são aqueles que parecem codificar todos os domínios necessários para transposição, como a transposase, por exemplo.

Por outro lado, os elementos não-autônomos são aqueles que, por si só, não tem a capacidade de mover-se nos genomas, visto que carecem de algum ou todos os domínios encontrados nos elementos autônomos (Wicker *et al*, 2007). Entretanto, elementos não-autônomos, quando na presença de elementos autônomos, são capazes de utilizar as enzimas dos elementos autônomos para transporem-se, desde que possuam regiões conservadas para tal reconhecimento.

1.1.2 Transposons de DNA: superfamília Tc1-*mariner*

Os transposons de DNA (classe II de Wicker e colaboradores (2007)) se movem através de um mecanismo de recorta-e-cola e possuem um gene de uma transposase flanqueado por duas TIRs (Wicker *et al*, 2007; Muñoz-López e García-Pérez, 2010). As transposases reconhecem as TIRs dos elementos e os excisam de um local e inserem em outro e, quando o elemento se insere em um novo sítio há duplicação do sítio alvo (TSDs – do inglês *Target Site Duplications*), que representam uma marca única de cada transposon (Muñoz-López e García-Pérez, 2010).

Os transposons de DNA são subdivididos em superfamílias de acordo com suas sequências, das TIRs e/ou TSDs. A subclasse I é composta pelas seguintes

superfamílias: *Tc1/mariner*, *PIF/Harbinger*, *hAT*, *Mutator*, *Merlin*, *Transib*, *P*, *piggyBac* e *CACTA*, entre outro (Muñoz-López e García-Pérez, 2010).

A superfamília *Tc1/mariner* é uma das famílias com maior distribuição entre rotíferos (Arkhipova e Meselson, 2005), insetos (Robertson, 1993) peixes (Goodier e Davidson, 1994), nematoides (Leroy *et al*, 2003) e humanos (Oosumi *et al*, 1995) por exemplo, e os elementos possuem 1300–2400 pb de tamanho (Plasterk *et al*, 1999). As transposases desses elementos são pouco similares quanto a sua sequência, mas tem dois domínios conservados: uma região amino-terminal contendo o motivo hélice-volta-hélice (HTH, do inglês *Helix-Turn-Helix*) que é importante para reconhecimento e ligação às TIRs; e um domínio carboxi-terminal constituído de um motivo catalítico de três aminoácidos (DDE para elementos *Tc1-like* e DDD para elementos *mariner-like*) (Muñoz-López e García-Pérez, 2010) envolvido na atividade da transposase.

A tríade de aminoácidos consiste de dois resíduos de ácido aspártico e um resíduo de ácido glutâmico (DDE) em *Tc1-like* e 3 resíduos de ácido aspártico (DDD) em *mariner-like*, ambos separados por um espaçamento de 34 aminoácidos entre o segundo e terceiro resíduo (Plasterk *et al*, 1999). Esse motivo catalítico, associado a cátions divalentes, é responsável pela clivagem e união do elemento durante o evento de transposição (Plasterk *et al*, 1999; Brilllet *et al*, 2007; Muñoz-López e García-Pérez, 2010).

O mecanismo de transposição dos elementos desta superfamília é não-replicativo ou conservativo, sendo que normalmente não é gerada uma nova cópia a cada evento de transposição. Para tal evento, duas transposases reconhecem as TIRs do elemento e se ligam a elas (Muñoz-López e García-Pérez, 2010). Ocorre a clivagem de ambas as fitas do elemento e a formação de um dímero pelas duas transposases ligadas entre si e cada uma ligada a uma extremidade do elemento (Muñoz-López e García-Pérez, 2010). O sítio alvo dos elementos *Tc1/mariner* são qualquer dinucleotídeo TA e a excisão e inserção do elemento só dependem da transposase e do cofator Mg^{2+} ou Mn^{2+} (Plasterk *et al*, 1999; Muñoz-López e García-Pérez, 2010).

Para a integração do elemento no sítio de inserção, ocorre outra quebra de fita dupla escalonada e, com o reparo da célula, a duplicação do dinucleotídeo TA (TSD, do inglês *Target Site Duplication*) (Plasterk *et al*, 1999; Muñoz-López e García-Pérez,

2010). A quebra de fita dupla gerada pela excisão do elemento também precisa ser reparada pela célula e, dependendo da via de reparo utilizada, pode ocorrer a regeneração de uma nova cópia do elemento, a deleção do sítio de excisão (Muñoz-López e García-Pérez, 2010) ou a formação de uma “pegada” (Plasterk *et al*, 1999; Muñoz-López e García-Pérez, 2010). Apesar destes elementos transporem-se pelo modo conservativo, no caso de ocorrência da regeneração de uma nova cópia do elemento têm-se uma transposição replicativa. Porém, isso só ocorrerá se houver a presença de um cromossomo homólogo ou cromátide-irmã.

Elementos *Tc1/mariner* podem ser subdivididos em 7 famílias ou grupos, dentre elas a família *mariner*, uma das famílias mais bem distribuídas na natureza, tendo representantes em muitos grupos distintos (Robertson, 1993; Muñoz-López e García-Pérez, 2010). A família *mariner* é subdividida em pelo menos cinco subfamílias, sendo elas: *mauritiana*, *cecropia*, *mellifer/capitata*, *irritans* e *elegans/briggsae* (Muñoz-López e García-Pérez, 2010).

1.1.3 *mariner* e a mutação *white-peach*

Na família *mariner* encontramos diversos elementos transponíveis, dentre eles, o elemento *mos1*. Este elemento foi inicialmente descoberto em *Drosophila mauritiana*, devido à uma mutação no gene *white* localizado no cromossomo X, que acarreta em mudança fenotípica nos olhos das drosófilas (Haymer e Marsh, 1985; Jacobson e Hartl, 1985). O gene *white* codifica uma proteína de membrana que atua no transporte de precursores dos pigmentos drosóptericos que dão cor avermelhada aos olhos das drosófilas (Sullivan e Sullivan, 1975; Sullivan *et al*, 1979; Ewart e Howells, 1998).

A inserção do elemento *mariner* na região regulatória 5' não traduzida do gene *white* (Jacobson *et al*, 1986) leva a uma redução drástica na expressão desse gene, fazendo com que ocorra um menor transporte dos precursores de drosóptericos para o citoplasma, diminuindo muito a quantidade de pigmento vermelho nos olhos. A diminuição de drosóptericos faz com que a coloração dos olhos fique mais clara, cor de “pêssego” (Figura 1B).

Inicialmente o elemento foi chamado de elemento *peach*, por causar esta mudança de coloração dos olhos, o que se chamou de mutação *white-peach* (W^{pch}). Esta mutação faz com que o olho da drosófila fique com um fenótipo intermediário entre

white e selvagem (Figura 1A), ou seja uma coloração “pêssego” (Jacobson e Hartl, 1985).

A excisão do elemento *peach* do gene *white* ao longo do desenvolvimento e antes da metamorfose gera reversão na mutação $W^{p^{ch}}$ em algumas células de formação do olho. É, então, identificado no fenótipo com a ocorrência de mosaicismos, em que os olhos possuem algumas manchas do fenótipo selvagem no fundo pêssego (Figura 1C).

O causador da reversão da mutação $W^{p^{ch}}$ foi chamado de fator Mos, de mosaico. Mais tarde descobriu-se que o fator Mos na verdade é um *mariner* autônomo, chamado então de *mos1*, que gera a transposase necessária para a excisão do *mariner peach*, que se trata de uma cópia não-autônoma (Medhora *et al*, 1988; Bryan *et al*, 1987). A presença de elementos autônomos nos genomas causa um aumento na transposição de elementos não-autônomos e, por esta razão, elementos autônomos são referidos como fatores de mutação (Medhora *et al*, 1991).

O primeiro transposon *mariner peach* descrito possui 1286 nucleotídeos de extensão, com TIRs de 28 pb flanqueando uma única ORF (do inglês, *Open Reading Frame*) que codifica uma transposase de 346 aminoácidos (Jacobson *et al*, 1986; Medhora *et al*, 1991). O *mariner mos1* possui a mesma extensão da cópia *peach*, diferindo em apenas 11 nucleotídeos distribuídos ao longo da sequência (Medhora *et al*, 1988; Medhora *et al*, 1991). Esta diferença faz com que a cópia do *mariner peach* produza uma transposase não funcional, enquanto *mos1* produz uma enzima funcional.



Figura 1. (A) *Drosophila simulans* selvagem com olho vermelho; (B) *Drosophila simulans* mutante $W^{p^{ch}}$, sem reversão da mutação; (C) *Drosophila simulans* mutante $W^{p^{ch}}$ com fenótipo mosaico.

1.2 Impacto dos elementos transponíveis nos genomas

Os TEs caracterizam-se por sua mobilidade dentro dos genomas e, ao inserirem-se em novas regiões causam modificação na sequência de DNA, podendo influenciar nos processos celulares. Por muitos autores inicialmente os TEs foram considerados “DNA lixo” ou “DNA egoísta” sem nenhum fenótipo ou função evolutiva associada (Orgel e Crick, 1980; Doolittle e Sapienza, 1980). Desde então, vários estudos apontam para TEs como um reservatório de inovação genética, incluindo criação de novos genes, modificação de elementos *cis*-regulatórios e que a regulação epigenética de certos genes é derivada do mecanismo de defesa contra a atividade de TEs ancestrais (Moutri *et al*, 2007).

Nishihara (2019) traz uma visão geral dos TEs como um componente e uma força motriz para a diversificação dos genomas animais. Nishihara (2019) apresenta em seu trabalho três impactos positivos dos TEs nos genomas hospedeiros: o primeiro, que os TEs, por serem diversos, provém características linhagem-específica para os organismos; segundo, por serem uma fração grande dos genomas, são o maior fator de contribuição de mudanças evolutivas aos genomas, tanto na composição como no tamanho; terceiro, muitos hospedeiros co-optarem sequências repetitivas como genes, sequências *cis*-regulatórias, alterando redes regulatórias de genes.

Por outro lado, os TEs podem trazer impactos negativos para os genomas, estando relacionados a disfunções celulares e doenças. Lapp e Hunter (2019) apontam para diversos estudos relacionados a desregulação da atividade de TEs e alguns distúrbios psiquiátricos como transtorno do espectro autista e esquizofrenia, bem como transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse. Além disso, a expressão alterada de TEs, como inserções de LINE1 (L1) em humanos, parece ser marca registrada e estar intimamente relacionada com diversos tipos de câncer (Burns, 2017). E, por fim, a instabilidade causada pela mobilidade dos TEs também parece estar relacionada ao envelhecimento (Orr, 2016), bem como a doenças relacionadas a idade.

1.2.1 Elementos transponíveis: tamanho e variabilidade dos genomas

Considerando a capacidade dos TEs em expandirem-se autonomamente, acredita-se que representam a principal causa do aumento dos genomas (Canapa *et al*, 2015). Esse papel pode ser visto também no genoma humano com o elemento Alu

(Bailey *et al*, 2003), por exemplo. Sugere-se que, tal como em humanos, em outros animais os TEs também tenham contribuído largamente para o tamanho e diversidade dos genomas, além de notar-se que a proporção de TEs está relacionada com o tamanho do genoma em mamíferos (Nishihara, 2019). Entretanto, não é possível notar uma correlação igual entre o tamanho do genoma e a variedade de transposons em todos os eucariotos (Canapa *et al*, 2015).

A expansão dos genomas deve ter ocorrido em momentos específicos da evolução, como a conquista da terra ou a adaptação a ambientes extremos, devido à amplificação de TEs por estressores ambientais (Oliver e Greene, 2009; Canapa *et al*, 2015; Schrader e Schmitz, 2018). Segundo Piacentini e colaboradores (2014) os TEs estão envolvidos na produção de variabilidade e isolamento reprodutivo de espécies quando expostas a estressores, além de gerar indivíduos com maior probabilidade de sobrevivência.

Por outro lado, deleções associadas a recombinações de L1 levaram perda de ~450 kb do genoma humano que ocorreram após a divergência das linhagens humanas e chimpanzés, sendo uma fonte significativa de variação genética humana, juntamente com as alterações genômicas causadas por outros elementos móveis (Han *et al*, 2008). Tanto na expansão quanto na deleção de sequências, TEs tem um importante papel na geração de variantes estruturais (SVs) entre indivíduos humanos (Xing *et al*, 2009) e na variação de tamanho e diversidade dos genomas dos organismos.

Ademais, evolutivamente, os TEs podem ter contribuído não somente para a expansão ou deleção no tamanho do genoma, mas para o seu conteúdo nucleotídico. O genoma dos peixes, por exemplo, é pobre em GC e com maior parte de transposons de DNA, também pobre em GC, enquanto mamíferos e aves possuem mais retrotransposons, que são ricos em GC, que pode ter contribuído para sua heterogeneidade do conteúdo AT/GC (Symonová e Suh, 2019).

1.2.3 Domesticação/exaptação de elementos transponíveis

A evolução de vários mecanismos celulares fundamentais em muitas espécies ocorreu originalmente através da domesticação (Schrader e Schmitz, 2018) ou exaptação (Gould e Vrba, 1982) de TEs, em que proteínas ou o próprio elemento são co-optados para uso das células hospedeiras. Um exemplo de domesticação de TEs

são os telômeros dos cromossomos de drosófilas que não são mantidos por telomerasas, mas por arranjos em *tandem* de dois retrotransposons não-LTR, *HeT-A* e *TART* (Pardue e DeBaryshe, 2003).

Algumas co-optações de TEs pelos hospedeiros se tornaram tão importantes que o seu nocaute atualmente gera graves danos aos organismos. Por exemplo, o promotor de um retrotransposon intrônico nos oócitos de camundongos é responsável por conduzir a expressão de uma isoforma de Dicer e a deleção desse TE causa esterilidade nas fêmeas (Flemr *et al*, 2013).

Além disso, alguns tecidos parecem ser mais propensos a co-optação de TEs. Ye e colaboradores (2020) observaram que uma proporção maior de *enhancers* relacionados a genes imunes é rico em TE em comparação com outros tecidos e que, durante a evolução, esses TEs devem ter sido incorporados pelos *enhancers*, quando benéficos. Essa suposta co-optação e seleção dos TEs pode ter acelerado a evolução das redes reguladoras imunológicas (Ye *et al*, 2020).

Por fim, os TEs estão envolvidos em processos como silenciamento epigenético de genes, desenvolvimento embrionário, inativação do cromossomo X, reparo do DNA, resposta ao estresse, imunidade antígeno-específica, podem duplicar, modificar ou remover subitamente regiões codificantes, alterar significativamente os padrões de expressão gênica ou reorganizar os cromossomos (Oliver e Greene, 2009). Todas essas funções, apesar de poderem afetar negativamente o bom funcionamento do hospedeiro, podem ainda ser importantes no processo evolutivo.

1.2.4 Elementos transponíveis e evolução

Embora na maioria das vezes pensemos que a mobilização de TEs pode ser negativa aos organismos, a variabilidade mutacional é vital para a evolução uma vez que fornece matéria-prima sobre a qual a seleção natural e deriva genética podem atuar para levar a evolução (Oliver e Greene, 2009; Schrader e Schmitz, 2018). TEs possuem todas as qualidades necessárias para serem facilitadores da evolução: altamente distribuídos, antigos, abundantes e móveis (Oliver e Greene, 2009) e os mesmos efeitos que podem gerar danos a indivíduos podem ser importantíssimos a longo prazo ou em momentos de estresse para as populações.

Ao mobilizarem-se, tanto transposons quanto retrotransposons podem acabar inserindo-se em genes do hospedeiro ou próximo a eles. As inserções podem fazer com que os promotores direcionem a expressão de novos transcritos e permite que um gene seja expresso em novos tipos ou contextos celulares, além de poder gerar produtos proteicos truncados ou estendidos, potencialmente permitindo que genes hospedeiros adquiram novas funções (Garcia-Perez *et al*, 2016).

A atividade dos TEs também é importante para a radiação adaptativa, pois é capaz de fornecer variação genética necessária para explorar oportunidades ecológicas quando nichos antigos são esvaziados por extinção ou quando novos nichos são criados (Oliver e Greene, 2009). Além disso, Platt II e colaboradores (2014) apontam para a aquisição de novos pi/miRNAs por atividade de TE linhagem-específica que poderiam ter fornecido a matéria-prima para gerar novas vias reguladoras. Isso estaria introduzindo novos fenótipos de expressão gênica e tendo, portanto, impactado a radiação de um clado de mamíferos altamente diversificado, a família *Vespertilionidae* (Platt II *et al*, 2014).

1.2.5 Elementos transponíveis e regulação gênica

Uma vasta fração do genoma de muitos organismos é composta por TEs e além das funções já citadas, esses elementos apresentam uma participação importante na evolução dos genomas, inclusive na regulação gênica (Bourque, 2009; Oliver e Greene, 2009; Chuong *et al*, 2016b; Schrader e Schmitz, 2018). A ideia de que TEs tem um papel importante na regulação dos genes surgiu ainda com Barbara McCintock em seus primeiros trabalhos com milho, em que ela atribuiu aos TEs a função de “elementos controladores”, por acreditar no seu controle dos genes.

TEs podem alterar a expressão gênica hospedeira funcionando como promotores e elementos *cis* e *trans*-reguladores, tanto transcricionalmente como pós-transcricionalmente (Chuong *et al*, 2016b). Além disso, dentro os elementos *cis*-reguladores, os TEs podem funcionar como intensificadores, isoladores e elementos silenciadores (Chuong *et al*, 2016b).

Como intensificadores, os TEs podem modular a expressão gênica sendo co-optados pelos hospedeiros aumentando a expressão de genes hospedeiros em tecidos específicos ou contextos de desenvolvimento (Garcia-Perez *et al*, 2016), dentre eles o

elemento SINE (Bejerano *et al*, 2006; Sasaki *et al*, 2008), MER130 (Notwell *et al*, 2015) e ERVs (Chuong *et al*, 2013). Os TEs também podem contribuir com grande variedade de transcritos de RNA reguladores não codificadores, como microRNAs (miRNAs) e RNAs não codificadores longos (lncRNAs) (Chuong *et al*, 2016b) que podem controlar a expressão gênica, inclusive o silenciamento gênico.

Já como isoladores, os TEs funcionam para separar o genoma em domínios de transcrição ativa ou inativa, variando entre 100kb a 1Mb, frequentemente impedindo a disseminação da heterocromatina, além de ter um papel importante na organização tridimensional do genoma (Chuong *et al*, 2016b). Além de desenvolverem um certo controle sob as regiões heterocromáticas, os TEs também fornecem uma fonte de ligação para fatores arquitetonômicos, contribuindo para a organização genômica e podendo assim, interferir no controle de grandes regiões cromossômicas (Chuong *et al*, 2016b).

Os TEs, além das funções já citadas, podem ainda causar a formação de retrogenes. Esses retrogenes podem surgir quando mRNAs transcritos e poliadenilados são aleatoriamente reconhecidos pela maquinaria de transposição dos L1, por exemplo, levando à transcrição reversa e à reintegração de uma cópia sem íntron do gene original em um local selecionado aleatoriamente (Schrader e Schmitz, 2018). Como estão separadas dos seus elementos regulatórios, essas cópias são inicialmente sem funções, mas seu futuro depende de como as mutações, a seleção e a deriva genética subsequentes alteram a estrutura e a regulação da retrocópia podendo gerar novas características (Schrader e Schmitz, 2018).

Conforme Chuong e colaboradores (2016a), ERVs são capazes de atuar como intensificadores tecido-específico no sistema imunológico inato mediando a resposta de genes ativados por interferons. Além disso, a expressão desregulada de TEs pode impactar negativamente o desenvolvimento em camundongos, afetando meiose, oogênese e ativação inapropriada de respostas imunes inatas (Garcia-Perez *et al*, 2016).

Aditivamente, Lunyak e colaboradores (2007) mostram que a transcrição de um retrotransposon é necessária para a ativação gênica de um hormônio de crescimento. Além disso, TEs podem contribuir para a formação de novas redes regulatórias de

genes (Chuong *et al*, 2016b), como MER20 e a rede regulatória de genes dedicada à gravidez em mamíferos placentários (Lynch *et al*, 2011).

