



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
HUMANA E MEIO AMBIENTE - PPGSHMA**

Camila Daniela dos Santos Lima

Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para
avaliação do potencial genotóxico do metabólito
secundário de *Serratia marcescens*, a Prodigiosina

Vitória de Santo Antão

2014

Camila Daniela dos Santos Lima

Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para a
avaliação do potencial genotóxico do metabólito
secundário de *Serratia marcescens*, a Prodigiosina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Meio Ambiente.

Orientadora: Dra. Claudia Rohde

Coorientadora: Dra. Mônica Lúcia Adam

Vitória de Santo Antão

2014

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV
Bibliotecária Jaciane Freire Santana

L732e Lima, Camila Daniela dos Santos
Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação do potencial genotóxico do metabólito secundário de *Serratia marcescens*, a Prodigiosina/
Camila Daniela dos Santos Lima. Vitória de Santo Antão: O autor, 2014.
36 folhas, fig.

Orientador: Claudia Rohde.
Co-orientador: Mônica Lúcia Adam
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2014.

1. *Drosophila*. 2. Genética. 3. Metabólito secundário. I. Rohde, Claudia.
Título.

572.8633 CDD (23.ed.) **BIBCAV/UFPE-27/2014**



Dissertação de Mestrado apresentada por **Camila Daniela dos Santos Lima** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* para avaliação do potencial genotóxico do metabólito secundário de *Serratia marcescens*, a *Prodigiosina*", orientada pela Prof.^a Dr.^a Cláudia Rohde, aprovada no dia 29 de agosto de 2014, após cumprimento de exigência determinada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Cristiano Aparecido Chagas
CAV – UFPE

Dr.^a Ana Cristófa Lauer Garcia
CAV – UFPE

Dr.^a Viviane Souza do Amaral
Centro de Biociências – UFRN

Autora

Camila Daniela dos Santos Lima

À minha mãe Dedinha, ao meu pai Mário, aos meus irmãos Mário, Maiara e Naiara, a minha avó Severina e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Não poderia começar a agradecer se não fosse a Aquele que tem o poder de realizar o impossível, pois é assim que vejo o meu Deus. A Ele, pra sempre, toda honra e toda glória, porque maravilhas Ele tem feito em minha vida, quando tudo parecia ser o fim, onde tudo parecia estar perdido, onde a luz já não tinha mais seu brilho intenso, Deus mostrou o seu imenso amor para com a minha pessoa, diante ao desespero em que eu me via, Ele me provou mais uma vez, que Ele, tudo pode, então primeiramente a Ele quero agradecer por tudo, por esse mestrado, pela minha vida.

Em especial, agradeço à Aninha (é assim como a chamo), pois no dia da minha inscrição, ela não permitiu que eu desistisse, pois tudo estava dando errado, e eu já havia, dentro de mim, jogado tudo pro alto, e ela com seu grandioso coração, fez por mim, coisas que nem todo mundo faz, então se eu consegui chegar até aqui, foi porque Ana, não deixou que eu desistisse, a força que ela me deu foi tudo.

Agradeço também especialmente ao meu amigo Jorge, que por ter esse coração tão grande, sempre esteve do meu lado, sem ele eu também não teria chegado aqui, pois Jorge foi meu braço direito, a pessoa que mais me acalmou, mais me aguentou, mais me deu força e que também não deixou que eu desistisse, por muitas vezes me vi em desespero, e foi ele quem sempre me deu a mão, eu sempre costumava brincar com ele, dizendo que eu era toda destrambelhada e ele era todo certinho, por isso a gente dava tão certo, era a dupla dinâmica, não sei como ele suportava o gelo da salinha da molecular, quando eu deixava o ar, em ponto de congelar, mas sei que estamos vivos, nunca vou esquecer os conselhos dele, pedindo pra eu pensar em tudo, antes de fazer qualquer coisa e eu pensei, fiz, e hoje, eu digo; conseguir fazer o Ensaio Cometa com *Drosophila* não foi nada fácil, mas conseguimos, esse mérito, Jorge, é nosso! Obrigada, mas obrigada mesmo, de todo o meu coração.

À Prof^a Claudia Rohde, por ter me aceitado no seu laboratório de pesquisa, por ter me orientado, e dado este grande desafio, de implementar uma técnica nova, que foi de extrema e valiosa importância para minha formação acadêmica.

À Prof^a Mônica, pelo seu extremo carinho comigo (carinho que chego a comparar de uma mãe, pra uma filha), pela sua total dedicação e empenho em todas as etapas de meu trabalho, pela sua orientação, atenção, e em especial pela professora, e pela amiga que ela é, como sempre digo, Mônica, é um anjo que Deus colocou em minha vida.

À Adalva, que por muito tempo fez parte da secretaria da Pós Graduação e que é um ser humano tão precioso, uma grande amiga e de coração perfeito, agradeço por tudo que ela me fez.

À minha família, em especial meus pais, meus irmãos, meus cunhados e a minha avó, que sempre estiveram do meu lado, me apoiando em tudo e sempre fizeram o melhor pra mim, a eles sou eternamente grata, por todo amor e carinho dedicados a mim.

À minha amiga Gleyse, que sempre, desde o comecinho de tudo, está do meu lado, em todas as horas, me apoiando, me ajudando, me dando forças pra continuar, morrendo de rir com minhas histórias, mas que no fundo do coração, sei que está ali torcendo por mim, obrigada hoje, pela amiga que és pra mim, por me aguentar tanto, por me conhecer tão bem, saber o meu temperamento e fazer de tudo por mim; Amigas, cúmplices, irmãs, minha grande e eterna amiga.

À minha amiga, Paloma, por ter me aguentado sempre, no laboratório, ter alegrado os meus dias, pelos risos, pelas cumplicidades, pela força, e pelas ajudas que eu precisei e que ela nunca deixou de me dar.

À Elisângela que me deu todo apoio no aprendizado da metodologia para a realização da técnica do Ensaio Cometa.

Aos meus amigos Jordany e Juliana Arandas, que sempre torceram por mim e que me deram muita força pra fazer esse mestrado.

Aos técnicos, Rafael, Sidicélia e Kelly, que me ajudaram muito, dando suporte quando precisei de vidrarias, reagentes e quando fui analisar as lâminas, fico grata por tudo que me fizeram.

À Jeanne, por ter me cedido a prodigiosina, droga que utilizei em meu trabalho, e por ter me ajudado muito na escrita dessa dissertação, pela sua dedicação e amizade, pela minha pessoa.

Aos docentes do PPGSHMA, os quais contribuíram para a minha formação científica.

Aos órgãos de fomento: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), PROPESQ-UFPE (Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação) e CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior), pelo apoio financeiro da pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo Geral	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1 Prodigiosina	4
1.3.2 A família Drosophilidae e a <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.3.2.1 Caracterização de Drosophilidae	8
1.3.2.2 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudo	10
1.3.3 Genotoxicidade	11
CAPÍTULO 2	13
Artigo 1	13
Genotoxicidade da prodigiosina em <i>Drosophila melanogaster</i>, um modelo animal em estudos genômicos.	13
Resumo	14
2.1 Introdução	15
2.2 Material e Métodos	16
2.2.1 Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
2.2.2 Ensaio de genotoxicidade em <i>Drosophila melanogaster</i>	17
2.2.3 Análise de Dados	18
2.3 Resultados	19
2.4 Discussão	22
2.5 Conclusões	24
2.6 Agradecimentos	24
2.7 Referências	24

4.REFERÊNCIAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	<i>Serratia marcescens</i> em uma placa de cultivo de ágar (Fonte CDC Public Health Image Library, 2014).	5
Figura 1.2	Fórmula do composto prodigiosina (Fonte: SMITHEN <i>et al.</i> , 2013).	5
Figura 1.3	Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> (Fonte: FLYMOVE, 2014).	10
Figura 1.4	Fêmea adulta de <i>D. melanogaster</i> , ovopositando (Fonte: COOKE, 2014).	10
Figura 1.5	Imagem em microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse 80i), com uso de GelRed™, apresentando os nucleóides. Números de 0 a 4 indicam o aumento do dano genômico (fragmentação do DNA), na forma de um cometa. (Fonte: SILVA, 2012).	12
Figura 2.1	Gráfico da análise comparativa (ANOVA) dos Índices de Dano entre os tratamentos com 2, 5 e 10 µM/mL de prodigiosina e o grupo controle, observados em hemócitos de <i>Drosophila melanogaster</i> . Nível de significância $p \leq 0,05$.	20
Figura 2.2	Gráfico da análise comparativa (ANOVA) das Frequências de Danos entre os tratamentos com 2, 5 e 10 µM/mL de prodigiosina e o grupo controle, observados em hemócitos de <i>Drosophila melanogaster</i> . Nível de significância $p \leq 0,05$.	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Evidência de danificação genômica em larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> após 11 dias de exposição a diferentes concentrações de prodigiosina (2, 5 e 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$).	40
Tabela 2	Valores de p obtidos pela análise <i>a posteriori</i> de Tukey para o Índice de Danos e a Frequência de Danos mediante à exposição de hemócitos de <i>D. melanogaster</i> a diferentes concentrações de prodigiosina (2, 5 e 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$).	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
A	Adenina
C	Citosina
D.	Drosophila
DBS	Quebra na dupla fita
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DMSO	Dimetil Sufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
E ₃	Terceiro estágio larval
F ₁	Primeira geração de filhos
FD	Frequência de dano
G	Guanina
G	Grama
HCl	Ácido Clorídrico
ID	Índice de dano
LM	Low meeting (baixo peso molecular)
mA	Mili Ampers
mL	Mili Litros
mm	Mili Molar
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PET	Polietileno
SMART	Teste de Mutação e Recombinação Somática
T	Timina
TRIS	Tris-hidroximetil-amino-metano
V	Volts
µL	Micro Litro