Os TEs também podem funcionar como variantes regulatórias patogênicas aos hospedeiros. As duas principais formas de impactar o genoma são através de mutagênese de inserção e rearranjos cromossômicos, tendo implicações em diversas doenças (Chuong *et al*, 2016b). TEs silenciados no genoma também são comumente ativados por estresse ou outros fatores como a senescência, e podem levar a consequências patogênicas, além de consequências adicionais a estabilidade genômica, como quebras de fita dupla de DNA (Chuong *et al*, 2016b).

Há interação entre TE e expressão gênica é descrita para diversas combinações diferentes de genes e TEs. De tal forma, Rebollo e colaboradores (2012) descreveram um catálogo de genes afetados por TEs (C-GATE, disponível em <https://ritarebollo.wixsite.com/cgate>), afim de que categorizar e possibilitar o estudo do impacto dos TEs na expressão gênica dos hospedeiros.

1.3 Envelhecimento: causas e consequências

O envelhecimento é caracterizado por uma perda progressiva da integridade fisiológica, causando comprometimento de função e aumento da vulnerabilidade à morte (López-Otín *et al*, 2013). A causa geral do envelhecimento é amplamente considerada como o acúmulo de dano celular ao longo do tempo (Kirkwood, 2008; López-Otín *et al*, 2013).

Apesar das causas serem muito semelhantes e os fenótipos em cada espécie também, as diferentes espécies podem viver tempos distintos. López-Otín e colaboradores (2013) descrevem 9 características candidatas que se considera contribuir para o processo de envelhecimento, que são: desgaste dos telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, detecção desregulada de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco, comunicação intercelular alterada e instabilidade genômica.

Vários trabalhos sugerem um acúmulo de mutações ao longo do processo de envelhecimento e quando o reparo não ocorre esses danos devem levar a célula ao estado senescente e ao fenótipo característico do envelhecimento (Niedernhofer *et al*,

2018). Portanto, nota-se uma relação entre genes envolvidos em manter a estabilidade do genoma e longevidade dos organismos (Niedernhofer *et al*, 2018).

Dessa forma, o dano ao DNA tem a capacidade de promover o envelhecimento, desencadeando senescência celular, morte celular e outras alterações metabólicas que causam mais danos e perda de homeostase (Niedernhofer *et al*, 2018). Neste trabalho abordaremos os instabilidade genômica causada por TEs envolvidos no processo de envelhecimento.

1.4 Transposição, instabilidade genômica e envelhecimento

1.4.1 Instabilidade genômica e envelhecimento

A instabilidade genômica é a tendência natural dos genomas a sofrer alterações em condições fisiológicas (Vijg e Suh, 2013). É comumente associada ao envelhecimento e a doenças relacionadas a idade por gerar danos ao DNA e à célula. Dentre os fatores que geram instabilidade genômica temos: erros na replicação do DNA, espécies reativas de oxigênio, mutações pontuais, translocações, ganhos e perdas cromossômicas, interrupção de genes causados pela integração de vírus ou transposons (López-Otín *et al*, 2013).

Uma questão interessante abordada por Vijg e Suh (2013) diz respeito as mutações não serem eliminadas, visto que são grandes vilãs da estabilidade genética. Tendo em vista as alterações ambientais, se o genoma não fosse igualmente diverso, os organismos não se adaptariam a novos ambientes. Por outro lado, considerando que linhagem somática e germinativa são separadas na maior parte dos organismos, a taxa de mutações poderia evoluir para zero, visto que um acúmulo de mutações está envolvido no envelhecimento e diversas doenças (Vijg e Suh, 2013).

Segundo Vijg e Suh (2013) o envelhecimento não é controlado por um sistema como o desenvolvimento e não se esperaria que a integridade do 'soma' fosse mantido por muito tempo além da era da primeira reprodução. Isso corrobora com a hipótese de que o há um aumento na atividade de elementos transponíveis nas células somáticas durante o envelhecimento e deve influenciar na instabilidade genômica, envelhecimento e doenças relacionadas a idade.

Como as variações nos genomas devem continuar existindo para garantir a existência de vida na Terra (Vijg e Suh, 2013), muitos sistemas de reparo a danos e manutenção do genoma existem (Vijg e Suh, 2013; Niedernhofer *et al*, 2018). A falha de qualquer um dos sistemas de reparo do genoma acarreta em problemas a saúde, logo isso revela a importância da estabilidade genômica (Niedernhofer *et al*, 2018) e o papel que os sistemas de manutenção do genoma devem desempenhar na longevidade (Vijg e Suh, 2013).

A maioria dos distúrbios da instabilidade do genoma é caracterizada pelo envelhecimento acelerado, bem como por doenças de envelhecimento acelerado, apresentando hipersensibilidade às genotoxinas e defeitos na manutenção do genoma (Niedernhofer *et al*, 2018). Dentre as diversas doenças progeroides e relacionadas a falha na manutenção do genoma e fenótipo de envelhecimento temos: Síndrome de Cockayne, Xeroderma Pigmentoso, Síndrome de Werner, Síndrome progeroide XFE e Progeria Hutchinson–Gilford (Vijg e Suh, 2013; Niedernhofer *et al*, 2018).

Além disso, existem muitos distúrbios adicionais relacionados a instabilidade do genoma que apresentam sintomas progeróides de múltiplos órgãos como ataxia-telangiectasia e anemia de Fanconi (Vijg e Suh, 2013; Niedernhofer *et al*, 2018). Todas essas doenças cujos danos ao DNA trazem um envelhecimento acelerado e doenças associadas a ele como principais características salientam a relação entre instabilidade genômica e envelhecimento.

Outro exemplo da relação entre dano ao DNA e o envelhecimento pode ser percebido em pessoas que passaram por tratamento oncológico. Os agentes genotóxicos usados nas quimios e radioterapias são capazes de causar inúmeros danos ao DNA de células saudáveis, além de destruir células cancerígenas, e isso causa um envelhecimento mais acelerado em relação a indivíduos não expostos as genotoxinas (Niedernhofer *et al*, 2018).

A relação entre instabilidade genômica e envelhecimento é clara, mas a causa de instabilidade genômica reúne diversos fatores. Podemos adicionar a transposição como um dos fatores mais importantes de instabilidade genômica relacionada ao envelhecimento (Sturm *et al*, 2015), visto que a transposição pode causar quebras de

fita dupla, interrupção ou alterações na expressão gênica, bem como outros impactos citados abaixo.

1.4.2 Transposição somática e germinativa

A transposição em células germinativas é imprescindível, visto que o sucesso evolutivo dos TEs depende de sua transmissão vertical. Apesar da transposição em gônadas ser necessária para transmissão de TEs para as próximas gerações, a mobilização em células germinativas é altamente controlada devido aos seus efeitos negativos (Dechaud *et al*, 2019). A atividade dos TEs em gônadas resulta em um *trade-off*, em que sua própria sobrevivência depende da sobrevivência do hospedeiro, que é necessário para transmissão vertical e manutenção (Dechaud *et al*, 2019).

A linhagem germinativa, as células cancerígenas e certos Cnidários são considerados imortais, pois apesar dos danos celulares sofridos, não apresentam sinais de envelhecimento (Sturm *et al*, 2015). Estes sistemas apresentam em comum a via Piwi-piRNA de silenciamento de TEs, sendo essa também principal diferença entre a linhagem germinativa e a linhagem somática (Sturm *et al*, 2015). Na linhagem germinativa os TEs são amplamente silenciados pela via Piwi-piRNA, enquanto nas células somáticas os TEs tornam-se progressivamente ativos ao longo da vida (Sturm *et al*, 2015).

Por muitos anos deu-se maior importância a transposição na linhagem germinativa visto que afeta amplamente as novas gerações, enquanto a transposição somática (TS) não é herdável e pode afetar a aptidão do organismo (Haig, 2016). Por outro lado, recentemente estudos trazem a atividade de TEs em tecidos somáticos, podendo ter consequências adaptativas, neutras ou prejudiciais ao hospedeiro (Haig, 2016; Loreto e Pereira, 2017).

Os principais estudos recentes que trazem TS como um evento comum, apontam para tecidos específicos no organismo. Dentre eles, podemos encontrar expressão alterada de TEs em câncer (Burns, 2017; Anwar *et al*, 2017); associados a fenótipos como na mutação W^{pch} em drosófila (Jacobson e Hartl, 1985; Jacobson *et al*, 1986); o melanismo industrial na mariposa inglesa (Hof *et al*, 2016); e ao cérebro, tendo impactos positivos (Bachiller *et al*, 2017) ou negativos (Li *et al*, 2013).

Acreditava-se que, além de não herdável, a atividade de TEs nos tecidos somáticos não apresentavam benefícios ou consequências imediatamente aparentes para o TE, apenas o potencial de afetar a regulação dos genes do hospedeiro na linhagem somática (Chuong *et al*, 2016). Entretanto, Barckmann e colaboradores (2018) encontraram ERVs que foram transcricionalmente ativados nos tecidos somáticos ovarianos (com sistema Piwi-RNA depletado) estavam presentes como cDNA circulares na linhagem germinativa, indicando que as linhagens não são tão isoladas como se pensava.

Por fim, segundo Loreto e Pereira (2017) as consequências da transposição somática para o organismo podem ser: adaptativas, neutras ou prejudiciais. Como adaptativas, a plasticidade fenotípica e variabilidade genética em organismos assexuais e aqueles que não possuem segregação de células germinativas e somáticas. Como neutras, quando a inserção não causa consequências funcionais, gerando apenas um mosaicismo. E, por fim, como prejudiciais ao organismo, a transposição somática pode causar diversas doenças, inclusive câncer, doenças neurodegenerativas e envelhecimento.

1.4.3 Elementos transponíveis: consequências de inserções somáticas e germinativas

Um passo em comum para a mobilização de todos os TEs é a inserção. A inserção é a entrada do elemento em um novo sítio e esse processo pode causar diferentes impactos para os hospedeiros. Além disso, o impacto e a facilidade de mobilização, principalmente o passo de inserção, também dependem do tecido, dos genes vizinhos, do tipo celular e do estado da cromatina.

Assim sendo, observou-se uma variação nos locais em que os TEs são comumente encontrados. São normalmente enriquecidos dentro e perto de genes em rápida evolução, com papéis que exigem flexibilidade, como respostas a estímulos externos, imunidade, sinalização celular, transporte e metabolismo (Oliver e Greene, 2009). Enquanto isso, os TEs são pobremente encontrados em genes altamente conservados, como genes HOX em vertebrados (Oliver e Greene, 2009).

Entretanto, enquanto alguns TEs desenvolveram mecanismos moleculares sofisticados para atingir 'refúgios' genômicos, como regiões pobres em genes ou heterocromáticas, outros favorecem a integração em áreas eucromáticas (Chuong *et al*,

2016b). Isso porque as regiões eucromáticas são transcricionalmente ativas e isso aumenta sua capacidade de propagação no hospedeiro (Chuong *et al*, 2016b).

Os TEs recém-inseridos (ou excisados) podem afetar os genes alterando o ambiente regulador ou de codificação em um determinado local (Chuong *et al*, 2016b; Schrader e Schmitz, 2018). Estes imitam essencialmente os elementos *cis*-reguladores do hospedeiro, logo, uma inserção de TE que se aproxima da vizinhança de um gene hospedeiro, no promotor ou nas regiões intrônicas reguladoras tem um forte potencial de interferir na expressão dos genes hospedeiros (Chuong *et al*, 2016b; Schrader e Schmitz, 2018). Portanto, a inserção de elementos em uma nova região genômica pode ativar ou silenciar genes próximos.

Podemos notar também inserções de TEs relacionadas a alteração de fenótipos como no caso da drosófila com fenótipo W^{pch} (Jacobson e Hartl, 1985; Jacobson *et al*, 1986) já mencionada e o caso do melanismo industrial da mariposa inglesa sujeita a seleção artificial pela revolução industrial (Hof *et al*, 2016). No primeiro caso a inserção de um TE na região regulatória do gene *white* reduz a expressão do gene e, portanto, a produção de pigmento. No segundo caso, a inserção de um TE no primeiro íntron do gene *Cortex* aumenta a expressão do gene, aumentando a produção do pigmento.

Além disso, a transposição pode ter impactos diferentes em um mesmo tipo celular, em um mesmo tecido, mas em momentos diferentes da vida do organismo. Bachiller e colaboradores (2017) sugerem uma dependência entre retrotransposição de L1 e ativação neural fisiológica durante a formação da memória no hipocampo. Por outro lado, Li e colaboradores (2013) encontraram que TEs são ativos no cérebro de drosófila durante o envelhecimento normal e que o aumento nessa atividade pode estar envolvido em declínio da função neuronal.

Em uma revisão recente Hancks e Kazazian (2016) relatam mais de 100 doenças relacionadas a inserções de TEs em humanos. Logo, apesar de uma variabilidade genética a nível de grupo ou espécie, os TEs, normalmente, estão associados a impactos negativos. Aqui falaremos sobre o impacto dos TEs no processo de envelhecimento.

1.4.4 Transposição somática e envelhecimento

As mutações acumulam ao longo do envelhecimento e isso faz com que os tecidos somáticos sejam mosaicos de genótipo e dependendo da carga de mutação tem-se a probabilidade de declínio funcional (Vijg e Suh, 2013). Por exemplo, mutações somáticas que uma vez amplificadas por expansão clonal podem representar uma causa importante de doença relacionada à idade (Vijg e Suh, 2013).

Apesar da mobilização somática ser importante no desenvolvimento no cérebro, Li e colaboradores (2013) descobriram que a ativação de elementos transponíveis com a idade ou doença pode contribuir para o declínio neuronal. Wood e colaboradores (2016) mostraram que alterações na heterocromatina tornando capazes de manter o silenciamento dos TEs, logo a integridade do genoma, conseguem aumentar o tempo de vida em drosófila.

As alterações epigenéticas envolvem alterações nos padrões de metilação do DNA, modificação pós-tradução das histonas e remodelação da cromatina e algumas marcas características estão associadas ao envelhecimento, como por exemplo a metilação de histonas em invertebrados (López-Otín *et al*, 2013). Além disso, vários estudos apontam que o envelhecimento é acompanhado por alterações epigenéticas e que essas perturbações podem provocar síndromes progeroides em organismos modelo (López-Otín *et al*, 2013).

Além disso, as alterações epigenéticas estão amplamente associadas a ativação de TEs, visto que interferem no estado de condensação da cromatina. Alguns estudos sugerem o envolvimento da estrutura da cromatina, especialmente da heterocromatina, com o envelhecimento (Wood e Helfand, 2013; Sedivy *et al*, 2013; Sturm *et al*, 2015; Cardelli, 2018). Um dos fatores é que muitos TEs se encontram silenciados na região de heterocromatina e, com a idade e conseqüente remodelação da cromatina, ocorre uma maior permissividade de transcrição e conseqüente transposição (Wood e Helfand, 2013; Sedivy *et al*, 2013 Cardelli, 2018). Além das modificações na heterocromatina, declínio relacionado a idade nos RNA interferentes (RNAi), responsáveis pelo silenciamento dos TEs, também leva a um aumento da expressão dos TEs.

Li e colaboradores (2013) descrevem um aumento da expressão de TEs no envelhecimento normal do cérebro. Esse resultado é corroborado por uma nova

metodologia desenvolvida por Chang e colaboradores (2019). Além do cérebro, a expressão de TEs associada a idade é relatada em outros tecidos somáticos, como no corpo gorduroso em drosófila (Chen *et al*, 2016) (Wood *et al*, 2016); em células tronco intestinais (Sousa-Victor *et al*, 2017); em fígado e músculo esquelético (DeCecco *et al*, 2013). E, também, em doenças relacionadas a idade, como em câncer (Burns, 2017) e doença de Alzheimer (Guo *et al*, 2018).

Além da expressão, DeCecco e colaboradores (2013) encontram um maior número de cópias relativa de L1 e MusD em ratos senescentes com 36 meses de idade, tanto no fígado como no músculo esquelético. Ademais, os autores sugerem uma ativação na retrotransposição durante o envelhecimento normal e que a retrotransposição somática é um processo de envelhecimento potencialmente importante que pode afetar muitos tecidos (DeCecco *et al*, 2013)

Por fim, muitos autores sugerem que a instabilidade genômica causada principalmente por TEs é uma causa importante do envelhecimento (Sedivy *et al*, 2013; Sturm *et al*, 2015 e 2017). Isto, visto que uma diferença significativa entre a linhagem somática e a linhagem germinativa, considerada com fenótipo não envelhecido e integridade genômica, é que o soma não possui um silenciamento de TEs por Piwi-RNA, como encontrado na linhagem germinativa.

1.5 Controle de elementos transponíveis

TEs são encontrados em praticamente todos os seres vivos, com exceção de alguns poucos como o fungo ascomiceto *Neurospora crassa* que não apresenta TEs intactos, isso por meio de um novo mecanismo de mutação pontual induzida por repetição (Oliver e Greene, 2009). Esse mecanismo faz com que a facilitação da evolução causada por TE seja quase nula e este mecanismo poderia levar a eventual extinção. Portanto, a maioria dos organismos não desenvolveu um mecanismo de exclusão completa dos TEs, mas de controle.

Uma das formas de controle encontradas é a inibição por superprodução. Acontece quando a produção da própria transposase excede uma concentração limiar e acaba por atuar como inibidora da mobilização do elemento, como por exemplo em elementos da família *Tc1/mariner* (Muñoz-López e García-Pérez, 2010). Entretanto, os

mecanismos mais conhecidos e efetivos no silenciamento de TEs tratam-se de alterações epigenéticas e RNAi, conhecidos por mecanismos pré e pós-transcricional.

1.5.1 Controle pré e pós-transcricional

O controle conhecido como pré-transcricional de TEs ocorre através de metilação de DNA (Levin e Moran, 2011), modificações de histonas e alterações no empacotamento e condensação da cromatina (Slotkin e Martienssen, 2007). A metilação de citosinas está associada ao silenciamento da transcrição gênica impedindo o acesso da maquinaria de transcrição ao DNA e, dessa forma, impedindo também a transcrição de TEs. Ademais, as modificações na cauda N-terminal de histonas, como metilação, e alteração no empacotamento da cromatina são capazes de alterar a ligação de fatores de transcrição (Slotkin e Martienssen, 2007) e, portanto, a transcrição de TEs.

Já o silenciamento de TEs através de RNA interferentes (RNAi) é conhecido como controle pós-transcricional. O termo RNAi abrange diversos tipos de RNAs pequenos com cerca de 20-30 nucleotídeos que são gerados a partir de precursores de fita dupla, pela enzima ribonuclease Dicer (Malone e Hannon, 2009). Os RNAi atuam associados a proteínas Argonautas (Ago), formando um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Malone e Hannon, 2009).

As proteínas Ago apresentam dois domínios, PAZ e PIWI, que se dobram para formar um canal no qual um pequeno RNA guia de fita simples é mantido (Malone e Hannon, 2009). O silenciamento de TEs ocorre visto que o domínio PIWI tem atividade de nuclease e é capaz de clivar transcritos de RNA conforme direcionado pelo pequeno RNA (Malone e Hannon, 2009).

De maneira geral, os RNAi são divididos em três classes de pequenos RNAs sendo eles: os MicroRNAs (miRNAs) que são associados a proteínas Ago1 e estão relacionados a regulação de genes endógenos; siRNAs (do inglês, *small interfering RNA*), que são associados a proteínas Ago2 e atuam no silenciamento de TEs em células somáticas; e, piRNAs (do inglês, *Piwi-interacting RNA*) que são associados a proteínas do grupo Piwi e fazem silenciamento de TEs em células germinativas (Czech e Hannon, 2011).

Ambos os sistemas, pré e pós-transcricional, são importantíssimos para manter a integridade do genoma ao longo do tempo. Alterações na estrutura da cromatina (Wood e Helfand, 2013) ou no sistema de RNAi (Li *et al*, 2013) são capazes de aumentar a mobilização de elementos transponíveis e estarem ligados ou acelerarem o processo de envelhecimento e, conseqüentemente, as doenças relacionadas a idade.

1.6 Drogas inibidoras de transposição

Além do controle desenvolvido pelas células para minimizar a transposição e seus efeitos, algumas drogas são capazes de afetar a transposição, tanto ativando como silenciando os TEs. No trabalho de Stoffel e colaboradores (2020), a droga ciclofosfamida, utilizada para tratamento do câncer, foi capaz de alterar a expressão de TEs como *Gypsy* e *Copia* em *Drosophila melanogaster*. Tanto a exposição aguda, quanto a exposição crônica da mesma droga, foi capaz de aumentar ou diminuir a expressão dos TEs (Stoffel *et al*, 2020).

As drogas mais conhecidas por silenciar TEs são relacionadas a inibição das enzimas transcriptase reversa (RT), dos tratamentos antirretrovirais. Esse silenciamento ocorre em retrotransposons devido a presença de RT semelhante à de retrovírus e crucial para a transposição desses elementos. Wood e colaboradores (2016) utilizaram o fármaco Lamivudina (3TC) para bloquear a transposição de TEs. Utilizando um sistema repórter com *Gypsy*, observaram que moscas tratadas com 3TC apresentaram um atraso na transposição relacionada a idade e um aumento na expectativa de vida das moscas mutantes (com alta atividade de TEs, devido ao silenciamento por RNAi defectivo) (Wood *et al*, 2016).

Um ensaio semelhante foi conduzido por Sun e colaboradores (2018). Os autores utilizaram um sistema repórter semelhante e a mesma droga 3TC para silenciamento de TEs, mas relacionado a tautopatia. A proteína Tau, em drosófila, promove um relaxamento da cromatina (Frost *et al*, 2014) e, segundo Guo e colaboradores (2018), parece ser suficiente para a ativação da expressão de TEs no cérebro de drosófila. Sun e colaboradores (2018) encontraram que 3TC não apenas reduz a ativação do repórter, como reduziu significativamente a morte neuronal e os déficits locomotores, ambos induzidos por Tau.

Por outro lado, TEs de DNA que não utilizam RT para a sua transposição não podem ser silenciados com estas drogas. Em nossos trabalhos anteriores, observamos a inibição de transposição de *mariner* com duas drogas inibidoras de integrase (IN), também utilizadas no tratamento antirretroviral. A transposase utilizada por *mariner* para se transpor, possui um domínio catalítico conservado (DDD/DDE) semelhante ao encontrado na integrase do HIV, vírus causador da AIDs.

Assim como na integrase, Raltegravir e Dolutegravir (DTG) – drogas do coquetel antiaids –, foram capazes de diminuir a taxa de transposição de *mariner-mos1* em *Drosophila simulans*. Moscas mantidas em meios contendo 210 μ M a 4 mM de Raltegravir levaram a uma taxa 23–33% menor de mobilização somática, enquanto 1 ou 2 mM de DTG, 28–32% menor, ambas em relação a mosaicismos fenotípicos, ou seja, spots de olho (Cancian e Loreto, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a taxa de transposição - excisão e inserção – do elemento transponível *mariner* em *Drosophila simulans* jovens e senescentes submetidas a tratamentos com temperaturas de 20 e 28°C.

2.2 Objetivos específicos

Verificar se há uma correlação entre o processo de envelhecimento e excisão de *mariner*.

Verificar se há uma correlação entre o processo de envelhecimento e inserção de *mariner*.

Verificar se elementos *mariner* excisados são inseridos em novos sítios de inserção ou são perdidos no processo de transposição.

Verificar se a droga Dolutegravir, inibidora da transposase de *mariner*, altera a longevidade das drosófilas.

Desenvolver um *pipeline* para análise do sequenciamento de inserção (TIS-seq – do inglês, *Transposon Insertion Site sequencing*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição da linhagem

O experimento foi desenvolvido com a linhagem *Drosophila simulans white-peach* (W^{pch}), denominada linhagem *teste*. Esta linhagem foi desenvolvida no laboratório, através do cruzamento de uma fêmea de *D. simulans* W^{pch} (sem *mariner* ativo) com machos de uma linhagem selvagem coletada em Brasília, Brasil (que possui *mariner* ativo). Após a F3, foi estabelecida uma isolinhagem que possui uma taxa basal de elementos *mariner* ativos (JARDIM *et al*, 2015). O número de cópias do elemento *mariner* na isolinhagem teste foi determinada por RT-qPCR em 1,84 ($\pm 0,83$).

3.2 Tratamentos com temperatura

O estresse por temperatura é capaz de causar um aumento na expressão da transposase do elemento *mariner*-Mos1, sendo co-ativado com genes HSP70 (Jardim *et al*, 2015). Isso se dá devido a conservação das sequências *cis* dos genes HSP chamadas de elementos de choque térmico (HSE, do inglês *heat shock elements*). Essa ativação é capaz de causar excisão do elemento *peach* do gene *white*, promovendo reversão da mutação W^{pch} . Nas células em que essa reversão ocorre, o gene *white* selvagem volta a expressar o pigmento vermelho e pode ser observada pelos *spots* de olho nas drosófilas adultas.

Neste experimento, utilizamos a linhagem *teste* a 20°C, em que o número de excisões é baixo, como controle para determinar a localização dos elementos antes da transposição e utilizamos o estresse por temperatura - a 28°C - para causar excisão do elemento. Posteriormente, analisou-se se existe correspondência entre o número de excisões e inserções do elemento *mariner*-Mos1, ou seja, se os elementos que sofreram excisão devido ao estresse por temperatura foram capazes de realizar inserção em um novo sítio.

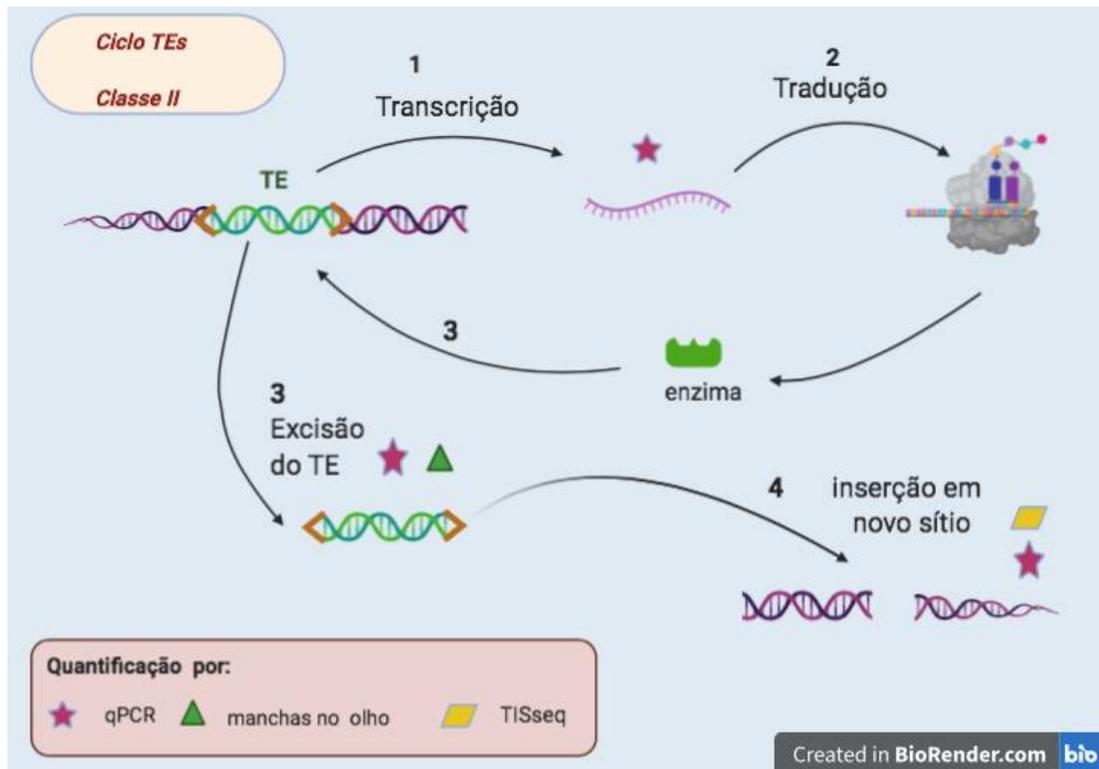


Figura 2. Ciclo dos elementos transponíveis de classe II. Dentro do ciclo são mostrados os diversos passos necessários para mobilização, sinalizados com números de 1 a 4. (1) transcrição da transposase do elemento; (2) tradução da transposase do elemento; (3) atividade da enzima do elemento e passo de excisão do elemento; (4) inserção do elemento em um novo sítio. Também estão sinalizadas as diversas formas de medir a atividade do elemento, sendo representadas com símbolos. A estrela em rosa sinaliza a quantificação por qPCR, em expressão, excisão e inserção; O triângulo em verde sinaliza a quantificação fenotípica por manchas nos olhos das drosófilas; O paralelepípedo em amarelo sinaliza a quantificação de inserção pela metodologia TISseq (sequenciamento de sítio de inserção de transposon).

3.3 Extração de DNA

Para as extrações de DNA foram utilizadas drosófilas fêmeas adultas mantidas a 20 e 28°C. Foram extraídas replicatas biológicas com 25-30 moscas cada, contendo de 1 a 4 dias da eclosão da pupa para moscas jovens e 26 a 30 dias para moscas senescentes. Para extração foi utilizado o kit purificação de DNA genômico de sangue (Ludwig Biotecnologia LTDA). A extração de DNA foi utilizada tanto para medir o mosaïcismo do gene *white* (Fig 2), como para o experimento TISseq (Fig 2).

3.4 Análise de excisão somática de *mariner* por qPCR

As extrações de DNA das drosófilas de diferentes idades e diferentes temperaturas foram usadas para medir a taxa de excisão do elemento *mariner* do gene *white*. A taxa de excisão foi medida por qPCR, usando a linhagem selvagem *D. simulans* coletada em Brasília como referência, visto que 100% das células apresentam fenótipo selvagem (Pereira *et al*, 2018). A excisão foi quantificada comparando as moscas jovens e senescentes com fenótipo W^{pch} quanto a reversão ao fenótipo selvagem (Figura 3).

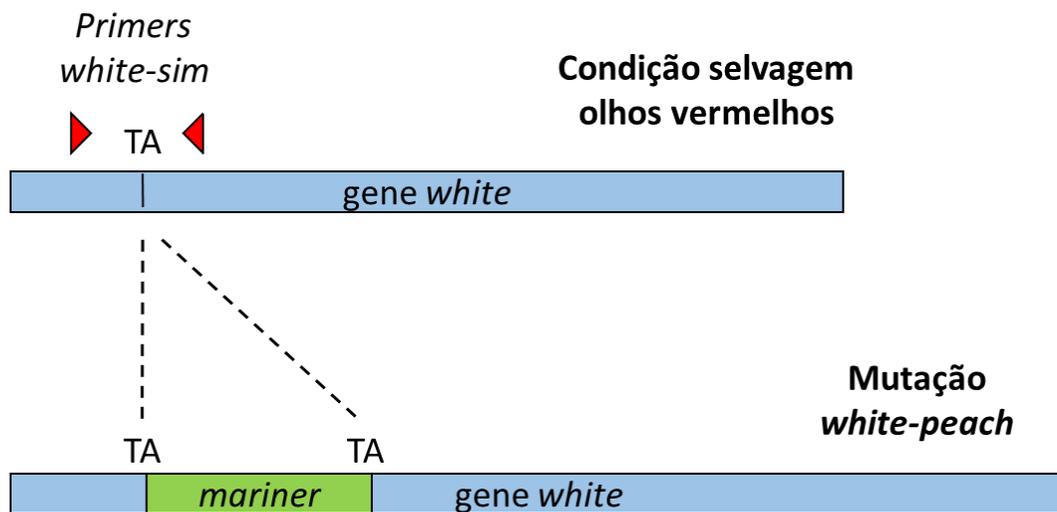


Figura 3. Amplificação primers *white-sim*. O par de primers *white-sim* anela-se na região de inserção de *mariner* no gene White de modo que a amplificação só ocorre quando há excisão de *mariner*. Figura: Camila de Moura Pereira.

Os primers utilizados para a amplificação foram *white-sim*, que amplificam o gene *white* na condição selvagem, ou seja, sem *mariner* inserido. As sequências dos primers *white-sim* são F: 5'-CCAATCACCCAATCACTCAA-3' e R: 5'-TCGTGACGAAGCTCCAAGC-3', amplificando um fragmento de 107 pb (Pereira *et al*, 2018).

O mix utilizado na reação de qPCR seguiu as seguintes concentrações: 0,2uM de cada primer, 0,1mM de cada dNTPs, Tampão de PCR 1X, 3mM de MgCl₂, SYBR green 1X, Platinum Taq DNA polimerase 0,5U e H₂O para completar o volume. Para cada reação foram pipetados 10uL do mix e 30ng de amostra, para um volume final de 20uL. Foram feitas triplicadas técnicas para cada reação.

O equipamento de PCR em Tempo Real utilizado foi *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA). As condições do RT-qPCR foram 95°C por 7

minutos (*Polymerase Activation*), seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C (*PCR Cycling*), seguidos por 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 30 segundos a 95°C (*Melt Curve*).

Nos qPCR com esse par de *primers*, utilizou-se as amostras da linhagem de *D. simulans* que possui o gene *white* 100% na condição selvagem, sem *mariner*, como controle positivo para a amplificação (figura 3). Logo, a curva de amplificação dessas amostras serviu como referência para estimar a porcentagem de reversão do gene *white* à condição selvagem nos tratamentos em drosófilas jovens e senescentes a 20 e 28°C.

O gene ribossomal endógeno (RPL) foi utilizado como referência. Os *primers* utilizados foram RPL 17q2-1 F 5'-CCCTCCTTTTCGTTTTCGTT-3' e RPL 17q2-2 R 5'-GTGTTGTCGGCACAGTTCAT-3' que amplificam um fragmento de 345 pb. O cálculo em relação ao gene de referência (RPL) foi realizado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001) usando os valores de C_t obtidos com o software *StepOne* v2.0.

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 6*. Os tratamentos a 20 e 28°C foram comparados, devido a parametricidade dos dados, utilizando ANOVA-1-via. Os tratamentos jovem e senescente a 20°C foram comparados entre si utilizando Teste t, visto que também foram paramétricos, bem como os tratamentos jovem e senescente a 28°C.

3.5 Sequenciamento de regiões *upstream* e *downstream* a *mariner*

A preparação dos fragmentos para sequenciamento foi realizada com o protocolo de Steranka e colaboradores (2019) adaptado. Para a preparação, foi realizada extração de DNA total; clivagem do DNA por duas enzimas de restrição (EcoRI e HindIII) formando extremidades coesivas; anelamento dos adaptadores e ligação aos fragmentos de DNA; amplificação de fragmentos *up* e *downstream* ao elemento *mariner*; e, por fim, sequenciamento MiSeq Illumina. O kit utilizado para sequenciamento foi o MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) MS-102-2003. A análise dos dados foi realizada através de um *pipeline* desenvolvido especificamente para a análise.

3.5.1 Clivagem com enzimas de restrição

Após realizar a extração, o DNA total foi clivado por duas enzimas de restrição: HindIII e EcoRI, que possuem os sítios de restrição 5' AAGCTT 3' e 5' GAATTC 3', respectivamente. Foram utilizados 1ug de DNA, 5U de EcoRI, 5U de HindIII, RE 1x buffer E, 2ug de Acetylated BSA, e água milliq tratada com DEPC para completar o volume final de 15uL. As amostras ficaram por 4 horas a 37°C e as enzimas foram inativadas a 65°C por 15 minutos.

Ambas as enzimas clivam os fragmentos formando uma ponta coesiva no DNA e desta forma se torna possível a ligação de adaptadores. Além disso, elas não clivam *mariner*, mas é provável que clivem regiões próximas a ele. Desta forma, conseguimos fragmentos de DNA que possuem *mariner* em sua sequência, sendo estes nossos fragmentos de interesse.

3.5.2 Anelamento e fosforilação dos adaptadores

Foram sintetizados três oligonucleotídeos para construção dos dois adaptadores coesivos. A sequência parcial dos adaptadores para sequenciamento de nova geração (NGS) na plataforma Illumina foi disponibilizada pela Neoprospecta e foram adicionadas as sequências coesivas das enzimas de restrição. Como utilizamos duas enzimas de restrição, possuímos duas pontas coesivas com sequências diferentes, uma para HindIII e outra para EcoRI.

Tanto para a extremidade *upstream* quanto *downstream* ao *mariner* temos os seguintes adaptadores: eco_coesivo 5' AATTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTG 3' para EcoRI e hind_coesivo 5' AGCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTG 3' para HindIII. Os dois adaptadores possuem a mesma sequência, alterando apenas os quatro primeiros nucleotídeos correspondentes a sequência das enzimas de restrição. Como complementar a ambas as fitas, foi confeccionado o adaptador compl_adapt 5' CACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3'.

Os oligonucleotídeos foram anelados para confecção de adaptadores dupla fita com ponta coesiva ao DNA clivado. Para tanto, foram colocados 100pmol de oligonucleotídeo eco_coesivo, 100pmol de compl_adapt, 1x PCR buffer e água milliq

tratada com DEPC para completar 20uL. O mesmo foi realizado para o oligo *hind_coesivo*. Os dois tubos foram colocados a 65°C por 5 minutos e foram deixados esfriar até a temperatura ambiente, gradativamente. Desta forma, favorecendo o anelamento dos oligonucleotídeos com complementaridade de sequência.

Por conseguinte, os adaptadores já anelados foram fosforilados pela enzima T4 Polynucleotide Kinase para favorecer a ligação ao DNA. Foram adicionados 1x Reaction Buffer Kinase, 7- 15U de T4 Polynucleotide Kinase, 1mM de ATP 10mM e completado com água para volume final de 40uL. As amostras foram mantidas a 37°C por 30 minutos. A enzima foi inativada a 68°C por 10 minutos.

3.5.3 Ligação dos adaptadores ao DNA clivado

A ligação dos adaptadores anelados e fosforilados ao DNA clivado foi realizado através de uma enzima T4 DNA Ligase (figura 4A). Aos 1ug de DNA clivado foram



Figura 4. Adaptadores anelados e fosforilados já ligados aos fragmentos de DNA clivados. (A) encontra-se todas as possibilidades de clivagem e anelamento de adaptadores (ecoRI+hindIII; ecoRI+ecoRI; hindIII+hindIII; hindIII+ecoRI). (B) Dois possíveis fragmentos amplificados, com e sem *mariner* em sua extensão.

adicionados 2,5uM de cada adaptadores *eco* e *hind* coesivo. Para anelamento da ponta coesiva de DNA e adaptadores, as amostras foram colocadas a 65°C por 5 minutos e depois resfriaram gradativamente até a temperatura ambiente (aproximadamente 0,5°C/min).

Após anelamento de adaptadores e DNA clivado, as amostras permaneceram a 4°C por 1 hora e após foram adicionados 1x Ligase Reaction Buffer, 4U T4 DNA Ligase e 1mM de ATP. As amostras permaneceram overnight a 4°C para ligação da cadeia fosfodiéster. A reação foi inativada a 65°C por 20 minutos.

3.5.4 Primers e amplificação

Para determinar as posições dos elementos *mariner* no genoma, foram sequenciadas as regiões *upstream* e *downstream* aos elementos, tendo sido amplificadas essas regiões com dois pares de *primer* em dois PCRs (figura 4).

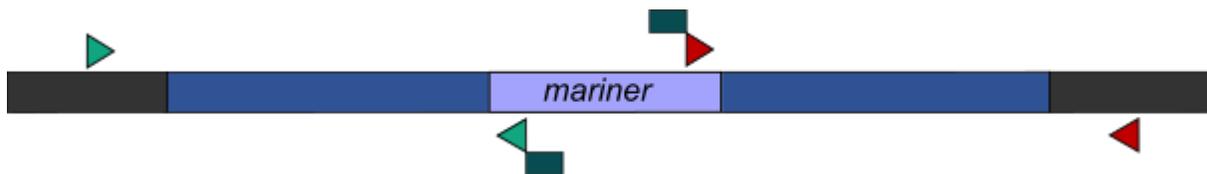


Figura 5. Regiões amplificadas pelos dois pares de *primer* representados pelos triângulos verde e vermelho

Dentre todos os fragmentos formados pelas enzimas de restrição, os de interesse são os que possuem *mariner*-Mos1 na sua sequência (Figura 4B) e, para amplificá-los, utilizamos dois pares de *primer* nos quais um dos *primer* de cada par anela-se ao *mariner*. O par de *primer* *Mos_5* amplifica um fragmento *upstream/a montante* ao *mariner*, sendo F: 5' CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTT 3' e R: 5' CGACATTCCCTACTTGTACACCTGG 3' (anela-se a *TIR* do *mariner*). O *primer* *Mos_3*, por sua vez, amplifica um fragmento *downstream/a jusante* ao *mariner*, sendo F: 5' CGACATTTCATACTTGTACACCTGA 3' (anela-se a *TIR* do *mariner*) e R: 5' CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTT 3'.