RESUMO

A prodigiosina é um metabólico secundário de *Serratia marcescens* com diversas aplicações farmacêuticas, agrotóxicas e antitumorais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação genotóxica da prodigiosina em células somáticas do organismo-modelo *Drosophila melanogaster*. Esta espécie se destaca por oferecer características semelhantes ao genótipo humano e por ser capaz de proporcionar um ambiente genético seguro e muito bem conhecido para a observação do possível efeito danoso (potencial genotóxico) da Prodigiosina. Foram analisados hemócitos obtidos das larvas de *D. melanogaster*, em terceiro estágio de desenvolvimento, expostas ao metabólito adicionado ao meio de cultivo, nas concentrações de 2, 5 e 10 μ M/mL. O Ensaio Cometa foi empregado para a avaliação dos danos genômicos nas células da hemolinfa, que ocorreu em todas as concentrações testadas. Duas abordagens diferentes foram empregadas para a avaliação dos resultados: a suposta ação seletiva da prodigiosina, sobre células normais; e a ação inseticida da mesma. Com relação à ação genotóxica em ambas as abordagens, a prodigiosina se mostrou um potente agente de danos genômicos.

Palavras-Chave: Hemolinfa, danos genômicos, eletroforese de célula única.

ABSTRACT

The prodigiosin is a secondary metabolite of *Serratia marcescens* with various pharmaceutical, agrototoxic and antitumor applications. This study aimed to evaluate the genotoxicity of prodigiosin in somatic cells of the model organism *Drosophila melanogaster*. This species is distinguished by offering similar features to the human genotype and be able to provide a safe and genetic well known environment for the observation of possible harmful effect (genotoxic effect) of Prodigiosin. Hemocytes obtained from *D. melanogaster* larvae in the third stage of development, were exposed to the metabolite added to the culture medium at concentrations of 2, 5 and 10 μ M/mL. The Comet Assay was used to assess the genomic damage in the cells of the hemolymph, which occurred at all concentrations tested. Two different approaches were used for the evaluation of the results: the alleged selective action of prodigiosin on normal cells; and their insecticide action. With respect to genotoxicity in both approaches, the prodigiosin showed as a potent agent of genomic damage.

Keywords: Hemolymph, genomic damage, single-cell electrophoresis.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

Existe um rico patrimônio genético mundial e o Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta (CALIXTO, 2003). Nos dias atuais, essa diversidade se traduz em um valor econômico e estratégico inestimável em várias atividades, com destaque para as potencialidades no desenvolvimento de novos fármacos, especialmente aqueles obtidos, direta ou indiretamente, a partir de produtos naturais (CRAGG *et al.*, 1997; DE SMET, 1997; PANDEI, 1998; VERPOORT, 1998; SHU, 1998; HARVEY, 2000; CALIXTO, 2003). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica foram desenvolvidos de fontes naturais, sendo 25% oriundos de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. No caso das drogas anticancerígenas e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual advindo de produtos naturais, atinge cerca de 70%. As descobertas destes produtos possibilitaram à indústria farmacêutica desenhar drogas não só dotadas de maior seletividade, como também de maior eficiência no combate a várias patologias de grande complexidade (CALIXTO, 2003).

Existem várias vantagens que justificam o uso de produtos naturais também como pesticidas. Entre elas está o fato de terem, muitas vezes, um tempo de vida mais curto do que compostos sintéticos, o que reduz o impacto ambiental pelo seu uso prolongado. Os custos envolvidos com a regulamentação da sua produção são também muito menores, se comparados ao custo de um produto químico sintético. (CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M., 1997)

De acordo com o Portal do Agronegócio (2014), os pesticidas naturais são fontes de novos modos de ação e de novos produtos químicos, bem mais aceitos pelo público consumidor. Além disso, possuem atividade biológica mais específica de combate. O isolamento e identificação destes compostos, entretanto, foi uma tarefa árdua no passado. Mas graças à instrumentação moderna, seu isolamento tem sido simplificado e seus custos de produção, reduzidos. E com as novas metodologias, entre elas a biotecnologia, novos pesticidas naturais têm sido descobertos a cada ano.

Muitas empresas envolvidas nestas descobertas pesticidas são da indústria farmacêutica, que tem feito um esforço para a criação de produtos à base de compostos naturais. Os efeitos adversos advindos do uso abusivo de agroquímicos podem ser

atenuados com a utilização de produtos naturais, entre eles os extraídos de plantas e/ou fontes minerais. As características benéficas destes tipos de pesticidas são devidas a sua maior seletividade, baixa toxicidade para o homem, e maior eficiência no controle de várias espécies de ácaros e insetos (CHAGAS *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2008).

Nesta abordagem, um destaque tem sido dado aos compostos de origem metabólica microbiana (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2014) como agentes pesticidas, no controle de insetos vetores e pragas. E é neste grupo que se enquadra a prodigiosina, um alcaloide e metabólito secundário produzido pela bactéria *Serratia marcescens*. Este composto, de cor vermelho natural, possui diversas atividades biológicas, não só pesticidas e antimalarial, mas também antitumoral e antimicrobiana (ASSANO *et al.*, 1999; PATIL *et al.*, 2011; PATIL *et al.*, 2012; VENIL *et al.*, 2013). Sua ação no campo da indústria, da saúde e do meio ambiente (PATIL *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2012; VENIL *et al.*, 2013) se deve à sua caracterização química planar, que permite a sua intercalação na molécula de DNA, levando a danos genômicos que comprometem a viabilidade celular e à morte (MONTANER *et al.*, 2005; GURYANOV *et al.*, 2013).

Neste trabalho, foi investigado o potencial mutagênico da prodigiosina, através de um estudo de células somáticas da espécie *Drosophila melanogaster* e do Ensaio Cometa, duas abordagens ainda pouco divulgadas na literatura, porém bastante promissoras.

A pequena mosca *Drosophila melanogaster* está entre os organismos-modelos de estudos recentes na área mutagênese e da toxicologia, considerada um possível substituto de animais superiores em testes laboratoriais (FESTING *et al.*, 1998; BENFORT *et al.*, 2000; SIDIQUE *et al.*, 2005; RAND, 2010). Este inseto pertence à família Drosophilidae, composta por mais de 4.200 espécies, distribuídas em diversos gêneros (BÄCHLI, 2014). Entre eles, o mais estudado e especioso é o gênero *Drosophila*, para o qual são conhecidas mais de 1.180 espécies, entre as quais a *Drosophila melanogaster* é, sem dúvida alguma, a mais bem estudada do gênero e uma dos organismos mais investigados pela ciência, em todo o mundo. As publicações científicas com este organismo-modelo são incontáveis, com destaque nas áreas da genética, ecologia, taxonomia, evolução, fisiologia, comportamento, desenvolvimento, biologia molecular e, como mencionado, na área da mutagênese (GRIMALDI, 1990; RUBIN, LEWIS 2000; REMSEN, O'GRADY, 2002; FERVEUR, 2003; DROSOPHILA 12 GENOMES CONSORTIUM, 2007; SCHAEFFER *et al.*, 2008, RAND, 2010, SHUKLA *et al.*, 2011).

Drosophila melanogaster tem sido recomendada como organismo para testes e pesquisas inclusive pelo Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM,

European Centre for the Validation of Alternative Methods), conforme destacam Festing et al. (1998) e Benfort et al. (2000). E, de fato, nos últimos anos *Drosophila* tem se tornado um organismo-modelo também em estudos toxicológicos (GAIVAO et al., 1999; KAR CHOWDHURI et al., 2001; NAZIR et al., 2003 a, b; MUKHOPADHYAY et al., 2004).

Estudos mais tradicionais têm utilizado *Drosophila melanogaster* em testes de mutação e recombinação somática, o teste SMART (Somatic Mutation And Recombination Test), uma metodologia descrita na década de 1980 pelo pesquisador Ulrich Graf (GRAF et al., 1984), que permite visualizar fenótipos alterados na forma do pelo da asa de indivíduos adultos, tratados com compostos de interesse na sua fase larval. Desde então, diversos estudos têm utilizado a espécie no teste SMART para detectar do potencial mutagênico, ou antimutagênico, de diversos compostos, nas suas mais diversas formas (extratos, óleos, vapor, compostos sintéticos ou naturais etc). A única premissa do teste é que o composto seja capaz de ser metabolizados pela larva, interagindo assim, com o núcleo e material genético das células (ANDRADE, LEHMANN, 2003).

Mais recentemente *D. melanogaster* tem sido utilizada também para aplicação de Ensaio Cometa (MUKHOPADHYAY et al., 2004; SIDDIQUE et al., 2005; CARMONA et al., 2011; SHARMA et al., 2011) e as possibilidades de seu uso como organismo-modelo na área da mutagênese, se ampliaram ainda mais.