Juntamente aos *primer* *Mos_5* e *Mos_3* foi sintetizado o adaptador 5' GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 3' para fins de sequenciamento (Figura 4). Desta forma, após realização de um PCR para cada par de *primer* teremos amplificadas as sequências *upstream* e *downstream* ao *mariner*, com os adaptadores para sequenciamento.

Para amplificação foram usados 8ng de DNA clivado com adaptadores ligados, 1x PCR Buffer, 10mM dNTP, 10 uM de cada primer, 50mM MgCl₂, 1U de *Taq* DNA Polymerase, e água milliq tratada com DEPC para completar o volume final. As condições do PCR foram 95°C por 5 minutos (Polymerase Activation), seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 2 minutos a 72°C (PCR Cycling), seguidos por 10 minutos a 72°C e 4°C por tempo indeterminado.

Após cada PCR, foram realizados mais um PCR utilizando amostras do primeiro como *template*, afim de aumentar a quantidade de fragmentos de interesse. As condições do segundo PCR foram idênticas ao PCR inicial, usando 5uL do PCR inicial para o segundo como *template*.

Apesar de utilizarmos um par de *primer* cada extremidade de *mariner*, sendo um *primer* amplificando a extremidade do elemento e outro a região da enzima de restrição, ainda assim a amplificação não é específica para fragmentos com *mariner* em sua extensão (Figura 4B). Os adaptadores das duas extremidades e de ambas as enzimas de restrição diferem apenas nos 4 últimos nucleotídeos, permitindo o uso do mesmo *primer* para amplificação, independente das enzimas.

Dado isso, temos amplificações de fragmentos com o mesmo *primer* - anelado aos adaptadores - nas duas extremidades do fragmento (Figura 5), ou seja, fragmentos clivados e com adaptadores, mas sem *mariner*. Estes não são fragmentos de interesse e serão descartados por bioinformática.

3.5.5 Sequenciamento

Foram sequenciadas 12 amostras, sendo 4 tratamentos diferentes com triplicatas biológicas em cada um: Jovem 20°C, Jovem 28°C, Senescente 20°C e Senescente 28°C. Em cada um dos quatro tratamentos, a amplificação foi realizada nas duas extremidades do elemento, sendo realizado dois PCRs diferentes em cada amostra. Após, os dois PCRs de mesma amostra em cada uma das replicatas foram unidos e sequenciados como uma mesma amostra. Posteriormente, as 24 PCRs foram separadas por bioinformática.

O sequenciamento realizado foi Illumina Miseq. Foram sequenciadas ambas as fitas em cada extremidade do elemento *mariner* em duas replicatas(*paired-end*) e a terceira replicata foi feita *single-end*.

3.5.6 Análise do sequenciamento

As amostras recebidas foram analisadas através de bioinformática em linguagem Bash e Python. Inicialmente foram gerados escores de qualidade das sequências com o software *FastQC Read Quality reports* (Galaxy versão 0.72+galaxy1) para visualizar a qualidade das sequências e após isso, foi desenvolvido um *pipeline* específico com dois arquivos de saída/resultados para cada amostra. Além disso, utilizamos o *Velvet assembly* na plataforma Galaxy (versão 1.2.10.1) como uma primeira análise, seguido de *Blast* (versão 2.10.0+), como uma segunda forma de análise e comparação ao *pipeline* desenvolvido.

3.5.6.1 Descrição do *pipeline* TISseq-Pipe

O *pipeline* (Figura 6) foi desenvolvido utilizando três amostras sequenciadas inicialmente. O desenvolvimento foi feito com teste cego, de modo que os nomes dos arquivos estavam codificados e não houve nenhum viés de desenvolvimento. Além disso, o *pipeline* foi desenvolvido mantendo a especificidade dos fragmentos de interesse, de forma que alguns fragmentos foram perdidos afim de diminuir a ocorrência de falsos positivos.

Além de ter sido rodado com as triplicatas dos 4 tratamentos biológicos, o *pipeline* também foi rodado com as réplicas concatenadas em um mesmo arquivo, afim de aumentar a cobertura. Logo, além dos resultados com réplicas biológicas, temos os resultados com dados concatenados em que, antes de rodar o *pipeline*, as réplicas foram unidas como um único arquivo de cada tratamento.

- Arquivos de referência utilizados no decorrer do *pipeline*:

Alguns arquivos externos foram utilizados no decorrer do *pipeline* e são importantes para o seu correto funcionamento. Os primeiros arquivos necessários são as sequências dos pares de *primer* referentes a *mariner*, tanto na extremidade *upstream* como *downstream*. Esses dois arquivos de texto são utilizados para separar os *reads* iniciais que contém *mariner* nos dois grupos. Além disso, outro arquivo de texto utilizado contém a sequência do adaptador ligado ao sítio da enzima de restrição, visto que o *trimming* é feita de forma manual.

- SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS E LIMPEZA

Passo 1: *Separação das sequências com mariner*

Devido ao fato de a amplificação não ser específica a fragmentos com *mariner*, o primeiro passo a ser realizado na biblioteca é selecionar apenas fragmentos com *mariner* em uma das extremidades. Das 12 amostras sequenciadas, separamos 24 arquivos, sendo 12 que continham a extremidade *upstream* e 12, *downstream* a *mariner*. Nesse passo, tanto o arquivo de entrada como o arquivo de saída possuem a extensão *fastq*.

Passo 2: *Transformar sequências do formato fastq para fasta*

Para desenvolvimento dos próximos passos, a extensão precisa ser *fasta* e utilizamos o programa *fastq_to_fasta* - dentro do pacote *fastx tool kit*, versão 0.0.14 - para a conversão dos 24 arquivos.

Passo 3: *Trimming*

Com os arquivos já em formato *fasta*, realizamos o *trimming*. Como as sequências dos adaptadores eram conhecidas, visto que foram confeccionados no protocolo de biologia molecular, realizou-se *trimming* manual, afim de remover completa e corretamente os adaptadores. Nesse passo foram realizados dois *trimming*: uma para cada extremidade do fragmento de interesse.

Na extremidade 5' do fragmento de interesse observou-se diferentes quimeras do adaptador ligado ao sítio das enzimas de restrição. Logo, remover apenas a sequência de adaptador conhecida impossibilitaria a execução dos próximos passos de forma ideal. Para definir quais eram as variações dos adaptadores encontrados, realizou-se alinhamento - utilizando *blast* - da sequência conhecida do adaptador com todos os arquivos em formato *fasta*, antes de qualquer *trimming*.

As sequências de todas as quimeras encontradas em todas as amostras foram concatenadas em um arquivo e as repetições foram removidas. Encontramos 30 variações de adaptadores na extremidade 5' e removemos o concatenado de todos os arquivos das amostras. Ainda assim, observamos nos arquivos de saída que algumas possíveis quimeras não foram removidas.

Na extremidade 3' do fragmento, removeu-se a sequência referente ao *mariner* e tudo que havia após ele – adaptador mais artefatos do sequenciamento. Desta forma, ficamos apenas com as regiões *upstream* e *downstream* ao elemento, sem adaptadores e sem as sequências de *mariner*. Neste passo tanto o arquivo de entrada como o de saída estão na extensão fasta.

Passo 4: Limiar de tamanho

Após a limpeza, observou-se muitos fragmentos de curta extensão, incluindo artefatos de preparação que, quando *trimmed*, restavam apenas os sítios das enzimas de restrição. Definimos um limiar de tamanho mínimo de 25 nucleotídeos para análises seguintes. Neste passo, mantém-se a extensão fasta.

- BLAST E SEPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS ÚNICAS E MÚLTIPLAS

Passo 5: Selfblast (blast de uma amostra contra ela mesma)

Dentre os fragmentos de interesse, temos fragmentos que se repetem muitas vezes e fragmentos que são únicos. Para possível comparação de uma amostra contra outra, é necessário definir quais são os fragmentos que são únicos, quais se repetem e um representante para os que se repetem. Para definir fragmentos únicos e múltiplos, utilizamos blast de cada uma das 24 amostras utilizando a mesma amostra como *query* e *subject*. Nesse passo, o arquivo de entrada possui extensão fasta e saída tsv (do inglês, *Tab Separated Values*).

Passo 6: Separação de sequências únicas e múltiplas

No blast das amostras contra elas mesmas, temos sequências cujo blast só ocorre com ela mesma, tendo um único hit de blast (sequências *onehit* ou únicas) e sequências que apresentam múltiplos hits (sequências *multihit* ou múltiplas). Separamos cada amostra em dois arquivos, sendo um *multihit* e outro *onehit*. Nesse passo tanto o arquivo de entrada como o de saída possuem extensão tsv e temos 48 arquivos finais.

- SELEÇÃO DE REPRESENTANTE *MULTIHIT*

Passo 7: Filtro 1

O filtro 1 consiste em remover as redundâncias dos blasts. Nas sequências *multihit*, os blasts da sequência contra ela mesma foram removidos. Além disso, foram desconsideradas redundâncias de blast, como hit de A versus B e, posteriormente, B versus A. Apenas um dos blast foi mantido.

Passo 8: Criação de coluna scov

Para definir se as sequências comparadas eram as mesmas ou não, definimos dois valores de cobertura. Um dos valores disponibilizado pelo blast, *qcov* (*query coverage*, cobertura em relação a *query*) e outro calculado a partir dos valores do blast e na mesma linha do anterior, *scov* (*subject coverage*, cobertura em relação a *subject*).

O valor de *qcov* é calculado a partir da razão entre o tamanho alinhado e a o tamanho da sequência *query*, multiplicado por 100. O *scov*, que foi calculado nesse passo, trata-se da razão entre o tamanho alinhado e o tamanho da sequência *subject*, também multiplicado por 100. Neste passo, ambos os arquivos, de entrada e saída, possuíam extensão tsv e a única mudança foi a inserção da coluna com o cálculo do valor de *scov*.

Passo 9: Definição do inserto representante entre as repetições

Após estabelecido os valores de *qcov* e *scov* das sequências em cada amostra *multihit*, definimos um limiar de valores para definir se as sequências eram iguais ou diferentes. Definiu-se que, sequências que possuíam *qcov* e/ou *scov* maior ou igual a 70 seriam a mesma sequência e com valores inferiores a isso, seriam sequências diferentes.

Das sequências iguais, o ID (identificador) da sequência *query* foi separado cada vez que a *subject* possuía o valor igual ou maior que 70, as repetições foram removidas e os IDs enviados para um novo arquivo. As sequências diferentes foram desconsideradas. Neste passo, tanto o arquivo de entrada como o de saída possuem extensão tsv.

Passo 10: Pegar sequências referentes ao IDs

A partir dos IDs definidos como representantes, recuperamos as sequências referentes aos mesmos. Neste passo, utilizamos o arquivo de entrada com os IDs de cada amostra com extensão tsv e buscamos as sequências nos arquivos fastas do passo 4 referentes a cada amostra. São gerados 24 arquivos fastas.

- **COMPARAÇÃO APENAS COM AMOSTRAS *MULTIHIT***

Passo 11: *Blast de uma amostra contra outra*

Após a seleção dos fragmentos representantes, temos a comparação entre amostras. A comparação foi realizada entre as seguintes amostras: Jovem 20°C contra Jovem 28°C e Jovem 28°C contra Jovem 20°C; Jovem 20°C contra Senescente 20°C e Senescente 20°C contra Jovem 20°C; Jovem 28°C contra Senescente 28°C e Senescente 28°C contra Jovem 28°C.

Além das comparações entre as três replicatas de cada tratamento, cada comparação foi realizada nas duas extremidades do elemento, extremidade *upstream* contra extremidade *upstream*, e da mesma forma na extremidade *downstream* a *mariner*. Nesse passo, os arquivos de entrada possuem a extensão fasta e os arquivos de saída do blast possuem a extensão tsv. São gerados 36 arquivos de saída.

Passo 12: *Filtro 2*

Apesar do *trimming*, ainda observamos blast de variações de adaptadores entre as amostras. Realizamos um *trimming* dos arquivos de saída do blast afim de remover possíveis blast falsos positivos devido a essas sequências. Sequências que alinham apenas uma sequência similar ao adaptador, definida por iniciarem com o fragmento “CACTCTT” foram separadas e consideradas como zero hit, ou seja, como estando presente em apenas uma das amostras. Nesse passo, todos os arquivos possuem extensão tsv.

Passo 13: *Blast recíproco*

A partir do arquivo “limpo” de blast devido a quimeras de adaptadores, realizou-se blast recíproco afim de dar maior especificidade e sensibilidade entre os blast. Dessa forma, buscou-se evitar possíveis falsos negativos que viessem a ocorrer.

O arquivo de saída do blast recíproco é um arquivo de extensão tsv. Para definir os valores dos resultados utilizamos: os fastas do passo 10 como número total de posições; o resultado do blast recíproco como posições iguais nas duas amostras; e, realizamos uma subtração dos dois valores para encontrar as posições que são únicas em uma ou outra amostra (0 hits). Aqui temos o primeiro resultado do *pipeline* TISseq.

- **CONCATENADO DAS SEQUÊNCIAS *ONEHIT* E REPRESENTANTES *MULTIHIT***

Passo 14: *Pegar sequências referentes aos IDs onehit*

Da mesma forma que no passo 10, neste passo recuperamos as sequências a partir dos IDs das sequências *onehit*. Da mesma forma, utilizamos os fastas do passo 4 para essa recuperação.

Passo 15: *Concatenar fastas onehit e insertos representantes*

Concatenamos as sequências fasta *onehit* do passo 14 com as sequências fasta do passo 10 em um único arquivo de cada amostra, unindo *onehit* com representantes *multihit*. Isso, visto que as sequências *onehit* não precisam passar pelos outros passos do *pipeline*. Entretanto, devido a ausência de cobertura, analisou-se como duas formas: sequências com cobertura (*multihit*) e com e sem cobertura (*multihit+onehit*)

Passo 16: *Blast entre amostras*

Realiza-se o mesmo que já descrito no passo 11, agora para os arquivos concatenados.

Passo 17: *Filtro 2*

Realiza-se o mesmo que descrito no passo 12.

Passo 18: *Blast recíproco*

Realiza-se o mesmo que descrito no passo 13. Neste passo chegamos ao segundo resultado do *pipeline* que utiliza fragmentos *onehit* e *multihit*. O arquivo de saída do blast recíproco é um arquivo de extensão tsv. Para definir os valores dos resultados utilizamos: os arquivos fasta concatenados do passo 15 como número total

de posições; o resultado do blast recíproco como posições iguais nas duas amostras; e, realizamos uma subtração dos dois valores para encontrar as posições que são únicas em uma ou outra amostra.

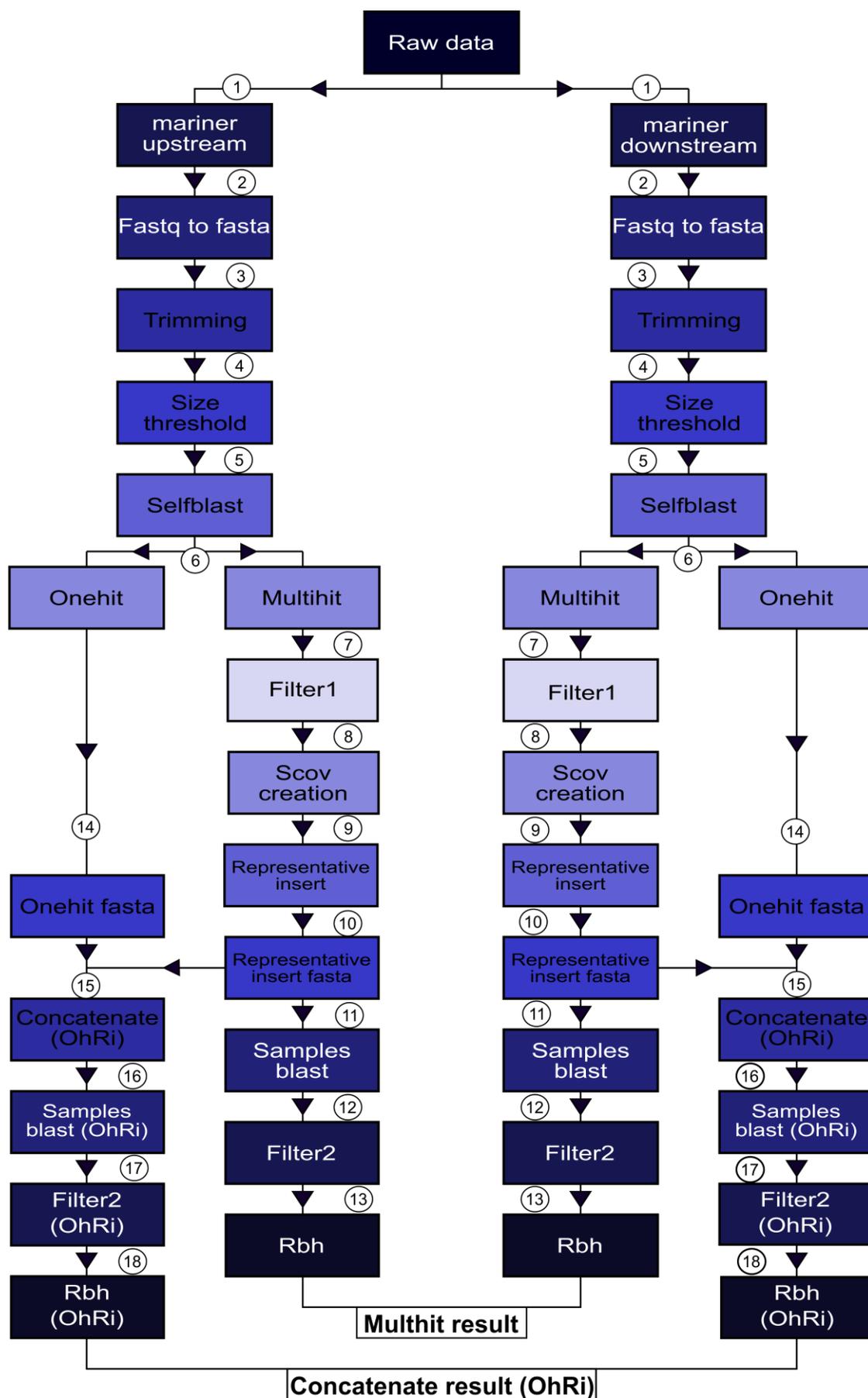


Figura 6. Fluxograma representativo do *pipeline* TIS-seq. A partir dos dados brutos, foram separados em dois conjuntos de dados (*upstream* e *downstream*). Posteriormente cada conjunto foi separado em duas análises diferentes (*multihit* e *multihit+onehit*). Cada retângulo em tons de azul representa um resultado de alguma análise. Os números em círculos representam as diferentes análises pelas quais os dados passaram. Círculos com os mesmos números indicam que amostras diferentes passaram pela mesma análise. Temos quatro resultados finais a partir de cada dado bruto, sendo dois *multihit* e dois *multihit+onehit*.

3.5.6.2 Velvet assembly

Outra forma utilizada para definir representantes dentro das amostras para posterior comparação foi o *Velvet assembly*, na plataforma Galaxy (versão 1.2.10.1). Os arquivos de entrada utilizados no Velvet – programa de preparação das amostras dentro do *Velvet assembly* – são os arquivos trimados, oriundos do passo 4 do *pipeline* TISseq. Os arquivos de saída do Velvet foram direcionados para o Velvetg – programa de montagem dos *contigs* dentro do *Velvet assembly*. Nos dois programas utilizou-se parâmetros padrões.

Apesar da montagem dos *contigs*, não se esperava fragmentos muito maiores do que os já apresentados nos *reads*. Entretanto, a montagem de *contigs* elimina sequências repetidas, sendo uma forma alternativa ao *pipeline* desenvolvido. Os arquivos de saída do Velvetg foram alinhados – utilizando os passos 11, 12 e 13 do *pipeline* TISseq - umas contra as outras, de acordo com os tratamentos biológicos.

3.6 Dolutegravir e longevidade

A curva de sobrevivência foi realizada com a concentração 2mM da droga DTG e um controle sem droga (estabelecido em Cancian e Loreto, 2018). A oviposição foi realizada em um meio sem droga e todo o estágio larval e de pupa foi mantido nesta mesma condição. Após a eclosão dos adultos, 5 casais por vidro foram colocados em meios com e sem droga e mantidos sempre nas mesmas condições ao longo do envelhecimento até que tivessem moscas vivas.

Todo o experimento foi mantido em 20°C durante todo o desenvolvimento e envelhecimento. As repicagens ocorreram a cada 5 dias e as moscas mantidas em

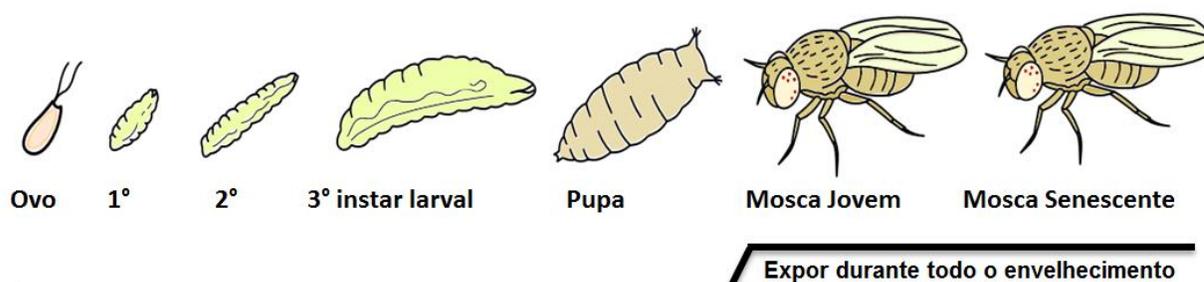


Figura 7. Estágio de exposição a droga DTG. Todo o desenvolvimento até eclosão do adulto é mantido em meio normal e as moscas são expostas a DTG durante todo o envelhecimento a partir de 1-4 dias da eclosão.

meio sem droga sempre foram repicadas para meio sem droga, bem como moscas em meios com droga, para novos meios com droga (Figura 7).

O experimento foi realizado com 100 moscas sendo 50 fêmeas e 50 machos para o tratamento e o mesmo para o controle. Drosófilas que morreram devido ao manuseio da repicagem foram desconsideradas. A análise estatística foi realizada no programa Graphpad prism 6, utilizando os testes Log Rank (Mantel-Cox) test e Gehan-Breslow-Wilcoxon test. Os dados foram tabelados com 1 para evento de morte e 0 como moscas censuradas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Excisão de *mariner-peach* por qPCR

A excisão de *mariner* do gene *white* é calculada pela porcentagem do mosaicismos do gene, tendo como 100% a *Drosophila simulans* selvagem que apresenta 100% do genoma com o gene *white* na condição selvagem. Nos outros dois tratamentos são medidas as taxas de reversão do gene a condição selvagem.

Para *D. simulans* com fenótipo selvagem a taxa de amplificação é definida em 100% com valor de +- 1,0246, dado que todo o genoma se encontra na condição selvagem. Já para moscas jovens a 20°C a taxa de excisão de *mariner* do gene *White* (reversão a condição selvagem) de 0,96% (+- 0,0098) e para senescentes a 20°C de 4,23% (+- 0,0433), apresentado na figura 8. Apenas com o envelhecimento das

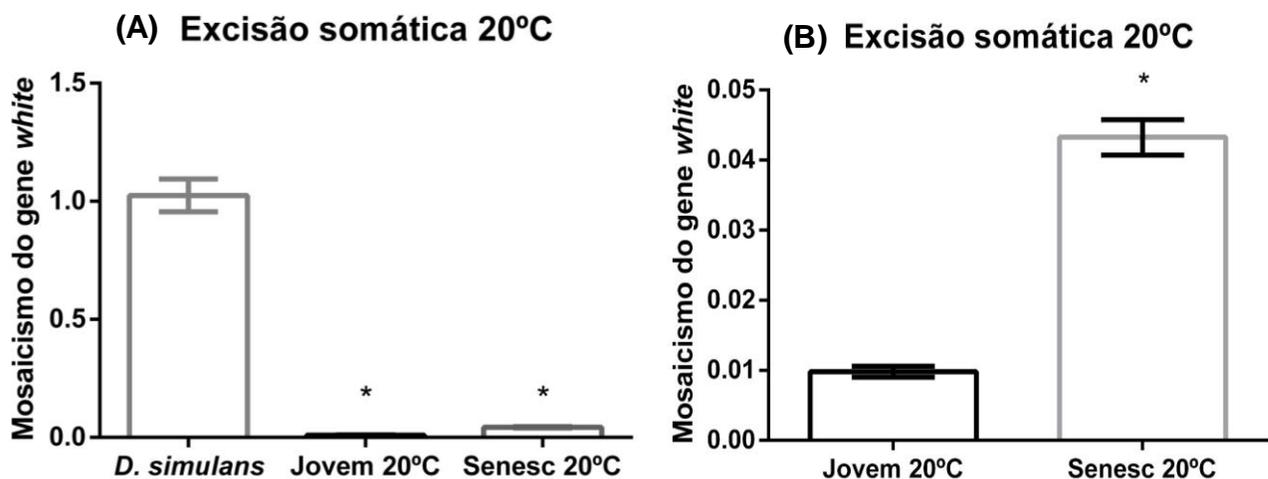


Figura 8 (A) Taxa de excisão somática de *mariner* em moscas jovens e senescentes a 20°C em comparação com *D. simulans* que apresenta 100% do genoma com o gene *white* na condição selvagem. Utilizou-se teste anova de uma via com valor de $p < 0,0001$. (B) Taxa de transposição somática entre jovem e senescente a 20°C. Utilizou-se teste t com valor de $p = 0,0233$.

drosófilas encontramos uma taxa de excisão 4,4 vezes maior.

O tratamento senescente a 20°C mostrou uma maior taxa de excisão do elemento *mariner* do gene *white* em relação ao jovem, corroborando com nossa hipótese de que excisão somática aumenta ao longo do envelhecimento das moscas ($P=0,0233$) (Figura 8B). Esses dados complementam os dados de Pereira e colaboradores (2018) que indicam um acúmulo de transposição somática ao longo do desenvolvimento das drosófilas.

Resultados similares foram encontrados no tratamento a 28°C, tanto para comparação com *D. simulans* ($P<0,0001$), como para jovens e senescentes ($P<0,0001$). *D. simulans* apresenta taxa de amplificação considerada 100% (+ 0,9783), enquanto jovens a 28°C apresenta 2,53% (+ 0,0248) e senescentes 8,54% (+0,0836), como apresentado na figura 9.

Neste tratamento podemos observar que a taxa de excisão é em torno de 3,4 vezes maior em moscas senescentes. Podemos observar também um acúmulo da transposição causada pela soma de idade e estresse por temperatura, visto que a porcentagem de excisão em moscas senescentes e sob estresse de temperatura é cerca de 2 vezes maior que as senescentes sem estresse de temperatura. Esse acúmulo de temperatura e idade também é visto por Pereira e colaboradores (2018), porém nos estágios de desenvolvimento das moscas.

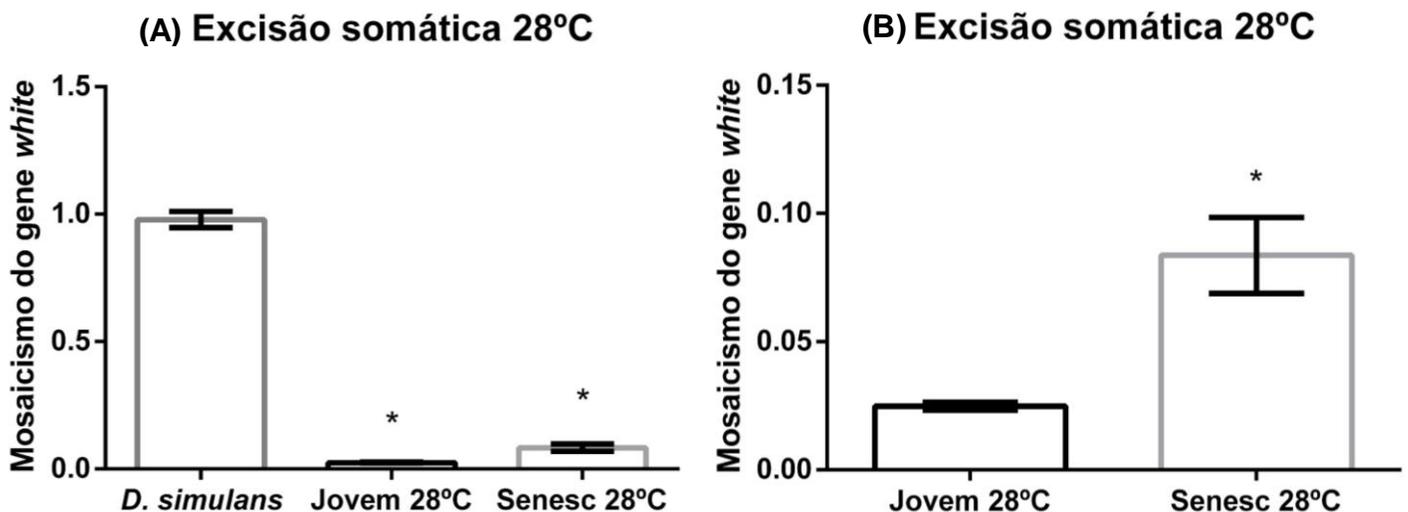


Figura 9 (A) Taxa de excisão somática de *mariner* em moscas jovens e senescentes a 28°C em comparação com *D. simulans* que apresenta 100% do genoma com o gene *white* na condição selvagem. Utilizou-se teste anova de uma via com valor de $p<0,0001$. (B) Taxa de transposição somática entre jovem e senescente a 20°C. Utilizou-se teste t com valor de $p<0,0001$.

Uma maior taxa de excisão do elemento *mariner* em moscas senescentes sugere uma maior taxa de transposição somática do transposon bem como uma acumulação de transposição ao longo do envelhecimento. Egilmez e Reis (1994) encontraram um aumento na taxa de excisão do elemento Tc1 com a idade de *C. elegans*.

A atividade de TEs em células somáticas e a sua relação com a idade já era sugerida por Driver e McKechnie em 1992. Tanto os resultados a 20°C, como os resultados a 28°C são condizentes com (Li *et al*, 2013) que sugerem que há uma maior taxa de transposição de TEs durante o envelhecimento de drosófilas no processo de envelhecimento normal no cérebro, resultado corroborado por outra metodologia recente (Chang *et al*, 2019). Entretanto, as implicações da mobilização somática estão intimamente relacionadas a diversas doenças (Hancks e Kazazian, 2016).

Sturm e colaboradores (2015) sugerem a relação transposição-instabilidade genômica como uma das principais causas do envelhecimento. Uma das explicações para o aumento da transposição com a idade tem a ver com uma alteração epigenética, que leva a uma perda da heterocromatina repressiva (Harman e Martín, 2019). Corroborando, Wood e colaboradores (2016) encontraram que uma manutenção na heterocromatina, capaz de manter o silenciamento dos TEs, conseguem aumentar o tempo de vida em drosófila.

Por outro lado, Treiber e Waddell (2017) não encontraram correlação de TS e idade em drosófila, sugerindo que a visão de mobilização somática é enviesada por artefatos de sequenciamento. Entretanto, nossos dados de excisão por RT-qPCR apontam para um acúmulo de TS de *mariner* com o envelhecimento em duas temperaturas.

4.2 Inserção de *mariner* por TISseq

Através do *pipeline* TISseq, tem-se dois resultados: os resultados referentes a análise *multihit*, e os resultados referentes ao concatenado *onehit+multihit*. Além disso, uma segunda análise foi feita utilizando o mesmo *pipeline*. A segunda análise trata-se de um concatenado das replicatas, afim de aumentar a cobertura do sequenciamento em cada amostra biológica. Os concatenados de replicatas também foram analisados

como *multihit* e *onehit+multihit*. Por fim, totalizamos 4 resultados dispostos nas figuras 10, 11, 12A e 12B.

4.2.1 Pipeline TISseq – *Multihit*

A análise *multihit* utiliza somente sequências cujas cópias possuíam alguma cobertura de sequenciamento, ou seja, mais de uma cópia foi detectada na amostra inicial. Essas posições, por apresentarem uma certa cobertura, representam inserções que são mais frequentes em um tecido ou organismo.

A 20°C temos os elementos *mariner* em determinadas posições do genoma. Quando estressamos as drosófilas a 28°C (Jardim *et al*, 2015), grande parte destes elementos sofre excisão somática (Pereira *et al*, 2018) e, provavelmente, inserem-se em novas regiões (Adrion *et al*, 2017). Ao analisarmos as sequências *upstream* e *downstream* a *mariner* a 20 e a 28°C podemos observar as diferentes posições em que os elementos se encontram em diferentes tecidos e organismos. Encontramos que a maior parte das sequências recuperadas foram diferentes nos tratamentos de moscas com a mesma idade, apenas expostas a temperaturas diferentes (Figura 10A). Esse resultado foi encontrado tanto na extremidade *upstream*, quanto *downstream*.

Entretanto, algumas sequências recuperadas mantêm-se iguais nas moscas a 20 e 28°C, tanto na extreminadade *upstream*, como *downstream* a *mariner*. Na figura 10A extremidade *upstream*, encontramos que a réplica Jovem 20°C A possui 134 fragmentos ao final da análise, enquanto a réplica Jovem 28°C A tem 161. Ambas têm em comum 30 desses fragmentos, e o restante posições diferentes de inserção de *mariner*, indicando uma troca de posição do elemento.

Por outro lado, na réplica A *downstream*, temos que Jovem 20°C A tem 103 fragmentos enquanto a réplica Jovem 28°C A tem 111 fragmentos. Ambas têm em comum apenas 15 fragmentos. Apesar dessas amostras e as citadas anteriormente serem as mesmas, logo, os elementos e posições também, tanto a extremidade *up* como *downstrem* deveria ter recuperado números parecidos. Entretanto, alguns fragmentos devem ter sido perdidos no processo de preparação e sequenciamento das amostras, bem como alguns fragmentos ficaram longos demais e não foram

amplificados/sequenciados. Isso pode explicar a discrepância de valores nas duas extremidades.

Esperávamos encontrar uma maior diversidade de sequências no tratamento a 28°C, visto que após o evento de estresse temos um mosaico mais acentuado. Ou seja, uma maior quantidade de células teria passado pelo processo de transposição e, como a inserção de *mariner* é em sítios TA, quase aleatória no genoma, uma maior variedade de posições seriam recuperadas.

Ainda assim, caso os eventos de inserção não estivessem ocorrendo, esperaríamos recuperar fragmentos iguais ou similares nas duas amostras. Isso, visto que, como a excisão não ocorre em todas as células, a parte não mobilizada ainda seria recuperada. Entretanto, as sequências em comum nas amostras são baixas quando comparada a quantidade de posições recuperadas.

Ademais, quando observamos a figura 9A réplica A, tanto na extremidade *upstream* como *downstream* temos um aumento relativamente baixo no número de posições nas moscas mantidas a 28°C. Um aumento maior na quantidade de fragmentos pode ser visto na réplica B *upstream*, em que as moscas jovens a 20°C possuíam 357 posições, enquanto as jovens a 28°C, 438 posições. Por outro lado, tanto a réplica C, como a extremidade *downstream* na réplica B, ainda na figura 10A, vimos que moscas expostas a um estresse por temperatura não apresentaram um aumento de posições recuperadas.

Já para a análise de senescência, comparamos moscas jovens e senescentes a 20°C e o mesmo entre as moscas a 28°C. Acredita-se que com o aumento da idade das drosófilas, conseqüentemente alteração na heterocromatina repressiva (Wood *et al*, 2016; Harman e Martín, 2019), mais elementos sofram transposição. Da mesma forma, comparamos a diferença nas sequências *up* e *downstream* ao *mariner* entre as moscas jovens e senescentes nas suas respectivas temperaturas.

Tanto para a comparação jovem e senescente a 20°C (Figura 10B), quanto para a 28°C (Figura 10C), em ambas as extremidades de *mariner*, encontramos que: (1) algumas posições se mantêm iguais antes e depois do processo de envelhecimento, indicando que algumas cópias do elemento não se mobilizam. Isso porque como a

mobilização ocorre quando o organismo já está formado, em que algumas células sofrem transposição dentro de um determinado tecido, enquanto outras não.

(2) A maior parte dos elementos é recuperado em posições diferentes, indicando que a inserção ocorre. A mobilização somática relacionada a idade é questionada por Treiber e Waddell (2017). Os autores não encontraram correlação de TS e idade em *drosófila* e sugerem que muito do que é considerado mobilização somática são, na verdade, artefatos quiméricos de sequenciamento. Nesse sentido, desenvolvemos um *pipeline* pensando em inúmeros falsos positivos e negativos tentando manter a maior sensibilidade possível e removendo sequências consideradas artefatos.

Entretanto, esperávamos encontrar uma maior quantidade de sequências proporcionalmente ao aumento da temperatura e da idade, visto que os dois fatores causam um aumento de expressão, excisão e, provavelmente, de inserção. Os dados brutos completos dessa análise podem ser encontrados no material suplementar (tabela 1).

Alguns fatores podem explicar esses resultados. Primeiro, que a cobertura utilizada pode não ter sido suficiente para recuperar uma representação real do acontecimento biológico, ou seja, não chegamos a um platô de sequenciamento. Isso já era sugerido por Treiber e Waddell (2017). Eles sugerem que apenas um sequenciamento das extremidades do elemento, com alta cobertura e de um mesmo organismo poderia mostrar a taxa de inserção real. Entretanto, mesmo com apenas dois elementos por genoma, e com uma linhagem estável, a cobertura foi insuficiente.

Alguns motivos da cobertura ter sido insuficiente, provavelmente: (1) porque nem todos os fragmentos sequenciados são fragmentos com *mariner*; (2) porque sequenciamos duas extremidades juntas; (3) porque a quantidade de moscas utilizadas inicialmente pode não só ter sido muito alta, como polimórfica; (4) porque a taxa de inserção somática foi muitas vezes mais alta do que o hipotetizado no desenho experimental. Apesar de não usarmos o mesmo indivíduo para o experimento jovem e senescente, visto que a extração de uma “parte” da *drosófila* é inviável para o protocolo, acreditávamos que a taxa de transposição seria baixa o suficiente para ser recuperada na cobertura utilizada.

Segundo, as bibliotecas possuem tamanhos diferentes e, além disso, as sequências das duas extremidades não são recuperadas na mesma proporção. Por exemplo, a amostra jovem a 28°C réplica C possui 13747 *reads*, enquanto a senescente a 28°C réplica C possui 9665 *reads* recuperados (tabela suplementar 1). Da jovem 28°C, 5002 *reads* são *up* e 3558 são *downstream*. Já para a senescente, 5805 *reads* são *up* e 1128 são *downstream*. Embora pudéssemos igualar as bibliotecas iniciais, após a limpeza os *reads* seguem em proporções ainda mais discrepantes e a eliminação de alguns faria com que perdêssemos boa parte do sequenciamento.

Observamos que além da diferença na biblioteca inicial entre os tratamentos biológicos, temos uma diferença entre as extremidades *up* e *downstream*. Além disso, a comparação entre jovem e senescente fica desproporcional e uma conclusão relacionada apenas a uma consequência biológica é inviável. Os dados brutos completos dessa análise podem ser encontrados no material suplementar (tabela 1).