O Ensaio Cometa é uma das várias metodologias que podem ser empregadas para a avaliação da danos genômicos de diversas etiologias (SPONCHIADO et al., 2011; ADAM et al., 2013; HAJISHARIFI et al., 2014; CAPPOEN et al., 2014; DE ANDRADE et al., 2014). É também conhecido como eletroforese de célula única, um método sensível e versátil para medir a quantidade de quebras simples ou duplas na molécula do DNA na célula, em um meio alcalino.

A metodologia do Ensaio Cometa foi desenvolvida por Ostling e Johanson (1984), mas logo em seguida foi modificada por Singh et al. (1988), que otimizaram a desnaturação do DNA, permitindo uma avaliação de quebras de fitas-simples e locais álcali lábeis (TICE et al., 2000). Basicamente, as células obtidas dos organismos tratados são sobrepostas em lâminas de vidro, cobertas com agarose, e submetidas a um processo de lise, que permite que as membranas celulares sejam rompidas e que o DNA ligue-se à matriz celular. A partir desta exposição, o material genético assume a forma de uma célula, denominado de “nucleóide” (UMBUZEIRO, ROUBICEK, 2006). Este nucleóide é submetido a uma eletroforese que permite que seu conteúdo migre em direção ao ânodo do aparato de eletroforese. Através de um microscópio de luz fluorescente pode ser visualizada uma

“cauda”, que lembra a cauda de um cometa, indicativa da frequência e da intensidade dos danos causados ao DNA.

1.2 OBJETIVO

1.2.1. Objetivo geral

Analisar o potencial genotóxico *in vivo* do metabólito secundário de *Serratia marcescens*, a prodigiosina, utilizando a metodologia do Ensaio Cometa no organismo modelo *Drosophila melanogaster*.

1.2.2. Objetivos específicos

- i) Avaliar a ação genotóxica de diferentes concentrações da prodigiosina em células somáticas da hemolinfa de larvas de *Drosophila melanogaster*.
- ii) Avaliar a ação genotóxica de diferentes concentrações da prodigiosina em hemócitos de *D. melanogaster*, com enfoque na sua atuação como um agente inseticida.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Prodigiosina

O interesse pela segurança humana e pela conservação ambiental tem resultado em diversas pesquisas na busca de novos compostos naturais que apresentem uma potencial variedade de aplicações, sem, entretanto, apresentar riscos à saúde e ao meio ambiente (VENIL *et al.*, 2013). De acordo com a “Tecnologia Verde”, produtos menos tóxicos e de origem natural são mais favoráveis para as linhas de produção atuais, ao contrário dos compostos sintéticos, muitos deles proibidos por apresentarem um potencial elevado de carcinogenicidade e acumulação de seus resíduos no ecossistema (VENIL *et al.*, 2013).

Entre os microrganismos, as bactérias apresentam um imenso potencial para produzir diversos bioprodutos ou, produtos naturais (JOSHI *et al.*, 2003; VENIL,

LAKSHMANAPERUMALSAMY, 2009; AHMAD *et al.*, 2012). Inúmeras pesquisas, realizadas nas últimas décadas, têm ressaltado as vantagens da utilização de produtos naturais (HENDRY *et al.*, 1997; DEMAIN *et al.*, 1980; BABITHA *et al.*, 2009). Entre seus benefícios, vantagens e interesses para a ciência estão sua ampla gama de atividades, alta versatilidade e produtividade, fácil cultivo e manipulação gênica, fermentação mais rápida e produtiva em comparação com qualquer outro processo químico, mínimo custo operacional.

Serratia marcescens (**Figura 1**) é uma bactéria que produz um pigmento vermelho natural (um alcaloide) chamado prodigiosina (5[(3-metoxi-5-pirrol-2-ilideno-pirrol-2-ilideno)-metil]-2-metil-3-pentil-1Hpirrole). Esta molécula pertencente à família das Prodigininas, e é composta por três anéis que formam um esqueleto pirrolil-pirrol-metano com o grupo metoxi C-4, resultando em uma molécula planar, com fórmula molecular $C_{20}H_{25}N_3O$ (**Figura 2**), de peso molecular 323,44 daltons (SONG *et al.*, 2006; WILLIAMSON *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2011).



Figura 1. *Serratia marcescens* em uma placa de cultivo de ágar. (Fonte CDC Public Health Image Library, 2014).

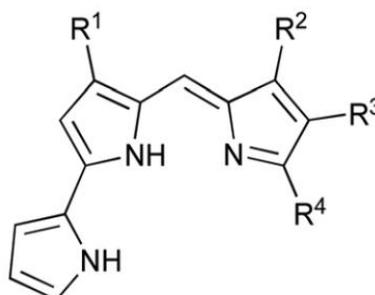


Figura 2. Fórmula do composto prodigiosina.(Fonte: SMITHEN *et al.*, 2013).

O interesse industrial, ambiental, médico e farmacológico do metabólito prodigiosina vem aumentando ao longo dos anos, devidos aos diversos estudos descrevendo seus

mecanismos de ação antibacteriana, antifúngica, antimalárica, algicidas, imunossupressoras e, mais recentemente, antitumoral (CLIFT, THOMPSON, 2009; KALIVODA, 2010).

A atividade específica antitumoral da prodigiosina é evidenciada pela indução da apoptose em uma ampla variedade de linhagens celulares tumorais. Seu efeito pró-apoptótico é seletivo contra as células malignas, independentemente da ativação do gene p53 ou da resistência a multidroga. Esta característica faz da prodigiosina um promissor agente anticâncer (BEATRIZ *et al.*, 2000; MONTANER, PÉREZ-TOMÁS, 2001; SKORSKI, 2002; CAMPAS *et al.*, 2003; MONTANER *et al.*, 2005; PALCHAUDHURI, HERGENROTHER, 2007; P ANDEY *et al.*, 2009; PÉREZ-TOMÁS, VIÑAS, 2010; CHANG *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2012; HSIEH *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que a prodigiosina é comprovadamente um agente indutor de quebras na dupla-fita de DNA, em parte devido a sua ação como inibidor duplo das topoisomerasas I e II (MONTANER *et al.*, 2005). Essa inibição é uma consequência da ligação por intercalação da prodigiosina no sulco menor da dupla fita de DNA, preferencialmente em regiões de sequências de bases do DNA alternadas (AT-GC), via pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas e de van der Waals (MELVIN *et al.*, 1999; MONTANER *et al.*, 2005, ROOS, KAINA, 2006). Em contato com o DNA, a prodigiosina cliva a molécula numa reação de oxidação dependente de Cobre (Cu). Nesta reação, o anel A-pirrole e a cadeia alquílica no C-anel desempenham papéis fundamentais na atividade nucleásica da prodigiosina (MELVIN *et al.*, 2001; MANDERVILLE, 2001; MONTANER *et al.*, 2005).

A inibição de ambas as topoisomerasas pela prodigiosina induz quebras na fita simples de DNA e/ou na dupla fita, tanto *in vivo* quanto em células em cultura (MONTANER *et al.*, 2005). Convém ressaltar que, de todos os tipos de danos possíveis no DNA da célula, provavelmente, as mais prejudiciais são as quebras na dupla fita (DBS), podendo uma única DBS levar à morte celular, se esta quebra inativar genes essenciais ou ativar genes apoptóticos (KHANNA, JACKSON, 2001).

Assim, agentes topoisomerase-direcionados, que resultam em danos genômicos, podem desencadear também uma cascata de sinalização, capaz de levar à suspensão do ciclo celular, para que o reparo das lesões e/ou morte celular ocorra (MONTANER *et al.*, 2005; ROOS, KAINA, 2006). Este mesmo princípio pode ser aplicado à possível ação inseticida e larvicida já demonstrada para a prodigiosina.

Pesticidas, quando usados corretamente, causam pouco impacto adverso no meio ambiente (CASSAL *et al.*, 2014). Mas se o contrário acontecer, e o pesticida for utilizado

indiscriminadamente, sem as devidas precauções e cuidados, pode por em risco não só o meio ambiente como também a saúde humana, já que traços de resíduos de pesticidas presentes no solo, água, ar e alimentos podem ser perigosos.

Embora o maior consumo de pesticidas ocorra nos países desenvolvidos, grande parte dos envenenamentos e das mortes causadas por agroquímicos ocorre nos países em desenvolvimento, como o Brasil, onde são preocupantes os quadros de contaminação humana e ambiental. Acredita-se que essa realidade possa estar associada à utilização exacerbada desses produtos (CASSAL *et al.*, 2014).

O Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos xenobióticos, ficando atrás somente do Japão e dos Estados Unidos (DAMS, 2006). Nosso país está entre os oito maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (CASSALS *et al.*, 2014) e há três anos, ocupa o primeiro lugar no *ranking* de consumo bruto de agrotóxicos (ORTIZ, 2012). Segundo o Dossiê Abrasco (2012), a superação deste problema seria por meio da conversão do modelo agroquímico/tradicional e mercantil para um modelo de base agroecológica. Neste sentido, a produção de bioprodutos tomaria a frente dos pesticidas sintéticos, minimizando o efeito destes últimos (ASANO *et al.*, 1999; PATIL *et al.*, 2011; PATIL *et al.*, 2012).