Além disso, quando removemos fragmentos muito pequenos (<25 nucleotídeos) notamos que os números de *reads* são ainda menores. De 5805 *reads* para 2774 *reads* no tratamento senescente a 28°C réplica C, extremidade *upstream*, por exemplo. Isso corrobora com o primeiro ponto sobre a cobertura do sequenciamento que fica comprometida. Essa diminuição acontece porque o sequenciamento Illumina prioriza os menores fragmentos para sequenciamento. Além disso, devido a muitos fragmentos que, após limpos, ficam com apenas o sítio das enzimas de restrição, acredita-se que alguns dos fragmentos amplificados e selecionados são falhas no processo de construção e sequenciamento dos amplicons.

Bem como encontramos para o tratamento de temperatura, nos ensaios de envelhecimento algumas réplicas apresentam maior variedade de sequências após serem removidas as repetições, enquanto outras aumentam após o estresse. Devido aos fatores já mencionados, fica impossível estabelecer uma relação entre inserção vs temperatura ou inserção versus envelhecimento.

No trabalho de Treiber e Waddell (2017), não foi possível estabelecer uma relação entre inserções de novo e idade das moscas. Por outro lado, muitos trabalhos apontam para uma maior taxa de expressão e um aumento do número de cópias de TEs com a idade.

Todavia, encontramos que a inserção ocorre, pois a maior parte das posições recuperadas entre os tratamentos são diferentes, indicando elementos inseridos em regiões diferentes do genoma. Aqui, apresentamos que a taxa de inserção de TEs no organismo é muito alta, principalmente levando em consideração que a linhagem apresenta 2 cópias de *mariner* por genoma, apenas.

Uma estimativa acerca da taxa espontâneas de inserção e deleção é apresentada por Adrion e colaboradores (2017) em 8 linhagens de *Drosophila melanogaster*. Apesar de problemas metodológicos, os autores encontraram que a taxa de inserção é muito maior que a taxa de deleção. O número total de inserções foi de 280, após 145-149 gerações nas 8 linhagens, com mais de 4000 cópias de TEs inicialmente.

Apesar de a maior parte das inserções que ocorrem ao longo da vida dos organismos não deve ser fixada, visto que ocorre em células somáticas, alguns estudos indicam implicações de inserções não fixadas (Goubert *et al*, 2019). Por conseguinte, nossos dados apontam que, provavelmente, a taxa de inserção somática é ainda mais alta e significativa do que se pensava e pode, portanto, estar influenciando a expressão gênica, o processo de envelhecimento e as doenças relacionadas a idade.

Apesar de a ideia de inserção somática já ser percebida desde a descoberta dos TEs, com Barbara McClintock, ainda não temos ideia do quão comum as inserções são nos genomas. Muitos autores sugerem um aumento de transposição em momentos específicos, como na formação de tumores (Burns, 2017), e mais de 100 doenças (Hancks e Kazazian, 2016). Entretanto, enquanto Li e colaboradores (2013) encontram uma taxa de expressão significativa de TEs no envelhecimento normal no cérebro, nós detectamos que, independentemente da idade ou temperatura, a taxa de inserção de *mariner* é altíssima.

TISseq multihit

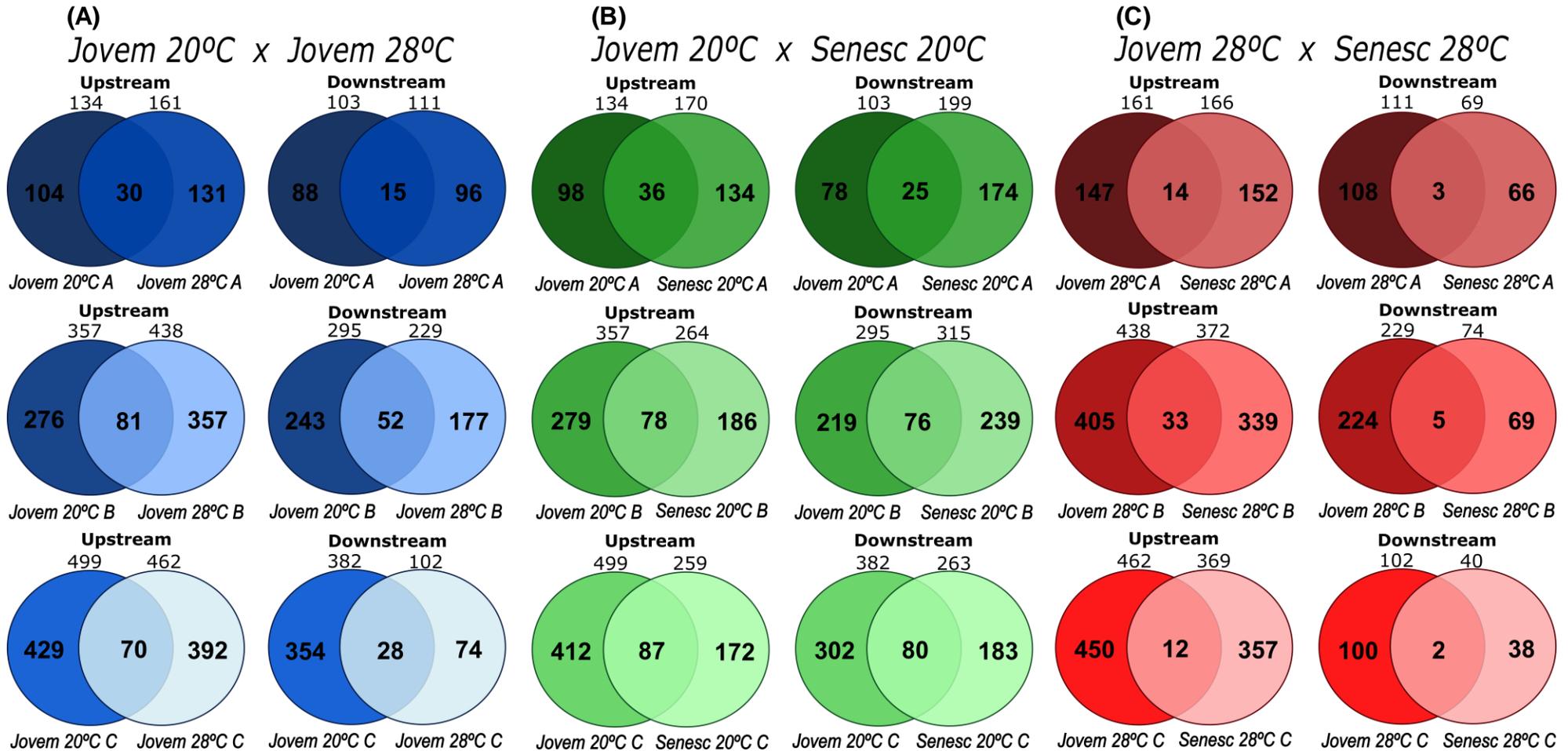


Figura 10. Resultado da análise dos dados *multihit*. (A) Jovem 20°C contra Jovem 28°C. (B) Jovem 20°C contra Senescente 20°C (C). Jovem 28°C contra Senescente 28°C. Para todas as amostras temos as representações nas duas extremidades (*upstream* e *downstream*) para uma mesma comparação. Fora de cada diagrama de Venn temos representado o valor total de fragmentos *multihit* para cada amostra, réplica e extremidade. Abaixo do diagrama temos indicado as amostras e réplicas comparadas. Dentro do diagrama, temos os valores de fragmentos não compartilhados pelas duas amostras, ou seja, valor total – valor em comum das amostras. Ao centro, como intersecção dos diagramas, temos os valores correspondentes a fragmentos compartilhados pelas duas amostras.

4.2.2 Pipeline TISseq – *Multihit* e *Onehit*

Como observou-se que haviam muitos fragmentos que eram únicos, ou seja, não havia cobertura de sequenciamento, resolveu-se juntar esses fragmentos aos fragmentos finais da análise *multihit*. Dessa forma, teríamos uma maior variedade de fragmentos, podendo representar um resultado mais amplo.

Observamos que o número de fragmentos únicos é altíssimo em praticamente todas as amostras. Na figura 11, podemos observar que, similar aos resultados apenas de *multihit*, algumas réplicas apresentam uma maior quantidade de fragmentos após o tratamento com temperatura ou idade (por exemplo: a comparação Jovem 20°C contra Jovem 28°C B nas duas extremidades) enquanto outros apresentam o resultado oposto (por exemplo: a comparação Jovem 20°C contra Senescente 20°C réplica C nas duas extremidades).

Apesar de termos aumentado a variedade de fragmentos, as relações inserção/temperatura e inserção/idade seguem inconclusivas. Parte disso, deve-se ao fato da quantidade de fragmentos iniciais de cada amostra. Apesar de as bibliotecas iniciais de sequenciamento terem um número total de *reads* parecidos ou ajustáveis, quando comparamos os *reads* “limpos”, a divergência é alta (tabela suplementar 1).

Entretanto, podemos notar dois pontos a partir desses dados: (1) A alta quantidade de fragmentos únicos (*onehit*) reforça o ponto da baixa cobertura do experimento. Por outro lado, (2) uma quantidade alta de fragmentos únicos sugere uma alta taxa de inserção dos elementos ao longo das amostras, visto que, se o processo de transposição não estivesse acontecendo, teríamos uma alta quantidade de fragmentos iguais.

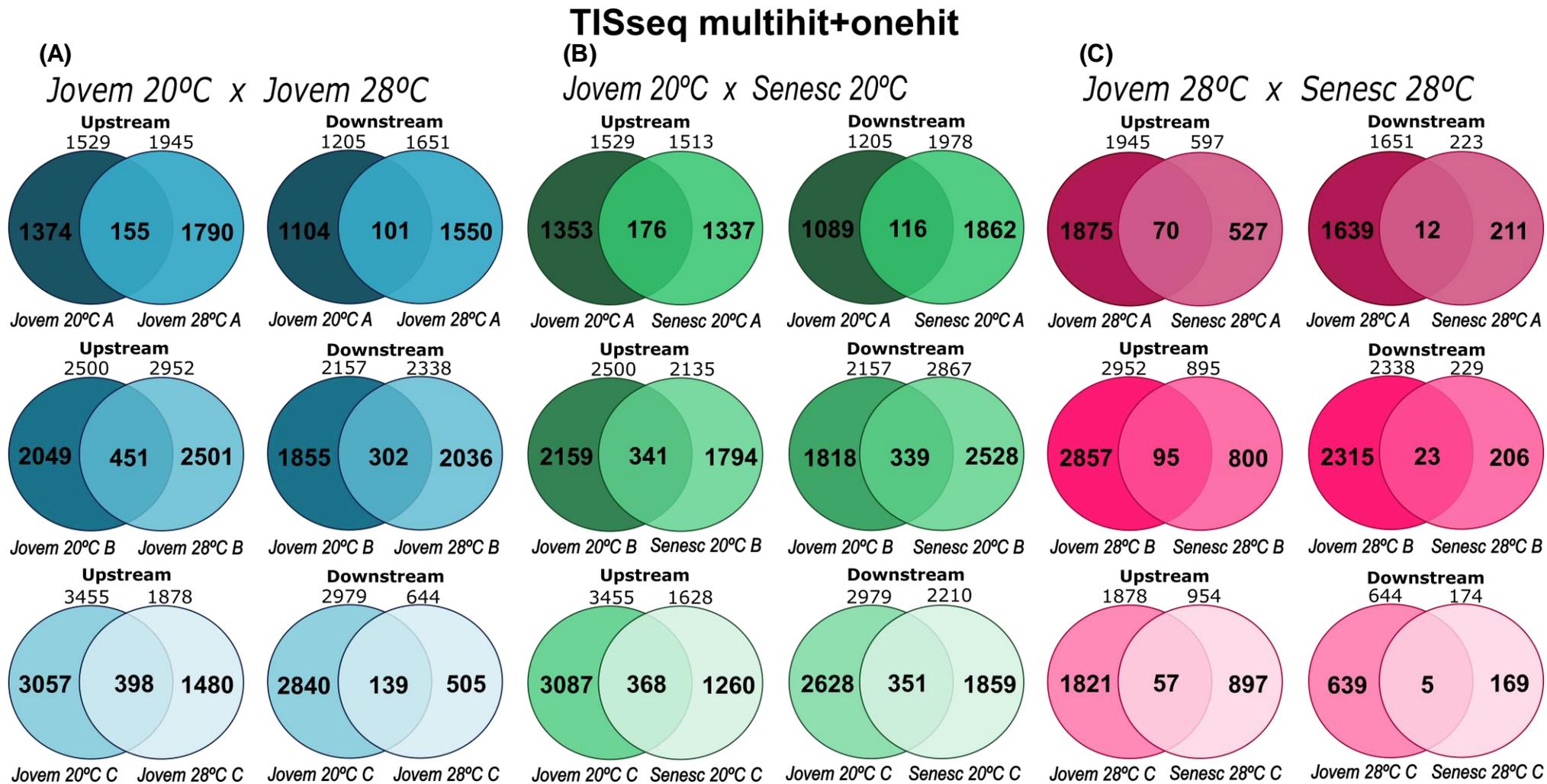
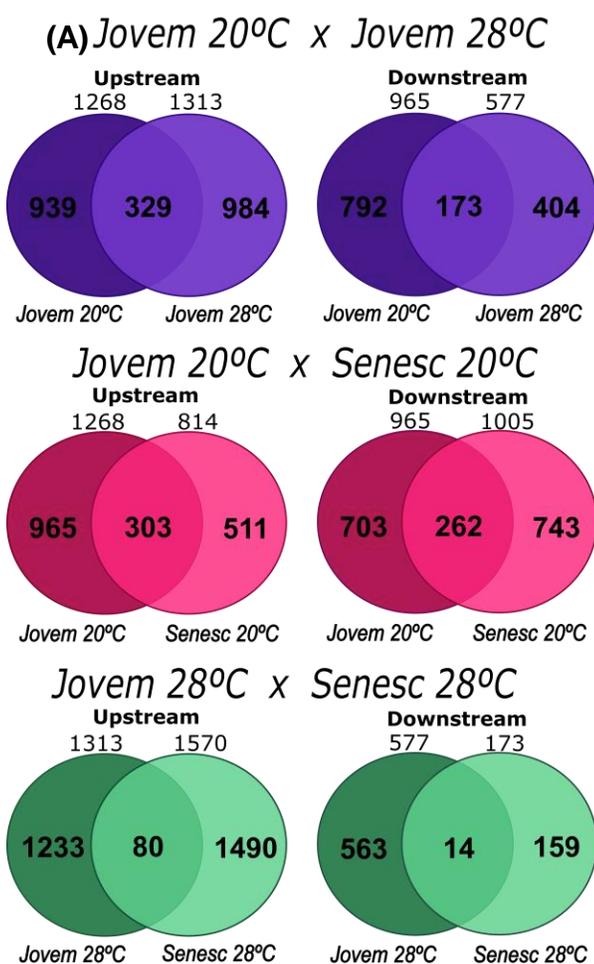


Figura 11. Resultado da análise dos dados *multihit+onehit*. (A) Jovem 20°C contra Jovem 28°C. (B) Jovem 20°C contra Senescente 20°C (C). Jovem 28°C contra Senescente 28°C. Para todas as amostras - temos as representações nas duas extremidades (*upstream* e *downstream*) para uma mesma comparação. Fora de cada diagrama de Venn temos representado o valor total de fragmentos *multihit+onehit* para cada amostra, réplica e extremidade. Abaixo do diagrama temos indicado as amostras e réplicas comparadas. Dentro do diagrama, temos os valores de fragmentos não compartilhados pelas duas amostras, ou seja, valor total – valor em comum das amostras. Ao centro, como intersecção dos diagramas, temos os valores correspondentes a fragmentos compartilhados pelas duas amostras.

4.2.3 Pipeline TISseq – Concatenado

Como encontramos uma variedade maior do que se esperava nos locais de inserção dos elementos, indicando uma alta taxa de inserção, a cobertura do sequenciamento foi insuficiente para comparações entre inserção com temperatura e idade. Uma das formas de tentar minimizar esse dado foi concatenarmos as réplicas em uma única amostra (Figura 12). Dessa forma, apesar de diminuirmos a replicabilidade do experimento, a biblioteca inicial de cada amostra aumenta e conseqüentemente, o resultado final.

TISseq concatenado multihit



TISseq concatenado multihit+onehit

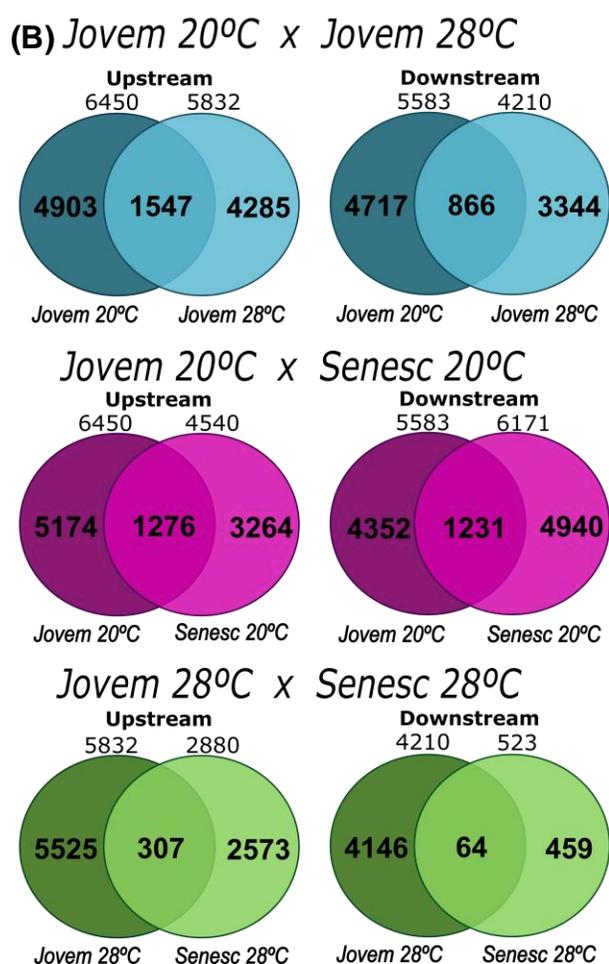


Figura 12. Comparação de réplicas concatenadas e analisadas no *pipeline* TISseq. (A) Concatenado *multihit*. (B) Concatenado *onehit+multihit*. As três comparações - Jovem 20°C contra Jovem 28°C; Jovem 20°C contra Senescente 20°C; Jovem 28°C contra Senescente 28°C - estão representadas para as duas extremidades do elemento, *upstream* e *downstream*.

Entretanto, mesmo com uma maior quantidade de fragmentos, tivemos um aumento também da quantidade de moscas usadas no início do experimento, ou seja, mais inserções diferentes. Dessa forma, mesmo com mais fragmentos, os resultados seguem inconclusivos do ponto temperatura e idade.

O que fica bastante claro nos dados concatenados é que a variedade de inserções é bastante alta e que os sítios de inserção de *mariner* no genoma são vários. Entretanto, tanto pelo possível polimorfismo da linhagem inicial, quanto pela sub-representação do sequenciamento, as comparações com temperatura e idade são inconclusivas.

4.2.4 Velvet assembly

Uma forma de análise paralela ao *pipeline* foi desenvolvida afim de possivelmente confirmar a adequação do *pipeline* TISseq ao que estava sendo proposto. Utilizamos um *assembly* para realizar alguns dos passos realizados no *pipeline*. Como esperávamos, o resultado encontrado no *Velvet assembly* foi semelhante as proporções encontradas pelo *pipeline* TISseq, entretanto, temos uma menor quantidade de fragmentos recuperados em relação ao *pipeline*. Isso indica a maior sensibilidade do *pipeline* desenvolvido, principalmente no que diz respeito a fragmentos pequenos.

Quando olhamos para os “*contigs*” formados pelo *Velvet assembly* (figura 13) notamos que, proporcionalmente, as amostras apresentam uma maior quantidade de fragmentos pelo *pipeline* TISseq (figura 10) com exceção das réplicas Jovem a 28°C B e C *downstream*, que apresentaram um número maior com o *Velvet assembly*. Por se manter uma proporção similar nas duas análises, acredita-se que a metodologia de limpeza e comparação de fragmentos é funcional e de acordo com o resultado esperado quando comparado com uma metodologia já estabelecida – *Velvet assembly*.

Por outro lado, podemos perceber que a sensibilidade do *pipeline* TIS-seq é muito maior do que a do *Velvet assembly*. Isso, visto que usando os mesmos fragmentos iniciais nas duas análises, encontramos que, embora proporcionalmente semelhantes, a quantidade de fragmentos é muito maior no *pipeline*. A forma de separação dos fragmentos repetidos ou semelhantes realizada pelo *pipeline* permite

que tenhamos uma manutenção muito maior de fragmentos e torna a análise mais sensível a fragmentos pequenos.

Além disso, o desenvolvimento do *Pipeline-TISseq* foi importante visto que conhecíamos as sequências de adaptadores e primers e a limpeza automatizada acabou por não ser eficiente. Ademais, a metodologia molecular e preparação das amostras apresentou diversos artefatos de sequenciamento que só puderam ser excluídos de forma minuciosamente customizada.

Adicionalmente, uso do *pipeline* nos permite amplas análises. Quando olhamos os arquivos de saída do *pipeline* vimos que podemos usar tanto os resultados *multihit* quanto *onehit+multihit* quanto apenas *onehit*. Já para a análise com Velvet, é provável que boa parte dos fragmentos *onehit* estejam sendo perdidos. Isso é importante considerando que uma parte significativa dos *reads* iniciais das amostras são sequências únicas e esse é um ponto que passa despercebido quando utilizamos apenas a plataforma *Velvet assembly*.

Por fim, devido a todos os pontos mencionados, salientamos o quanto metodologias já estabelecidas são importantes para as análises dos dados gerados, e para comparação com novas metodologias mais sensíveis e específicas. Entretanto, salienta-se também o quanto ficar reféns dessas metodologias afeta negativamente a análise dos dados gerados, impossibilitando, por exemplo, uma exclusão adequada de fragmentos artefatos de sequenciamento, como apontado por Treiber e Waddell (2017).

Resultado Velvet

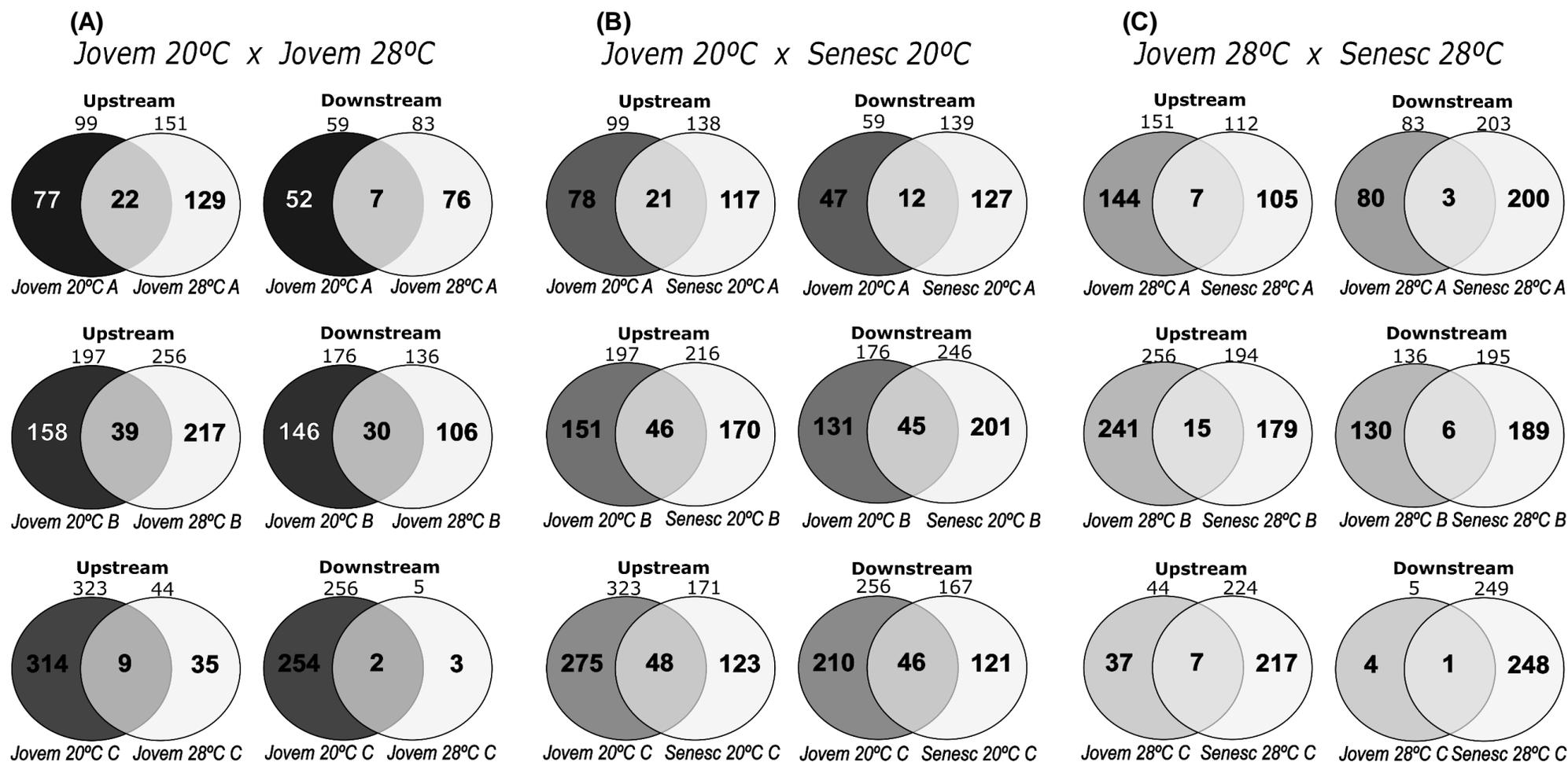


Figura 13. Resultado da análise dos dados *Velvet assembly*. (A) Jovem 20°C contra Jovem 28°C. (B) Jovem 20°C contra Senescente 20°C (C). Jovem 28°C contra Senescente 28°C. Para todas as amostras temos as representações nas duas extremidades (*upstream* e *downstream*) para uma mesma comparação. Fora de cada diagrama de Venn temos representado o valor total de fragmentos *multihit* para cada amostra, réplica e extremidade. Abaixo do diagrama temos indicado as amostras e réplicas comparadas. Dentro do diagrama, temos os valores de fragmentos não compartilhados pelas duas amostras, ou seja, valor total – valor em comum das amostras. Ao centro, como intersecção dos diagramas, temos os valores correspondentes a fragmentos compartilhados pelas duas amostras.

4.3 Análise de longevidade e Dolutegravir

Algumas drogas são capazes de silenciar a mobilização de TEs e, com isso, diminuir a instabilidade genômica e danos ao DNA. Por consequência, o retardo na ativação dos TEs ao longo da vida pode significar em um aumento na expectativa de vida dos organismos e diminuição nas doenças relacionadas a idade. O primeiro caso é visto por Wood e colaboradores (2016), com o fármaco 3TC, enquanto o segundo é visto por Sun e colaboradores (2019), com o mesmo fármaco.

Como DTG foi capaz de diminuir a mobilização somática de *mariner-mos1* (Cancian e Loreto, 2018), tratamos *Drosophila simulans* durante todo o envelhecimento com 2mM do fármaco, visto que uma menor mobilização poderia aumentar a expectativa de vida das moscas. Nossos resultados não mostram uma diferença significativa na curva de sobrevivência entre moscas tratadas e controles, com valores de $P=0,7$ e $P=0,06$ para os testes de Log Rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon, respectivamente (Figura 14).

Apesar de nossos dados anteriores apontarem para uma diminuição significativa da mobilização somática de *mariner* sob o efeito de DTG, o efeito parece não ter sido suficiente para prolongar a expectativa de vida das drosófilas. Uma explicação é que, possivelmente, por ter uma alta taxa de mobilização somática, a taxa de inibição não foi suficiente para impactar na expectativa de vida.

Uma outra explicação possível é que há atividade de outros elementos transponíveis possivelmente ativos em *Drosophila simulans*, como retrotransposons (Lerat *et al*, 2011), que não são silenciados pelo DTG. Essa atividade de outros elementos, que provavelmente não foi silenciada pelo fármaco, pode ter se sobreposto ao efeito da diminuição da transposição de *mariner-mos1* por DTG. Ou seja, a inibição de um único elemento com baixo número de cópias pode ter sido insuficiente para ter impacto na expectativa de vida das moscas quando comparado ao controle.

Embora a descontinuação do fármaco DTG por toxicidade seja baixa na maior parte dos relatos clínicos (Llibre *et al*, 2019), indicando a segurança do medicamento, há alguns relatos de eventos adversos neuropsiquiátricos mais frequentes para DTG que para outros inibidores de integrase (Hoffmann e Llibre, 2019) . Além disso, a

exposição das moscas ao fármaco durante todo o envelhecimento, pode ter afetado o metabolismo e atividade das moscas, de maneira que o custo-benefício foi deficitário.

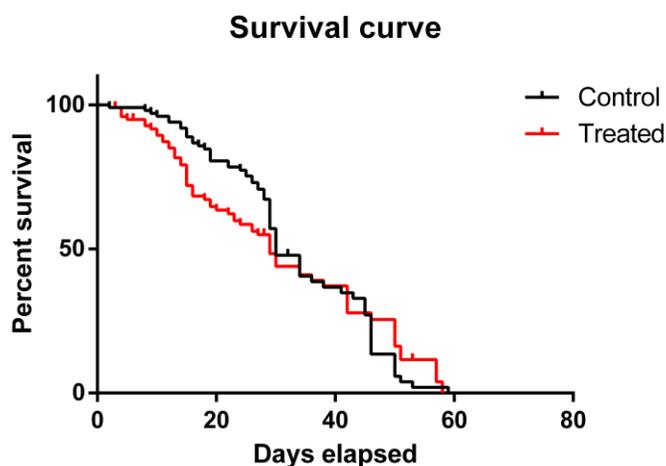


Figura 14. Curva de sobrevivência entre moscas controle (em preto) e tratadas com 2mM de Dolutegravir (em vermelho). O valor de P para Log Rank (Mantel-Cox) test foi P=0,7 e P= 0,06 para Gehan-Breslow-Wilcoxon test.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Observamos que a taxa de excisão de *mariner* aumenta ao longo do envelhecimento das drosófilas, indicando a ocorrência de um acúmulo de transposição somática. Entretanto, não foi possível determinar as relações envelhecimento-inserção somática e temperatura-inserção somática, em virtude de uma taxa de inserção somática muitas vezes maior do que hipotetizado em nosso desenho experimental, o que implicou que nossa cobertura de sequenciamento não foi suficiente para determinar as relações temperatura/envelhecimento e TS.

Afim de definirmos possíveis valores da taxa de inserção de *mariner*, estimaremos qual seria a taxa de inserção do elemento caso atingíssemos o platô de sequenciamento. Para tanto, estimaremos através dos fragmentos já obtidos e tendo como base o genoma de *D. simulans*, quantos seriam os fragmentos reais, caso a metodologia atingisse seu objetivo.

Alguns detalhes pontuais do *pipeline* podem ser otimizados, como por exemplo a adaptação para utilização da fita complementar sequencias para algumas réplicas. Além disso, um teste *benchmark* será realizado com dados fictícios e cujos resultados

já saberemos previamente, para confirmar e reparar quaisquer possíveis problemas que passaram despercebidos no seu desenvolvimento.

Afim de resolver os problemas encontrados, pretende-se repetir o sequenciamento de amplicons utilizando uma isolinhagem da linhagem *D. simulans* W^{pCh} teste, diminuindo assim os possíveis polimorfismos da linhagem. Além disso, uma forma de aumentar a eficiência do experimento é a realização de PCR vectorial, em que apenas fragmentos com *mariner* em uma das extremidades é amplificado. Por conseguinte, poderíamos utilizar apenas uma extremidade do elemento, bem como uma temperatura, aumentando a cobertura sem extrapolar o custo do experimento. Isso, visto que já sabemos a eficiência do experimento e a alta recuperação de fragmentos.

Por fim, o fármaco DTG, capaz de diminuir a mobilização somática de *mos1*, não foi suficiente para prolongar a expectativa de vida das drosófilas. Entretanto, pretende-se repetir o experimento com a isolinhagem, além de, se descoberto retroelementos ativos na isolinhagem, uma possível combinação de fármacos para silenciar a maior parte dos elementos ativos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRION, J. R., SONG, M. J., SCHRIDER, D. R., HAHN, M. W., & SCHAACK, S. (2017). **Genome-Wide Estimates of Transposable Element Insertion and Deletion Rates in *Drosophila Melanogaster***. *Genome Biology and Evolution*, 9(5), 1329–1340.

ANWAR, S., WULANINGSIH, W., & LEHMANN, U. (2017). **Transposable Elements in Human Cancer: Causes and Consequences of Deregulation**. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 974.

ARKHIPOVA, I. R. MESELSON, M. **Diverse DNA transposons in rotifers of the class Bdelloidea**. *PNAS*, 2005 vol. 102 n° 33 11781–11786.

ARKHIPOVA, I. R. (2017). **Using bioinformatic and phylogenetic approaches to classify transposable elements and understand their complex evolutionary histories**. *Mobile DNA*, 8(1).

BACHILLER, S., DEL-POZO-MARTÍN, Y., & CARRIÓN, Á. M. (2017). **L1 retrotransposition alters the hippocampal genomic landscape enabling memory formation**. *Brain, Behavior, and Immunity*, 64, 65–70.

BAILEY, J. A. LIU, G. EICHLER, E.E. **An Alu Transposition Model for the Origin and Expansion of Human Segmental Duplications**. *Am. J. Hum. Genet.* 73:823–834, 2003.

BARCKMANN, B., EL-BAROUK, M., PÉLISSON, A., MUGAT, B., LI, B., FRANCKHAUSER, C., ... CHAMBEYRON, S. (2018). **The somatic piRNA pathway controls germline transposition over generations**. *Nucleic Acids Research*.

BEJERANO, G. LOWE, C. B. AHITUV, N. KING, B. SIEPEL, A. SALAMA, S. R. RUBIN, E. M. KENT, W. J. HAUSSLER, D. (2006) **A distal enhancer and an ultraconserved exon are derived from a novel retroposon**. *NATURE letters*|Vol 441

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

BRILLET, B.; BIGOT, Y.; AUGE-GOUILLOU, C. **Assembly of the *Tc1* and *mariner* transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase DNA binding domains**. *Genetica*, 2007, 130(2), 105-120.

BRYAN, G. J.; JACOBSON, J. W.; HARTL, D. L. **Heritable somatic excision of a drosophila transposon**. *Science*, vol 235, pág 1636-1638, 1987.

BOURQUE, G. (2009). **Transposable elements in gene regulation and in the evolution of vertebrate genomes**. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(6), 607–612.

- BURNS, K. **Transposable elements in cancer.** *Nat Rev Cancer* **17**, 415–424 (2017).
- CANAPA, A., BARUCCA, M., BISCOTTI, M. A., FORCONI, M., & OLMO, E. (2015). **Transposons, Genome Size, and Evolutionary Insights in Animals.** *Cytogenetic and Genome Research*, **147**(4), 217–239.
- CANCIAN, M.; LORETO, E. L. S. (2018). **A Mos1 transposase in vivo assay to screen new HIV-1 integrase inhibitors.** *Genetica*, **146**(2), 243–247.
- CARDELLI, M. (2018). **The epigenetic alterations of endogenous retroelements in aging.** *Mechanisms of Ageing and Development*, **174**, 30–46.
- CHANG, Y.-H., KEEGAN, R. M., PRAZAK, L., & DUBNAU, J. (2019). **Cellular labeling of endogenous retrovirus replication (CLEVR) reveals de novo insertions of the gypsy retrotransposable element in cell culture and in both neurons and glial cells of aging fruit flies.** *PLOS Biology*, **17**(5), e3000278.
- CHEN, H., ZHENG, X., XIAO, D., & ZHENG, Y. (2016). **Age-associated de-repression of retrotransposons in the Drosophila fat body, its potential cause and consequence.** *Aging Cell*, **15**(3), 542–552.
- CHÉNAIS, B. CARUSO, A. HIARD, S. CASSE, N. **The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: From genome size increase to genetic adaptation to stressful environments.** *Gene* **509** (2012) 7–15.
- CHUONG, E. B., RUMI, M. A. K., SOARES, M. J., & BAKER, J. C. (2013). **Endogenous retroviruses function as species-specific enhancer elements in the placenta.** *Nature Genetics*, **45**(3), 325–329.
- aCHUONG, E. B. ELDE, N. C. FESCHOTTE, C. **Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses.** *Science* **2016 VOL 351 ISSUE 6277** 1083-1087.
- bCHUONG, E. B. ELDE, N. C. FESCHOTTE, C. (2016) **Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits.** *NATURE REVIEWS | GENETICS* 1-16
- CURCIO, M. J. DERBYSHIRE, K. M. **The outs and ins of transposition: from Mu to Kangaroo.** *Nature reviews | molecular cell biology* **2003**.
- CZECH, B., & HANNON, G. J. (2010). **Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes.** *Nature Reviews Genetics*, **12**(1), 19–31.
- DECHAUD, C. VOLFF, J.-N.; SCHARTL, M.; NAVILLE, M. **Sex and the TEs: transposable elements in sexual development and function in animals.** *I. Mobile DNA* (2019) 10:42

- DE CECCO, M., CRISCIONE, S. W., PETERSON, A. L., NERETTI, N., SEDIVY, J. M., & KREILING, J. A. (2013). **Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues.** *Aging*, 5(12), 867–883.
- DOOLITTLE, W.F. AND SAPIENZA, C. (1980) **Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution.** *Nature*, 284, 601 –603.
- DRIVER, C. J. I., & McKECHNIE, S. W. (1992). **Transposable Elements as a Factor in the Aging of *Drosophila melanogaster*.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 673(1 Physiopatholo), 83–91.
- EGILMEZ, N. K., & SHMOOKLER REIS, R. J. (1994). **Age-dependent somatic excision of transposable element Tc1 in *Caenorhabditis elegans*.** *Mutation Research/DNAging*, 316(1), 17–24.
- EWART, G. D., & HOWELLS, A. J. (1998) **ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*.** *ABC Transporters: Biochemical, Cellular, and Molecular Aspects*, 213–224.
- FINNEGAN, D. J. **Eukaryotic transposable elements and genome evolution.** *Trends Genet.* v. 5(4), p. 103-107. 1989.
- FINNEGAN, D. J. **Transposable elements.** *Genetics and Development* 2:861-867, 1992.
- FEDOROFF, N. V. **Barbara McClintock** (1993). *Revista Internacional de la Asociación Iberoamericana de Biología Evolutiva ASIBE* volume 7:1-19
- FLEMR, M., MALIK, R., FRANKE, V., NEJEPINSKA, J., SEDLACEK, R., VLAHOVICEK, K., & SVOBODA, P. (2013). **A Retrotransposon-Driven Dicer Isoform Directs Endogenous Small Interfering RNA Production in Mouse Oocytes.** *Cell*, 155(4), 807–816.
- FROST, B., HEMBERG, M., LEWIS, J., & FEANY, M. B. (2014). **Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation.** *Nature Neuroscience*, 17(3), 357–366.
- GARCIA-PEREZ, J. L. WIDMANN, T. J. ADAMS, I. R. **The impact of transposable elements on mammalian development.** *Development* (2016) 143, 4101-4114.
- GREEN, M. M. **The genetics of a mutable gene at the *white* locus of *Drosophila melanogaster*.** *Genetics* 56: 467-482, 1967.
- GREEN, M. M. **Controlling element mediated transpositions of the *White* gene in *Drosophila melanogaster*.** *Genetics* 61 : 429-441, 1968.