Particularmente, em relação à prodigiosina em estudos com *Drosophila*, Liang *et al.* (2013) investigaram a atividade inseticida dos corantes alimentares em larvas de *Drosophila*, demonstrando que a prodigiosina pode ser útil para o desenvolvimento de biopesticidas, pois a mesma apresentou potencial tóxico para as larvas.

Não só o metabólito secundário (prodigiosina), mas também a própria *Serratia marcescens* pode ser efetiva no controle de insetos, uma vez que esta bactéria é um entomopatógeno oportunista e persistente no canal alimentar de insetos. A sua presença e liberação de metabólitos são a provável causa da mortalidade dos insetos (INGLIS, LAWRENCE, 2001). Patil *et al.* (2012) mostraram o potencial larvicida de *S. marcescens* em larvas de quatro estágios de desenvolvimento de *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*. A cepa *Serratia* SV6 mostrou maior atividade contra *Culex quinquefasciatus* (100%), seguido de *Anopheles stephensi* (95%) e *Aedes aegypti* (91%) após 48 horas de exposição. A mortalidade relativa de todos os tratamentos após 12h mostrou toxicidade variada no que diz respeito ao tempo de exposição, ao tratamento bacteriano e às espécies avaliadas.

Além da aplicação inseticida, a prodigiosina testada em organismos de diferentes espécies, como bactérias, fungos e protozoários, revelou uma ampla gama de atividade

inibitória sobre os mesmos (DEMAIN, 1995). Mas apesar dos diversos estudos com a prodigiosina, pouca atenção tem sido dada ao seu possível efeito genotóxico. A seletividade quanto ao seu uso como um antitumoral é questionável, apesar de alguns estudos não revelarem efeitos genotóxicos deste composto em células sanguíneas de camundongos (Teste do Micronúcleo) e *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) (GURYANO *et al.*, 2013).

Para o melhor esclarecimento da ação da prodigiosina como um agente genotóxico, devem-se levar em consideração algumas premissas:

1. As diferentes respostas célula-específicas ao estímulo da prodigiosina (LU *et al.*, 2012).
2. A história evolutiva dos sistemas de reparo nos diferentes organismos que levaram à variação intraespecífica e interespecífica dos mesmos (ARAVIND *et al.*, 1998; KUMAR *et al.*, 2013; KIENZLER *et al.*, 2013)
3. O estágio de desenvolvimento do organismo (PATIL *et al.*, 2011).

Tendo em vista tais premissas em novos estudos com a prodigiosina, considerações poderão ser feitas para o esclarecimento da sua ação e suas diversas aplicações.

1.3.2 A família Drosophilidae e a *Drosophila melanogaster*

1.3.2.1 Caracterização de Drosophilidae

A família Drosophilidae é um grande grupo dentro da Ordem Diptera, classe Insecta. É composta por pelo menos 4.200 espécies, as quais ocorrem em praticamente todo o globo, nos mais distintos tipos de ambientes (BÄCHLI, 2014). Dentro desta família, o gênero *Drosophila*, com 1.180 espécies (BÄCHLI, 2014) é o mais diverso e estudado (DROSOPHILA 12 GENOMES CONSORTIUM, 2007; VICARIO *et al.*, 2007; SCHAEFFER *et al.*, 2008; RAND, 2010; SHARMA *et al.*, 2011).

Os pequenos insetos que compõem a família Drosophilidae são popularmente chamados de “moscas do vinagre”. Estes organismos se destacam como excelentes modelos biológicos para os mais diversos tipos de estudos, uma vez que apresentam pequeno porte, são facilmente coletados na natureza, tem ciclo de vida curto - o que favorece a obtenção de muitas gerações em um curto espaço de tempo – são facilmente mantidos e manipulados em laboratório (POWELL, 1997). Várias espécies desta família já

têm seu genoma totalmente sequenciado (DROSOPHILA 12 GENOMES CONSORTIUM, 2007) e são muitos os estudos na área da genética e a genômica.

Entre os drosofilídeos, nenhum é mais conhecido do que *D. melanogaster*, a qual vem sendo estudada desde o início dos anos 1900 pelo famoso grupo do pesquisador Thomas H. Morgan, sendo a primeira a ter seu genoma totalmente sequenciado (ADAMS *et al.*, 2000). Esta espécie pertence ao Filo Arthropoda; Classe Insecta; Subclasse Pterygota; Ordem Diptera; Família Drosophilidae e Gênero *Drosophila*. Tem uma estrutura genética relativamente simples, com genoma distribuído ao longo de quatro diferentes cromossomos (X, 2, 3 e 4) que, no total, contêm aproximadamente 13.600 genes, praticamente a metade do número de genes conhecidos em humanos (ADAMS *et al.*, 2000).

D. melanogaster apresenta o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça, distinguem-se as antenas, os olhos e as peças bucais; no tórax (constituído por três segmentos) apresenta 3 pares de patas; no abdômen, possui uma nítida segmentação e é este que constitui seu centro de nutrição (PEREIRA *et al.* 2008).

O ciclo de vida da *D. melanogaster* (**Figura 3**) é bastante rápido em relação a outras espécies de drosofilídeos. Passa por uma fase de ovo, a partir da qual decorre a embriogênese, em cerca de 24 horas. Eclode então uma 1ª forma larval que, ao fim de um dia, muda de cutícula e se transforma em uma larva de 2ª fase. Decorrido mais um dia, a larva muda novamente de cutícula e passa para a 3ª fase, quando seu tamanho aumenta significativamente, ao longo de três dias. Neste período desenvolvimental, a larva deixa de escavar galerias no meio de cultivo semissólido e tem tendência a fugir da umidade, deslocando-se para zonas mais secas. A partir daí, começa a ficar imóvel, segrega uma cutícula espessa e forma uma espécie de casulo denominada pupa.

Durante a fase de pupa, que demora cerca de cinco dias, ocorre metamorfose, a qual envolve a degradação de praticamente todos os tecidos larvais e a proliferação significativa dos discos imaginiais. Estes são pequenos grupos de células, até então indiferenciados, que irão originar as estruturas do adulto (também conhecido por imago).

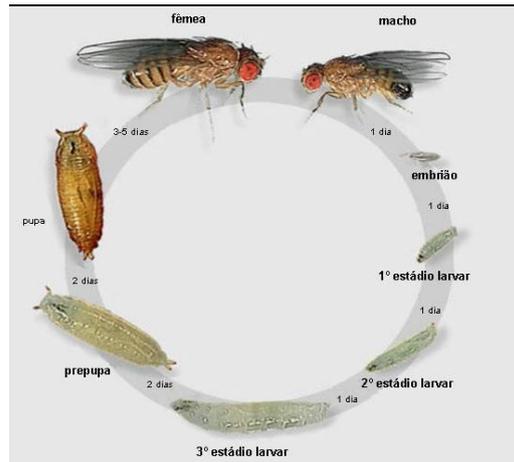


Figura 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Fonte: FLYMOVE, 2014).

Da pupa eclode o indivíduo adulto, que atinge a maturidade sexual ao fim de 12 horas e que tem uma expectativa média de vida de 60 dias. Os adultos eclodem pouco pigmentados, e, só ao fim de algumas horas, é que se tornam óbvias a coloração acastanhada do corpo e o padrão de listas escuras dos segmentos abdominais (**Figura 4**).



Figura 4. Imagem de fêmea adulta de *Drosophila melanogaster*, ovopositando (Fonte: COOKE, 2014).

1.3.1.2 *Drosophila melanogaster* como modelo de estudo biológico

Espécies do gênero *Drosophila* têm sido utilizadas como organismos-modelo em várias áreas de estudo pelas inúmeras vantagens, como a grande fertilidade (capacidade de produção de centenas de ovos por apenas uma fêmea) e o curto tempo entre a fecundação e o nascimento dos descendentes, que em uma temperatura amena, entre 22 e 25°C, se dá em apenas duas semanas. Isso facilita muito o acompanhamento das etapas de desenvolvimento dos espécimes, das análises e efeitos dos experimentos aplicados, ao longo de várias gerações, além da manutenção de espécies e populações diferenciadas, em condições de laboratório. O cultivo de drosófila permite que, em um único ano, sejam analisadas 25 gerações (GOMES, 2001; ROHDE, 2012).

A drosófila apresenta várias vantagens para a análise genética, quer no nível da investigação científica avançada, quer como modelo de ensino dos princípios básicos da hereditariedade. Cruzando indivíduos que diferem em características facilmente visíveis (tais como o tamanho das asas e a cor dos olhos ou do corpo) e estendendo esta análise até aos seus netos (F2), é possível determinar, ao final de um mês, quantos genes estão envolvidos, quais os alelos dominantes e os recessivos e se o padrão de herança está, ou não, ligado ao sexo (GOMES, 2001).

A drosófila é a sucessora direta das ervilhas de Gregor Mendel, naturalista que, na segunda metade do século XIX, estabeleceu a ideia básica da genética moderna: de que as características de cada indivíduo são transmitidas de pais para filhos por "fatores", hoje chamados de genes. Os pesquisadores calculam que, em um século de dinastia, as drosófilas tenham dado motivos para que se escrevessem mais de 100.000 artigos científicos até o ano de 2005 (VENTUROLI, 2005).