- GOODIER, J.L. DAVIDSON, W.S. (1994) **Tc1 transposon-like sequences are widely distributed in salmonids.** J. Mol. Biol. 241, 26–34
- GOUBERT, C., ZEVALLOS, N. A., FESCHOTTE, C. (2020) **Contribution of unfixed transposable element insertions to human regulatory variation.** Phil. Trans. R. Soc. B 375:20190331.
- GOULD, S. VRBA, E. **Exaptation—a missing term in the science of form.** Paleobiology 8, 4-15 (1982)
- GUO, C., JEONG, H.-H., HSIEH, Y.-C., KLEIN, H.-U., BENNETT, D. A., DE JAGER, P. L., ... SHULMAN, J. M. (2018). **Tau Activates Transposable Elements in Alzheimer's Disease.** Cell Reports, 23(10), 2874–2880.
- HAIG, D. (2016). **Transposable elements: Self-seekers of the germline, team-players of the soma.** BioEssays, 38(11), 1158–1166.
- HAN, K. LEE, J. MEYER, T. J. REMEDIOS, P. GOODWIN, L. BATZER, M. A. **L1 recombination-associated deletions generate human genomic variation.** PNAS, 2008 vol. 105 no. 49 19366–19371.
- HAREN, L. TON-HOANG, B. CHANDLER, M. (1999) **Integrating DNA: transposases and retroviral integrases.** Annu. Rev. Microbiol. 53:245–81
- HARMAN, M. F., & MARTÍN, M. G. (2019). **Epigenetic mechanisms related to cognitive decline during aging.** Journal of Neuroscience Research.
- HAYMER, D. S., & MARSH, J. L. (1985). **Germ line and somatic instability of a white mutation in *Drosophila mauritiana* due to a transposable genetic element.** Developmental Genetics, 6(4), 281–291.
- HOF, A. E. VAN'T, CAMPAGNE, P., RIGDEN, D. J., YUNG, C. J., LINGLEY, J., QUAIL, M. A., ... SACCHERI, I. J. (2016). **The industrial melanism mutation in British peppered moths is a transposable element.** Nature, 534(7605), 102–105.
- HOFFMANN, C., & LLIBRE, J. M. (2019). **Neuropsychiatric Adverse Events with Dolutegravir and Other Integrase Strand Transfer Inhibitors.** Aids Reviews, 21(1).
- JACOBSON, J. W.; HARTL, D.L. (1985) **Coupled instability o two x-linked genes in *Drosophila mauritiana* germinal and somatic mutability.** Genetics, vol 111, pág 57-65.
- JACOBSON, J. W. MEDHORA, M. M. HARTL, D. L. (1986) **Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*.** Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol. 83, pp. 8684-8688, 1986 Genetics

JARDIM, S. S. SCHUCH, A. P. PEREIRA, C. M. LORETO, E. L. S. (2015) **Effects of heat and UV radiation on the mobilization of transposon *mariner-Mos1*.**

JURKA, J. KAPITONOV, V. V. PAVLICEK, A. KLONOWSKI, P. KOHANY, O. WALICHIEWICZ, J. **Rebase Update, a database of eukaryotic repetitive elements.** Cytogenet. Genome Res. 110, 462–467 (2005)

KAPITONOV, V.V. JURKA, J. (2008) **A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Rebase.** Nat. Rev. Genet. 9, 411–412.

KIDWELL, M. G. LISCH, D. R. **Perspective: Transposable elements, parasitic dna, and genome evolution.** Evolution - International journal of organic evolution. 55: 1-24, 2001.

KIRKWOOD, T. B. L. (2008). **Understanding ageing from an evolutionary perspective.** Journal of Internal Medicine, 263(2), 117–127.

LAPP, H. E., & HUNTER, R. G. (2019). **Early life exposures, neurodevelopmental disorders, and transposable elements.** Neurobiology of Stress, 100174.

LERAT, E., BURLET, N., BIÉMONT, C., & VIEIRA, C. (2011). **Comparative analysis of transposable elements in the melanogaster subgroup sequenced genomes.** Gene, 473(2), 100–109.

LEROY, H.; CASTAGNONE-SERENO, P.; RENAULT, S.; AUGÉ-GOUILLOU, C.; BIGOT, Y.; ABAD, P. **Characterization of *Mcmar1*, a *mariner-like* element with large inverted terminal repeats (ITRs) from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne chitwoodi*.** Gene, 2003, 304, 35-41.

LEVIN, H. L., & MORAN, J. V. (2011). **Dynamic interactions between transposable elements and their hosts.** Nature Reviews Genetics, 12(9), 615–627.

LI, W. PRAZAK, L. CHATTERJEE, N. GRÜNINGER, S. KRUG, L. THEODOROU, D. DUBNAU, J. (2013). **Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila*.** Nature Neuroscience, 16(5), 529–531.

LLIBRE, J. M.; MONTOLIU, A.; MIRÓ, J. M.; DOMINGO, P.; RIERA, M.; TIRABOSCHI, J.; CURRAN, A.; HOMAR, F.; AMBROSIONI, J.; ABDULGHANI, N.; FORCE, L.; PERAIRE, J.; CASABONA, J. (2019). **Discontinuation of dolutegravir, elvitegravir/cobicistat and raltegravir because of toxicity in a prospective cohort.** HIV Medicine.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). **The Hallmarks of Aging.** Cell, 153(6), 1194–1217.

LUNYAK, V.V. PREFONTAINE, G. G. NÚÑEZ, E. CRAMER, T. JU, B. G. OHGI, K.A. HUTT, K. ROY, R. GARCÍA-DÍAZ, A. ZHU, X. YUNG, Y. MONTOLIU, L. GLASS, C. K.

ROSENFELD, M. G. (2007) **Developmentally Regulated Activation of a SINE B2 Repeat as a Domain Boundary in Organogenesis.** *Science* 317, 248-251.

LORETO, E. L. S., & PEREIRA, C. M. (2017). **Somatizing the transposons action.** *Mobile Genetic Elements*, 7(3), 1–9.

LYNCH, V. J., LECLERC, R. D., MAY, G., & WAGNER, G. P. (2011). **Transposon-mediated rewiring of gene regulatory networks contributed to the evolution of pregnancy in mammals.** *Nature Genetics*, 43(11), 1154–1159.

MALONE, C. D., & HANNON, G. J. (2009). **Small RNAs as Guardians of the Genome.** *Cell*, 136(4), 656–668.

MEDHORA, M. M.; MACPEEK, A. H.; HARTL, D. L. **Excision of the *Drosophila* transposable element *mariner* identification and characterization of the *Mos* factor.** *The EMBO Journal*, vol 7, nº 7, pág 2185-2189, 1988.

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

MÉREL, V., BOULESTEIX, M., FABLET, M. ET AL. (2020) **Transposable elements in *Drosophila*.** *Mobile DNA* 11, 23.

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

MUOTRI, A. R. MARCHETTO, M. C. N. COUFAL, N. G. GAGE, F. H. (2007) **The necessary junk: new functions for transposable elements.** *Human Molecular Genetics*, Vol. 16, Review Issue 2 159-167.

NIEDERNHOFER, L. J., GURKAR, A. U., WANG, Y., VIJG, J., HOEIJMAKERS, J. H. J., & ROBBINS, P. D. (2018). **Nuclear Genomic Instability and Aging.** *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 295–322.

NISHIHARA, H. (2019) **Transposable elements as genetic accelerators of evolution: contribution to genome size, gene regulatory network rewiring and morphological innovation.** *Genes Genet. Syst.* 1-13.

OLIVER, K. R., & GREENE, W. K. (2009). **Transposable elements: powerful facilitators of evolution.** *BioEssays*, 31(7), 703–714.

ORGEL, L.E. AND CRICK, F.H. (1980) **Selfish DNA: the ultimate parasite.** *Nature*, 284, 604 –607.

- ORR, W. C. (2016). **Tightening the connection between transposable element mobilization and aging**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), 11069–11070.
- OOSUMI, T. BELKNAP, W. R. GARLICK, B. (1995) ***Mariner* transposons in humans**. *Nature* 378, 672
- PARDUE, M.-L., & DEBARYSHE, P. G. (2003). **Retrotransposons Provide an Evolutionarily Robust Non-Telomerase Mechanism to Maintain Telomeres**. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 485–511.
- PIACENTINI, L. FANTI, L. SPECCHIA, V. BOZZETTI, M. P. BERLOCO, M. PALUMBO, G. PIMPINELLI, S. **Transposons, environmental changes, and heritable induced phenotypic variability**. *Chromosoma* (2014) 123:345–354.
- PIÉGU, B. BIRE, S. ARENSBURGER, P. BIGOT, Y. **A survey of transposable element classification systems – A call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity**. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 90-109, 2015.
- PLASTERK, R. H.; IZSVAK, Z.; IVICS, Z. **Resident aliens: the Tc1/*mariner* superfamily of transposable elements**. *Trends Genet.*, 1999, 15(8), 326-332.
- PLATT II, R. N. VANDEWEGE, M. W. KERN, C. SCHMIDT, C. J. HOFFMANN, F. G. RAY, D. A. (2014) **Large Numbers of Novel miRNAs Originate from DNA Transposons and Are Coincident with a Large Species Radiation in Bats**. *Mol. Biol. Evol.* 31(6):1536–1545
- PRAY, L. & ZHAUROVA, K. (2008) **Barbara McClintock and the discovery of jumping genes (transposons)**. *Nature Education* 1(1):169.
- REBOLLO, R., FARIVAR, S., & MAGER, D. L. (2012). **C-GATE - catalogue of genes affected by transposable elements**. *Mobile DNA*, 3(1), 9.
- ROBERTSON, H. M. (1993) **The *mariner* transposable element is widespread in insects**. *Nature*, 362(6417), 241-245.
- SASAKI, T. NISHIHARA, H. HIRAKAWA, M. FUJIMURA, K. TANAKA, M. KOKUBO, N. KIMURA-YOSHIDA, C. MATSUO, I. SUMIYAMA, K. SAITOU, N. SHIMOGORI, T. OKADA, N. (2008) **Possible involvement of SINEs in mammalian-specific brain formation**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4220–4225.
- SCHNABLE, P. S., WARE, D., FULTON, R. S., STEIN, J. C., WEI, F., PASTERNAK, S., ... GRAVES, T. A. (2009). **The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics**. *Science*, 326(5956), 1112–1115
- SCHRADER, L., & SCHMITZ, J. (2018). **The impact of transposable elements in adaptive evolution**. *Molecular Ecology*.

SEDIVY, J. M., KREILING, J. A., NERETTI, N., CECCO, M. D., CRISCIONE, S. W., HOFMANN, J. W., ZHAO, X., ITO, T., PETERSON, A. L. (2013). **Death by transposition - the enemy within?** *BioEssays*, 35(12), 1035–1043.

SLOTKIN, R. K., & MARTIENSSEN, R. (2007). **Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome.** *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 272–285.

STERANKA, J. P. TANG, Z. GRIVAINIS, M. HUANG, C. R. L. PAYER, L. M. REGO, F. O. R. MILLER, T. L. A. PEDRO A. F. GALANTE, P. A. F, RAMASWAMI, S. HEGUY, A. FENYÖ, D. BOEKE, J. D. BURNS, K. H. (2019) **Transposon insertion profiling by sequencing (TIPseq) for mapping LINE-1 insertions in the human genome.** *Mobile DNA* 10:8 1-14.

STOFFEL, T. J. R., SEGATTO, A. L., SILVA, M. M., PRESTES, A., BARBOSA, N. B. V., ROCHA, J. B. T., & LORETO, E. L. S. (2020). **Cyclophosphamide in *Drosophila* promotes genes and transposable elements differential expression and mitochondrial dysfunction.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 230, 108718.

STURM, A.; IVICS, Z.; VELLAI, T. (2015) **The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration.** *Cell. Mol. Life Sci.* 72:1839–1847.

STURM, A.; PERCZEL, A. IVICS, Z.; VELLAI, T. (2017) **The Piwi-piRNA pathway: road to immortality.** *Aging Cell*, 16:906–911.

SOUSA-VICTOR, P., AYYAZ, A., HAYASHI, R., QI, Y., MADDEN, D. T., LUNYAK, V. V., & JASPER, H. (2017). **Piwi Is Required to Limit Exhaustion of Aging Somatic Stem Cells.** *Cell Reports*, 20(11), 2527–2537.

STERANKA, J. P., TANG, Z., GRIVAINIS, M., HUANG, C. R. L., PAYER, L. M., REGO, F. O. R., MILLER, T. L. A., GALANTE, P. A. F., RAMASWAMI, S., HEGUY, A., FENYÖ, D., BOEKE, J.D., BURNS, K. H. (2019). **Transposon insertion profiling by sequencing (TIPseq) for mapping LINE-1 insertions in the human genome.** *Mobile DNA*, 10(1).

SULLIVAN, D. T SULLIVAN, M. C. **Transport Defects as the Physiological Basis for Eye Color Mutants of *Drosophila melanogaster*.** *Biochemical Genetics*, Vol. 13, Nos. 9/10, 1975

SULLIVAN, D. T., BELL, L. A., PATON, D. R., & SULLIVAN, M. C. (1979). **Purine transport by Malpighian tubules of pteridine-deficient eye color mutants of *Drosophila melanogaster*.** *Biochemical Genetics*, 17(5-6), 565–573.

SUN, W., SAMIMI, H., GAMEZ, M., ZARE, H., & FROST, B. (2018). **Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element**

dysregulation in neurodegenerative tauopathies. *Nature Neuroscience*, 21(8), 1038–1048.

SYMONOVÁ, R. SUH, A. **Nucleotide composition of transposable elements likely contributes to AT/GC compositional homogeneity of teleost fish genomes.** *Mobile DNA* (2019) 10:49 1-8.

TREIBER, C. D.; WADDELL, S. (2017) **Resolving the prevalence of somatic transposition in *Drosophila*.** *eLife* 6:e28297

VIJG, J., & SUH, Y. (2013). **Genome Instability and Aging.** *Annual Review of Physiology*, 75(1), 645–668.

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

WOOD, J. G., & HELFAND, S. L. (2013). **Chromatin structure and transposable elements in organismal aging.** *Frontiers in Genetics*, 4.

WOOD, J. G., JONES, B. C., JIANG, N., CHANG, C., HOSIER, S., WICKREMESINGHE, P., ... HELFAND, S. L. (2016). **Chromatin-modifying genetic interventions suppress age-associated transposable element activation and extend life span in *Drosophila*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), 11277–11282.

XING, J. ZHANG, Y. HAN, K. SALEM, A. H. SEN, S. K. HUFF, C. D. ZHOU, Q. KIRKNESS, E. F. LEVY, S. BATZER, M. A. JORDE, L. B. (2009) **Mobile elements create structural variation: Analysis of a complete human genome.** *Genome Research*, 19:1516–1526

YE, M., GOUDOT, C., HOYLER, T., LEMOINE, B., AMIGORENA, S., & ZUEVA, E. (2020). **Specific subfamilies of transposable elements contribute to different domains of T lymphocyte enhancers.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201912008.

7 MATERIAL SUPLEMENTAR

Table 1. Dados brutos e das análises TISseq-Pipe e *Velvet assembly*. Para cada réplica de cada amostra tem-se o número total de *reads*, os *reads upstream* e *downstream* ao elemento *mariner* bem como parâmetros e resultados das análises.

	<i>Reads</i> totais	<i>Reads upstream e downstream</i>		>25nt	Posições Finais TISseq <i>multihit</i>	Posições finais TISseq <i>onehit + multihit</i>	Posições definidas pelo <i>Velvet assembly</i>
Jovem 20°C A	6846 <i>reads</i>	<i>up</i>	2798 <i>reads</i>	2022 <i>reads</i>	134 fragmentos	1529 fragmentos	99 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	2173 <i>reads</i>	1610 <i>reads</i>	103 fragmentos	1205 fragmentos	59 <i>contigs</i>
Jovem 20°C B	11253 <i>reads</i>	<i>up</i>	5370 <i>reads</i>	3708 <i>reads</i>	357 fragmentos	2500 fragmentos	197 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	3442 <i>reads</i>	3022 <i>reads</i>	295 fragmentos	2157 fragmentos	176 <i>contigs</i>
Jovem 20°C C	14055 <i>reads</i>	<i>up</i>	6463 <i>reads</i>	4869 <i>reads</i>	499 fragmentos	3455 fragmentos	323 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	4366 <i>reads</i>	3968 <i>reads</i>	382 fragmentos	2979 fragmentos	256 <i>contigs</i>
Senesc 20°C A	8127 <i>reads</i>	<i>up</i>	2853 <i>reads</i>	2199 <i>reads</i>	170 fragmentos	1513 fragmentos	138 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	2949 <i>reads</i>	2575 <i>reads</i>	199 fragmentos	1978 fragmentos	139 <i>contigs</i>
Senesc 20°C B	12243 <i>reads</i>	<i>up</i>	5030 <i>reads</i>	3073 <i>reads</i>	264 fragmentos	2135 fragmentos	216 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	4602 <i>reads</i>	3847 <i>reads</i>	315 fragmentos	2867 fragmentos	246 <i>contigs</i>
Senesc 20°C C	9591 <i>reads</i>	<i>up</i>	3760 <i>reads</i>	2791 <i>reads</i>	259 fragmentos	1628 fragmentos	171 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	3754 <i>reads</i>	3199 <i>reads</i>	263 fragmentos	2210 fragmentos	167 <i>contigs</i>
Jovem 28°C A	7524 <i>reads</i>	<i>up</i>	2840 <i>reads</i>	2418 <i>reads</i>	161 fragmentos	1945 fragmentos	151 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	2262 <i>reads</i>	2032 <i>reads</i>	111 fragmentos	1651 fragmentos	83 <i>contigs</i>
Jovem 28°C B	10836 <i>reads</i>	<i>up</i>	4764 <i>reads</i>	3990 <i>reads</i>	438 fragmentos	2952 fragmentos	256 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	3485 <i>reads</i>	2978 <i>reads</i>	229 fragmentos	2338 fragmentos	136 <i>contigs</i>
Jovem 28°C C	13747 <i>reads</i>	<i>up</i>	5002 <i>reads</i>	3057 <i>reads</i>	462 fragmentos	1878 fragmentos	44 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	3558 <i>reads</i>	893 <i>reads</i>	102 fragmentos	644 fragmentos	5 <i>contigs</i>

Senesc 28° C A	8897 <i>reads</i>	<i>up</i>	6082 <i>reads</i>	1715 <i>reads</i>	166 fragmentos	597 fragmentos	112 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	1042 <i>reads</i>	929 <i>reads</i>	69 fragmentos	223 fragmentos	203 <i>contigs</i>
Senesc 28° C B	11524 <i>reads</i>	<i>up</i>	7329 <i>reads</i>	2677 <i>reads</i>	372 fragmentos	895 fragmentos	194 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	1307 <i>reads</i>	1025 <i>reads</i>	74 fragmentos	229 fragmentos	195 <i>contigs</i>
Senesc 28° C C	9665 <i>reads</i>	<i>up</i>	5805 <i>reads</i>	2774 <i>reads</i>	369 fragmentos	954 fragmentos	224 <i>contigs</i>
		<i>down</i>	1128 <i>reads</i>	989 <i>reads</i>	40 fragmentos	174 fragmentos	249 <i>contigs</i>

Tabela 2. Dados brutos e das análises das réplicas concatenadas. Para cada amostra tem-se os dados de reads totais, reads upstream e downstream ao elemento *mariner*, reads após filtro e resultados finais.

CONCATENADO						
	<i>Reads</i> totais	<i>Reads</i> upstream e downstream		>25nt	Posições Finais Tlseq <i>multihit</i>	Posições finais TISseq <i>onehit + multihit</i>
Jovem 20°C	32154 <i>reads</i>	<i>up</i>	14631 <i>reads</i>	10599 <i>reads</i>	1268 fragmentos	6450 fragmentos
		<i>down</i>	9982 <i>reads</i>	8600 <i>reads</i>	965 fragmentos	5583 fragmentos
Senesc 20°C	29961 <i>reads</i>	<i>up</i>	11643 <i>reads</i>	8063 <i>reads</i>	814 fragmentos	4540 fragmentos
		<i>down</i>	11306 <i>reads</i>	9621 <i>reads</i>	1005 fragmentos	6171 fragmentos
Jovem 28°C	32107 <i>reads</i>	<i>up</i>	12606 <i>reads</i>	9465 <i>reads</i>	1313 fragmentos	5832 fragmentos
		<i>down</i>	9305 <i>reads</i>	5903 <i>reads</i>	577 fragmentos	4210 fragmentos
Senesc 28° C	30086 <i>reads</i>	<i>up</i>	19219 <i>reads</i>	7166 <i>reads</i>	1570 fragmentos	2880 fragmentos
		<i>down</i>	3477 <i>reads</i>	2943 <i>reads</i>	173 fragmentos	523 fragmentos