A drosófila também têm sido muito utilizada como modelo biológico para testes de toxicidade de praguicidas (NARCISO, NAKAGAWA, 2009), como bioindicadora na avaliação da letalidade de extrato de *Nicotiana tabacum* (MORATORE *et al.*, 2009), como avaliador do efeito tóxico-genético do própolis em suas próprias células somáticas (OLIVEIRA *et al.*, 2007), na detecção de inseticidas por bioensaio (HIRATA *et al.*, 2002), no potencial tóxico-genético dos larvicidas dilapiol e espinosade (ACIOLE *et al.*, 2014) e em tantos outros estudos (ANDRADE, LEHMANN, 2003; RAND, 2010; SHARMA *et al.*, 2011).

1.3.3 Genotoxicidade

A genética toxicológica tem centrado suas investigações no uso de diferentes bioensaios capazes de detectar mutações pontuais e mutações cromossômicas de diversos compostos (RICHARD, 1994). Nesse sentido, estimativas da significância do potencial genotóxico de um agente devem envolver métodos estatísticos de avaliação, identificando ao máximo possível as variáveis e parâmetros utilizados (LAU, 1998).

Dentre as diferentes metodologias o Ensaio Cometa é um dos mais utilizados. Conhecido também como eletroforese de célula única é um método muito sensível para a detecção de danos genéticos induzidos por diferentes agentes genotóxicos, com ampla variedade de aplicações, incluindo biomonitoramento humano, monitoramento ecológico e como ferramenta de investigação de danos ao DNA e reparo em diferentes tipos celulares submetidos a agentes nocivos (TICE *et al.*, 1990; HARTMANNAND *et al.*, 1994; GUILLAME *et al.*, 2004; ADAM *et al.*, 2005; CREBELLI *et al.*, 2002; COLLINS, 2008; BHALLI *et al.*,

2009; ADAM *et al.*, 2010; SPONCHIADO *et al.*, 2011; RAGUGNETTI *et al.*, 2011; ADAM *et al.*, 2011; ADAM *et al.*, 2013).

A metodologia se baseia na análise de células em lâminas, cobertas por agarose e submetidas a um processo de lise. Esta etapa viabiliza a ruptura das membranas celulares e a ligação do DNA à matriz celular, formando um “nucleóide” (UMBUZEIRO, ROUBICEK 2006). Este nucleóide é submetido a uma eletroforese que permite que seu conteúdo danificado migre, formando uma cauda, cuja forma e tamanho é indicativa da frequência e da intensidade dos danos causados ao DNA (que são classificados em ordem crescente, de 0 a 4) (**Figura 5**).

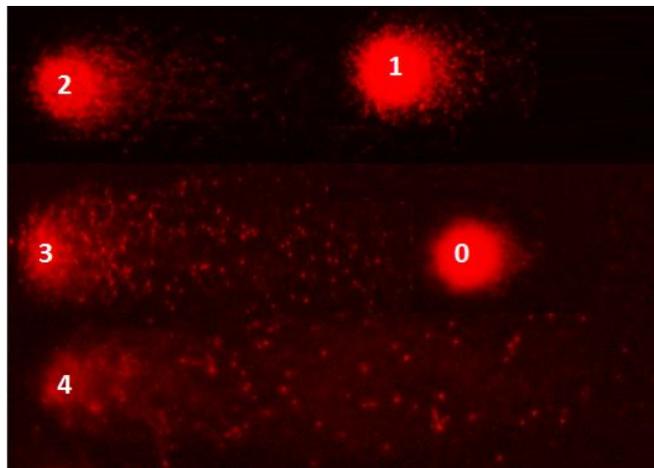


Figura 5. Imagem em microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse 80i), com uso de GelRed™, apresentando os nucleóides. Números de 0 a 4 indicam o aumento do dano genômico (fragmentação do DNA), na forma de um cometa. (Fonte: SILVA, 2012).

Em testes de mutagenicidade, *D. melanogaster* é bastante aceita como modelo biológico experimental (HOFFMANN, 2003; VAN HEERWAARDEN, HOFFMANN 2007; RAND, 2010), especialmente na aplicação do teste de mutação e recombinação somática - SMART (GRAF *et al.* 1984). Além de seu genoma ter sido totalmente sequenciado e anotado na última década e meia, a espécie também realiza diversas reações de ativações metabólicas semelhantes as que acontecem no fígado dos mamíferos (SOBELS, VOGEL, 1976). Poucos estudos, entretanto, utilizam *D. melanogaster* especificamente no Ensaio Cometa. Mukhopadhyay *et al.* (2004) desenvolveu estudos com gânglios cerebrais e com o intestino médio de larvas de *D. melanogaster*, expostas ao agente genotóxico cipermetrina piretróide sintética, como resultado observou-se aumento significativo de danos no DNA tanto das células cerebrais, como das intestinais. Carmona *et. al* (2011) avaliou a atividade

genotóxica do chumbo em hemócitos de larvas de *D. melanogaster* através do ensaio cometa e do teste da asa-spot, como resultado, o teste da asa-spot mostrou que nenhum composto de chumbo utilizado induziu aumento significativo na frequência de manchas mutantes, já, através do ensaio cometa houve um aumento significativo de danos ao DNA com um padrão dose-resposta direta. Estes testes confirmam que o modelo *in vivo* de *D. melanogaster* é um indicador eficaz para testes de mutagenicidade. De acordo Siddique *et al.* (2005) o uso mais amplo de *Drosophila* na mutagênese, em substituição aos ratos e camundongos, seria ideal e poderia resolver uma série de impasses bioéticos do uso destes animais em testes tóxico-genéticos.

CAPÍTULO 2

Artigo 1

Genotoxicidade da prodigiosina em *Drosophila melanogaster*, um modelo animal em estudos genômicos

Lima, C.D.S^{1,2}; Verçosa, C. J²; Lapenda, J.C.L³; Rohde, C², Adam, M.L⁴.

1. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente - Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco- Brasil.
2. Laboratório de Genética - Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco – Brasil.
3. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco - Brasil.
4. Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental - Universidade Federal de Pernambuco - Brasil.

Autor para correspondência:

*Jeanne Cristina Lapenda Lins, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife-PE, Brasil. Fone.: 81-2126 8346; Ramal: 207 ou (81) 8859 4299.
E-mail: jeannecantalice@gmail.com

Resumo

A prodigiosina é um pigmento vermelho natural produzido pela bactéria *Serratia marcescens* que pertence a família das prodigininas. Este metabólito secundário é caracterizado quimicamente como sendo um alcaloide de fórmula molecular $C_{20}H_{25}N_3O$ cujo peso molecular é igual a 323. Nos últimos anos, tem sido observados muitos estudos sobre este pigmento devido as suas diversas atividades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica, antimalárica, algicida e antitumoral sendo observados efeitos apoptóticos e genotóxicos em linhagens celulares tumorais. Com base no descrito acima o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito genotóxico da prodigiosina em *Drosophila*

melanogaster. Inicialmente, foram realizados cultivo in vitro de *D. melanogaster* (macho e fêmea) para posterior acasalamento e obtenção das larvas. Os organismos adultos foram incubados por 11 dias a 30°C juntamente com a adição da prodigiosina em diferentes concentrações (2 µM, 5 µM e 10 µM/mL) em meio de cultura complexo. Em seguida, foram retiradas as larvas onde estas foram lavadas e separadas para posterior extração da hemolinfa e isolamento dos hemócitos. Após a obtenção dos hemócitos, foi realizado o ensaio de genotoxicidade, ensaio cometa. Foram observados significativos efeitos genotóxicos para a prodigiosina em *D. melanogaster*, evidenciado pelo índice de dano (ID), (quantificação de cada nível de dano observado) e frequência de dano (FD), (quantificação total de células danificadas independente do nível de dano), observados em todos os tratamentos. Contudo, o mesmo comportamento não foi observado para alguns grupos de *D. melanogaster* para os quais observou-se que na concentração de 10 µM/mL houve uma significativa diminuição do ID e FD, sugerindo a resistência destes grupos estudados. Efeitos citotóxicos foram evidenciados pela observação da retardo do desenvolvimento larval, os quais no ciclo de vida da *Drosophila* são obtidas larvas no terceiro estágio larval no período de 6 dias após a exposição do adulto ao meio, já com a prodigiosina esse período foi retardado, vindo a apresentar indivíduos neste estágio larval após 11 dias de exposição. A prodigiosina é um agente genotóxico indutor de danificação direta ao DNA nuclear de *Drosophila melanogaster* e ainda, age, interferindo no ciclo biológico celular induzindo retardos do desenvolvimento larval. Assim, as evidências dos efeitos genotóxicos observados nos hemócitos de *D. melanogaster*, aqui demonstrados, sugerem a necessidade de maiores investigações sobre os reais efeitos da prodigiosina em células normais, para melhor assegurar a eficiência seletiva desta droga como um agente antitumoral.

Palavras-Chaves: Hemócitos; Ensaio cometa; Larvas

2.1 Introdução

A prodigiosina é um pigmento vermelho natural produzido pela bactéria *Serratia marcescens*. Este trata-se de um alcalóide de estrutura química (**Figura 1**) correspondente a $C_{20}H_{25}N_3O$ e peso molecular de 324 g/mol. Este pigmento vermelho pertencente à família das prodigininas, cujos membros apresentam em comum três anéis pirróis em sua estrutura química (Guryanov et al., 2013). Devido às suas diversas propriedades biológicas, tais como antimicrobianas, algicida, antitumoral induzindo apoptose em linfócitos T e B, antimalarial, antitripanossomídeo, efetividade no controle biológico de pragas e ainda o seu emprego como pigmento para tingir tecidos, látex e plásticos como o polietileno (PET), a prodigiosina

tem despertado o crescente interesse pela sua potencial utilização nas diversas áreas como médica, farmacêutica, ambiental e industrial (Campás et al., 2003; Montaner et al., 2005; Pérez-Tomáz and Viñas, 2010; Genes et al., 2011; Lu et al., 2012; Venil et al., 2013).

Bactérias do gênero *Serratia* sp, produtoras de prodigiosina, podem ser encontradas oportunamente colonizando, de forma patogênica, o trato gastrointestinal de insetos das ordens Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Diptera e, desta forma, induzir efeito citotóxico (Sikorowski et al., 2001). Rahul et al. (2014) demonstraram a citotoxicidade da prodigiosina em insetos da ordem Lepidoptera, família Noctuidae.

A propriedade antitumoral da prodigiosina tem se destacado entre as pesquisas devido à sua ação específica e direcional às células tumorais. Estudos têm relatado pouca toxicidade da prodigiosina para as células normais, conferindo, assim, grande vantagem para a utilização desta droga como um agente anticâncer (Pandey et al, 2009; Pérez-Tomás e Viñas, 2010; Hsieh et al, 2012).

Um outro gênero de insetos bastante estudado é o *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) no qual destaca-se a espécie *D. melanogaster*, por ser um modelo animal empregado, há muito tempo, em estudos de transmissão dos caracteres hereditários, ligações cromossômicas, efeitos genéticos das radiações, interações genéticas, aberrações cromossômicas e mudanças evolutivas em populações (Freire-Maia e Pavan, 1949; Strickberger, 1962; Powell, 1997; Schaeffer et al, 2008; Singh et al, 2013; Lee et al, 2014; Lavington et al, 2014; Campos et al, 2014). Mais recentemente, o gênero *Drosophila* vem contribuindo também como modelo para estudos de comportamento, desenvolvimento e doenças humanas (Ferveur 2003), além de modelo para estudos inovadores de genômica (Rubin & Lewis 2000, Clark et al 2007) e estudos filogenéticos (Grimaldi 1990, Remsen & O'Grady 2002, Schaeffer et al. 2008).

Neste sentido, com base na observação das inúmeras atividades biológicas descritas para a prodigiosina, bem como seus efeitos citotóxicos e, principalmente, a sua questionável ação direcional e específica para células tumorais, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos genotóxicos, da prodigiosina, utilizando o modelo animal *Drosophila melanogaster*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Cultivo de Drosophila melanogaster

Cerca de 20 machos e 20 fêmeas adultas de *Drosophila melanogaster* foram cultivadas em laboratório, em frascos de vidro, contendo meio de cultivo (25g farinha de milho, 10g farinha de centeio, 5g ágar, 500mL água destilada, 1g nipagim dissolvido em álcool, 50g fermento biológico e 50g de açúcar), e o composto prodigiosina em diferentes concentrações (2 μ M, 5 μ M e 10 μ M/mL), sendo mantidas a temperatura ambiente (25°C). Cada frasco recebeu a quantidade 15mL de meio e 0,4mL de prodigiosina, nas diferentes concentrações. Cada um dos tratamentos, incluindo o grupo controle (ausência de prodigiosina no meio) foi realizado em triplicata.

A obtenção das larvas descendentes em terceiro estágio ocorreu após 11 dias de exposição dos indivíduos (adultos e larvas F₁) à prodigiosina. Para extração da hemolinfa, retirou-se do frasco 60 larvas, as quais foram lavadas por duas vezes com água destilada e logo após foram resfriadas a 4°C por 1 minuto, para imobilização. Logo após o resfriamento as larvas foram postas em placas multipoços (6 poços/placa), previamente sendo adicionada às mesmas uma solução de EDTA (200mL de água destilada, 14,89g de EDTA, ~3g de NaOH para ajuste final do pH igual a 10), para evitar a coagulação da hemolinfa. Em seguida, as larvas foram levadas ao microscópio estereoscópico (Lupa) e, com a ajuda de um bisturi (Lâmina de aço de 11 mm para procedimentos cirúrgicos) e uma pinça de relojoeiro n°5, foi feito o corte lateral na cutícula de cada indivíduo, permitindo o escoamento da hemolinfa. Logo em seguida, todo material depositado no fundo da placa multipoços foi retirado com a ajuda de uma micropipeta e colocado em tubos de microcentrifuga (1,5 mL), sendo, posteriormente, centrifugados.

A hemolinfa de cada indivíduo contribuiu para a formação de um *pool* celular por tratamento, uma vez que a hemolinfa dos mesmos foram colocadas em um mesmo frasco. Esta metodologia se fez necessária devido ao baixo volume de hemolinfa obtido de cada indivíduo. O volume final de cada tubo contendo a solução de EDTA e a hemolinfa foi equivalente a 0,5 mL. O mesmo foi submetido à centrifugação por duas vezes a 3000 rpm por 3 minutos. Após o descarte do sobrenadante na primeira lavagem, completou-se o volume com EDTA (0,5 mL) para a segunda centrifugação. Esse procedimento foi necessário para que após a lavagem celular todas as impurezas pudessem ser eliminadas, aumentando a qualidade das amostras.

2.2.2 Ensaio de genotoxicidade em *D. melanogaster*

A avaliação da danificação genômica foi realizada pelo Ensaio Cometa, segundo Singh e colaboradores (1988) com modificações. Cerca de 30 μ L da suspensão celular

obtida de homócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* foi homogeneizada em 100µL de agarose de baixo ponto de fusão (LM), previamente aquecida em banho-maria a 37°C. Em seguida, o homogeneizado foi transferido para lâminas de vidros revestidas de agarose padrão, cobertas com lamínulas e incubadas por 15 minutos a 4°C. Após este período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise (1ml de Triton x100, 10ml de DMSO, 89ml de solução de lise estoque {890ml de água destilada, 146,1g de NaCl, 37,2g de EDTA, 1,2g de TRIS, ~8 de NaOH}) por 72 horas, sob refrigeração a 4°C. Transcorridas as 72 horas, as lâminas foram submetidas a eletroforese (34V por 20 minutos e a 300mA) em tampão de corrida alcalino (1200ml de água destilada fria, 6ml de solução de EDTA {200ml de água destilada, 14,89g de EDTA e ~3g de NaOH} e 64ml de solução de NaOH {200ml de água destilada e 16g de NaOH}). Após a eletroforese as lâminas foram imersas em solução de neutralização (descrever a composição desta solução) por 15 minutos e, posteriormente, fixadas em solução de etanol absoluto por 5 minutos. Após a secagem das lâminas, as mesmas foram armazenadas em geladeira até o momento da coloração. Para coloração foi empregado o corante Gel Red (GelRed™ Biotium), sendo 1µL do corante homogeneizado em 1 mL de água deionizada estéril (1:1000). Em cada lâmina foram aplicados 30µL do corante. As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Imager M2 ZEISS). Para as contagens celulares cerca de 500 células por *pool* celular foram analisadas, sendo atribuídos escores de 0 – 4, de acordo com o deslocamento do DNA circulante, proveniente da quebra, que é puxado em direção ao ânodo do campo da eletroforese (Collins *et al.*, 2008)

Os danos foram classificados da seguinte forma: nível 0 para ausência de dano (evidenciado pela preservação da morfologia nuclear, não sendo observada a formação de fragmentos nucleares e formação de cauda semelhante a um cometa); nível 1 para dano leve (evidenciado pela formação de fragmentos nucleares que formaram uma pequena cauda semelhante a de um cometa); nível 2 para dano moderado (com presença de fragmentação nuclear e formação de uma significativa cauda de cometa); nível 3 para dano intenso (com presença de fragmentação nuclear e formação de cauda bastante prolongada); e nível 4 para dano muito intenso (grande quantidade de fragmentação nuclear, pouco conteúdo nuclear intacto e extensa cauda típica de um cometa).

2.2.3 Análise dos dados

O Índice de Dano, utilizado para quantificação de danos para cada um nível apresentado (ID) e a Frequência de Dano, utilizado para quantificar o total de células

danificadas independentemente do nível do dano (FD) obtidos após no Ensaio Cometa foram estabelecidos para todos os tratamentos. A homogeneidade dos dados foi testada pelo Teste de Bartlett, com nível de significância 0,05. Para a comparação das amostras foi empregado o teste ANOVA (nível de significância 0,05). E o teste de Tukey para validação dos resultados obtidos através do ANOVA.

2.3 Resultados

Em todos os casos, os dados apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$) sendo, portanto, submetidos à comparação pela ANOVA. Os valores do ID e FD nos diferentes tratamentos estão demonstrados na **Tabela 1**. A análise comparativa em relação ao grupo controle, para o ID e a FD, mostrou resultados significativos ($p < 0,05$) na análise conjunta (**Figuras 1 e 2**).

Pelo teste *a posteriori* de Tukey, observou-se que o tratamento na concentração 5 μ M/mL não apresentou diferença significativa para ambos os parâmetros (ID e FD; $p > 0,05$) em relação ao grupo controle (**Tabela 2**). Da mesma maneira, a comparação entre o tratamento 10 μ M/mL e o grupo controle não apresentou diferença significativa para o parâmetro FD, apesar do valor de p (0,06) estar muito próximo do nível de significância ($p < 0,05$).

A comparação entre os tratamentos 2, 5 e 10 μ M/mL para o ID não apresentaram diferenças significativas. Porém, a mesma comparação estabelecida para FD mostrou diferenças significativas entre os tratamentos 2 e 5 μ M/mL.

Tabela 1. Evidência de danos genômicos em larvas de *Drosophila melanogaster* após 11 dias de exposição a diferentes concentrações de prodigiosina (0, 2 μ M, 5 μ M e 10 μ M/mL).

Concentração (μ M/mL)	Níveis de Danificação					Índice e frequência de danificação genômica	
	Dano 0	Dano 1	Dano 2	Dano 3	Dano 4	*ID	**FD%
Controle	469	22	9	0	0	40	31
Controle	460	17	18	5	0	68	40
Controle	463	34	3	0	0	40	37
Média	464	24,33	10,0	1,67	0,0	49,33	26,0
2	364	56	27	36	17	286	136
2	344	146	35	47	18	339	156
2	251	104	67	63	15	487	249
Média	319,67	102,0	43,0	48,67	16,67	370,67	180,33
5	397	37	38	24	4	201	103
5	438	16	26	19	1	129	62
5	418	10	31	30	11	206	82
Média	417,67	21,0	31,67	24,33	5,33	178,67	82,33
10	414	14	32	35	5	203	86
10	357	12	31	70	30	404	143
10	344	20	61	60	15	382	156
Média	371,67	15,33	41,33	55,0	16,67	329,67	128,33

*ID (Índice de Dano) **FD% (Frequência de Dano).

Tabela 2. Valores de *p* obtidos pela análise *a posteriori* de Tukey para o Índice de Dano e para a Frequência de Dano após exposição de hemócitos de *Drosophila melanogaster* a diferentes concentrações de prodigiosina (2, 5 e 10 μ M/ mL).

	Índice de Dano				Frequência de Dano				
	Tratamentos (μ M/ mL)				Tratamentos (μ M/ mL)				
	0*	2	5	10	0*	2	5	10	
0*	-	0,0049**	0,2648	0,0109**	0*	-	0,0062**	0,4621	0,0612
2	0,0049**	-	0,0697	0,9184	2	0,0062**	-	0,0470**	0,3728
5	0,2648	0,0697	-	0,1692	5	0,4621	0,0470**	-	0,4677
10	0,0109**	0,9184	0,1692	-	10	0,0612	0,3728	0,4677	-

* Grupo controle **Valores significativos
Nível de significância $p \leq 0,05$

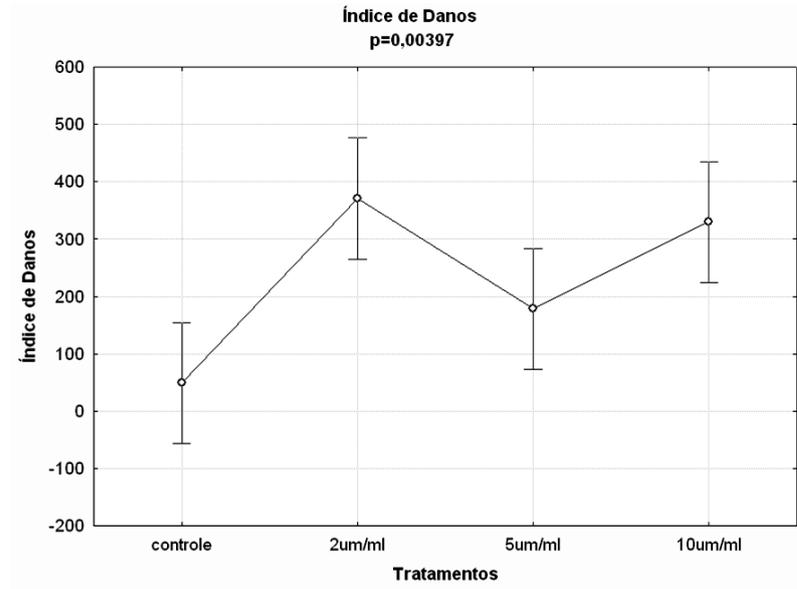


Figura 1. Gráfico da análise comparativa (ANOVA) dos Índices de Dano entre os tratamentos com 2; 5 e 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de prodigiosina e o grupo controle, observados em hemócitos de *Drosophila melanogaster*. Nível de significância $p \leq 0,05$.

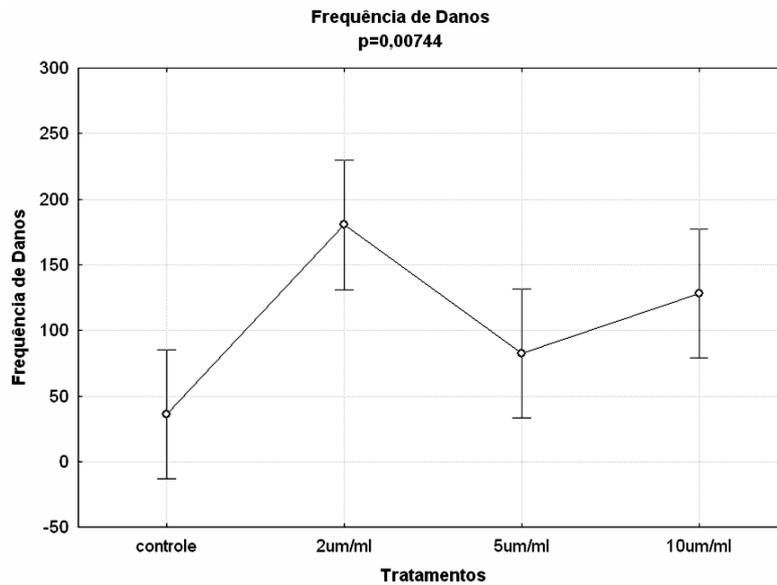


Figura 2. Gráfico da análise comparativa (ANOVA) da Frequência de Dano entre os tratamentos com 2; 5 e 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de prodigiosina e o grupo controle, observados em hemócitos de *Drosophila melanogaster*. Nível de significância $p \leq 0,05$.

2.4 Discussão

As gerações mais recentes de medicamentos têm focado na minimização de efeitos colaterais, apresentando seletividade para o seu sítio de ação. Neste sentido, é crescente a preocupação com a elaboração de drogas antitumorais com efeito seletivo para linhagens celulares anormais (Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Lu et al, 2012). Com base na minimização desses efeitos, sobre os pacientes submetidos aos tratamentos, novas drogas vem sendo estudadas para atenuar ações específicas sobre os alvos desejados, entre elas, a prodigiosina encontra-se entre os produtos naturais com aplicação seletiva no tratamento do câncer (Yamamoto et al, 2000; Yamamoto et al, 2000; Campás et al, 2003; Soto-Cerrato et al, 2004; Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Pérez-Tomás e Viñas, 2010; Lu et al, 2012) atuando especificamente nas células tumorais.

Visando testar a real seletividade de ação da prodigiosina, principalmente pela sua utilização no tratamento do câncer, o presente estudo focou na possível ação genotóxica desta droga em células normais, utilizando o modelo animal *Drosophila melanogaster*. Os resultados apresentados sugerem uma ação não seletiva da prodigiosina, tendo em vista que as diferentes concentrações deste composto aqui avaliadas, foram capazes de causar danos em diferentes níveis no material genético dos hemócitos de *D. melanogaster*, evidenciados pelo Índice de Dano (ID) e Frequência de Danos (FD) dos nucleóides através do Ensaio Cometa.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade antitumoral da prodigiosina, entre os quais destaca-se a morte celular por apoptose induzida ou não por danificação genômica (Campás et al, 2003; Montaner et al, 2005; Palchaudhuri e Hergenrother, 2007; Lu et al, 2012). A danificação genômica causada pela prodigiosina se deve à sua capacidade em ser um agente intercalante na molécula de DNA, sem discriminação entre regiões AT e CG, porém com afinidade por regiões com pares de bases alternantes (Montaner et al, 2005). Como consequência de sua ligação ao DNA, a prodigiosina inibe a ação das Topoisomerases I e II, resultando em quebras na molécula de DNA, principalmente as quebras na dupla-fita (DBS). Tais quebras puderam ser quantificadas no presente estudo, pela avaliação dos diferentes escores de danificação genômica observados em todos os tratamentos avaliados. Não foi observada uma associação dose-resposta das concentrações avaliadas, onde a maior quantificação relativa de danos foi observada na concentração 2 μ M/mL, como demonstrada pelas médias relativas dos diferentes níveis de danos (escores 0-4) e pelas discrepâncias das diferenças

significativas em relação ao grupo controle observadas, como demonstradas pelo teste *a posteriori* de Tukey.

Considerando a concentração 5µM/mL, a falta de significância estatística observada para ambos os parâmetros analisados (ID e FD), apontam para uma associação com a mortalidade larval diferencial observada e a provável presença de indivíduos resistentes à droga. Embora células possam se adaptar a baixos níveis de danificação irreparável, uma única quebra na dupla-fita (DBS) pode ser suficiente para matar a célula, se a mesma inativar genes essenciais ou induzir a apoptose (Khanna e Jackson, 2001). Reparos deste tipo de lesão são intrinsicamente mais difíceis do que de outros tipos de danos no DNA (Pérez-Tomás e Viñas, 2010). Assim, a mortalidade larval observada nesta concentração sugere uma associação com a danificação genômica evidenciada nos espécimes de *D. melanogaster*, nos seus primeiros estágios de desenvolvimento, em função da provável letalidade causada pela mesma.

A exposição crônica à prodigiosina, como a empregada neste estudo, também pode contribuir para a mortalidade e à resistência à droga, como sugerido por Patil et al, (2011) em larvas de mosquitos. Portanto, da mesma forma que a mortalidade pode ter levado às similaridades (valores de *p* sem diferença estatisticamente significantes – Tabela 2), do ID e FD de alguns tratamentos empregados (5µM/mL e 10µM/mL) em relação ao grupo controle, a presença de indivíduos mais resistentes pode ter contribuído para os resultados observados. Esse efeito de resistência também pode ser atribuído às menores médias relativas observadas para o ID e o FD dos tratamentos de 5µM/mL e 10µM/mL, em comparação à média do tratamento de 2µM/mL (Tabela 1).

Cabe destacar que vários estudos têm demonstrado a ação seletiva da prodigiosina (Montaner e Pérez-Tomás, 2001; Pandey et al, 2009; Pérez-Tomás e Viñas 2010; Chang et al, 2011), com seus efeitos sendo direcionados para as células tumorais. E quanto aos efeitos genotóxicos da prodigiosina, Guryano e colaboradores (2013) não encontraram ação genotóxica significativa da droga em células sanguíneas de camundongos (teste do Micronúcleo) e em cepas de *S. typhimurium* (teste Ames).

Os dados acima citados se contrapõem aos resultados obtidos na presente investigação experimental, sugerindo que cautela deva ser empregada na utilização da prodigiosina para fins terapêuticos. Isto se deve às diferentes respostas célula-específicas ao estímulo da prodigiosina (Lu et al, 2012), à história evolutiva dos sistemas de reparo nos diferentes organismos, que por sua vez levaram à variação intraespecífica e interespecífica

dos mesmos (Aravind et al, 1998; Kumar et al, 2013; Kienzler et al, 2013), e ao estágio de desenvolvimento testado no organismo (Patil et al, 2011).

Assim, as evidências dos efeitos genotóxicos observados nos hemócitos de *D. melanogaster*, aqui demonstrados, sugerem a necessidade de maiores investigações sobre os reais efeitos da prodigiosina em células normais, para melhor assegurar a eficiência seletiva desta droga como um agente antitumoral.

2.5 Conclusão

A prodigiosina apresentou um forte efeito genotóxico, induzindo danificação direta ao DNA nuclear de *Drosophila melanogaster* e ainda, interferindo no ciclo biológico celular retardados do desenvolvimento larval. Assim, as evidências dos efeitos genotóxicos observados nos hemócitos de *D. melanogaster*, aqui demonstrados, sugerem a necessidade de maiores investigações sobre os reais efeitos da prodigiosina em células normais, para melhor assegurar a eficiência seletiva desta droga como um agente antitumoral.

2.6 Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte técnico de Rafael Albuquerque, Elisângela J. Silva, e Cristiano A. Chags, bem como às agências financiadoras brasileiras CAPES, FACEPE, PROPESQ-UFPE e CNPq.

2.7 Referências

Aravind L, Walker DR, Koonin EV. (1998). Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repairs systems. *Nucleic Acids Research*, 27(5):1223-1242.

Campás C, Dalmau M, Montaner B, Barragán M, Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Pérez-Tomás, Gil J. (2003) Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*.. 17, 746-750.

Campos JL, Halligan DL, Haddrill PR, Charlesworth B. 2014. The relation between recombination rate and patterns of molecular evolution and variation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*, doi: 10.1093/molbev/msu056.

Chang CC, Chen WC, Ho TF, Wu HS, Wei YH. (2011). Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111:501–511.

- Freire-Maia, N., & Pavan, C. (1949). Introdução ao estudo da drosófila. *Cultus*, 1(5), 1-71.
- Genes C, Baquero E, Echeverri F, D Maya J, Triana O (2011). Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas diseases. *Genes et al. Parasites & Vectors*, 4:66
- Guryanov I.D, Karamova N.S, Yusupova O.I, Gnezdilov and Koshkaranova L.A. (2013). Bacterial Pigment Prodigiosin and Its Genotoxic Effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 39, 121-128.
- Hsieh HY, Shieh JJ, Chen CJ, Pan MY, Yang SY, Lin SC, Chang JS, Lee AYL, Chang CC. (2012). Prodigiosin down-regulates SKP2 to induce p27KIP1 stabilization and antiproliferation in human lung adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 166:2095–2108.
- Khanna KK, Jackson SP. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27:247-254.
- Kienzler A, Bony S, Devaux A. (2013). DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. *Aquatic Toxicology*, 134-135:47-56.
- Kumar A, Prameela TP, Suseelabhai R. (2013). A unique DNA repair and recombination gene (*recN*) sequence for identification and intraspecific molecular typing of bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and its comparative analysis with ribosomal DNA sequences. *Journal of Biosciences*, 38(2):267-278.
- Lavington E, Cogni R, Kuczynski C, Koury S, Behrman EL, O'Brien KR, Schmid PS, Eanes WF. (2014). A small system – high resolution study of metabolic adaptation in the Central metabolic pathway to temperate climates in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*. doi: 10.1093/molbev/msu146.
- Lee YCG, Langley CH, Begun DJ. (2014). Differential strengths of positive selection revealed by hitchhiking effects at small physical scales in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*, 31(4):804-816.
- Lu, C. H., Lin, S. C., Yang, S. Y., Pan, M. Y., Lin, Y. W., Hsu, C. Y., Chang, C. C. (2012). Prodigiosin-induced cytotoxicity involves RAD51 down-regulation through the JNK and p38 MAPK pathways in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology letters*, 212(1), 83-89.
- Montaner B, Pérez-Tomás R. (2001). Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sciences*, 68:2025-2036.

- Montaner, B., Castillo-Ávila, W., Martinell, M., Öllinger, R., Aymami, J., Giralt, E., & Pérez-Tomás, R. (2005). DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicological Sciences*, 85(2), 870-879.
- Palchaudhuri R, Hergenrother PJ. (2007). DNA as target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:487-503.
- Pandey R, Chander R, Sainis KB (2009). Prodigiosins as anti-cancer agents: living upto their name. *Curr Pharm Des* 15: 732–741.
- Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunke RB. (2011). Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*, 109(4): 1179-1187.
- Powell JR (1997) *Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model*. Oxf University Press, NY.
- Pérez-Tomás R, Viñas M (2010). New insights on the antitumoral properties of prodiginines. *Curr Med Chem* 17: 2222–2231.
- Pérez-Tomáz, Ricardo et al. (2003). The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochemical pharmacology*. v. 66, n. 8, p. 1447-1452
- Rahul, S., Chandrashekhar, P., Hemant, B., Chandrakant, N., Laxmikant, S., & Satish, P. (2014). Nematicidal activity of microbial pigment from *Serratia marcescens*. *Natural product research*, (ahead-of-print), 1-6.
- Schaeffer SW, Bhutkar A, McAllister BF et al. (2008) Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics* 179: 1601-1655.
- Sikorowski, P. P., Lawrence, A. M., Inglis, G. D. (2001). Effects of *Serratia marcescens* on rearing of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *American Entomologist*, 47(1), 51-60.
- Singh ND, Stone EA, Aquadro CF, Clark AG. (2013). Fine-scale heterogeneity in crossover rate in the *garnet-scalloped* region of the *Drosophila melanogaster* X chromosome. *Genetics*, 194:375-387.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988). A simple technique for the quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175:184-191.

Soto-Cerrato V, Llagostera E, Montaner B, Scheffer GL, Perez-Tomas R. (2004). The novel anticancer agent prodigiosin triggers mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol*, 68:1345–1352.

Strickberger, M. W. (1962). Experiments in genetics with *Drosophila*. *Experiments in genetics with Drosophila*.

Venil, C. K., Zakaria, Z. A., Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.

Yamamoto D, Kiyozuka Y, Uemura Y, Yamamoto C, Takemoto H, Hirata H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A. (2000). Cycloprodigiosin hydrochloride, a H_p/Cl₋ symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 126:191–197.

4. REFERÊNCIAS

- ACIOLE, E.E.P., GUIMARAES, N.N., SILVA, A.S., AMORIM, E.M., NUNOMURA, S.M., GARCIA, A.C.L., CUNHA, K.S., ROHDE, C. 2014. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Pest Manag. Sci.* 70:559-565.
- ADAM ML, TORRES RA, KISKA M, OLIVEIRA FF, LACERDA O, SPONCHIADO G, RIBAS CMO, CORREIA MTS. 2013. Assessment of genome damage in bird and mammal species as a tool for improvements in ex-situ conservation at Zoos. *Natureza & Conservação* 11(1):1-6.
- ADAM ML, TORRES RA, SPONCHIADO G, REQUIÃO L, OMS PA 2005. Genotoxicity of nitroxylin and moxydectin in sheep. *Online Journal of Veterinary Research*, 9 (2) :79-82.
- ADAM ML, TORRES RA., SPONCHIADO G., MOTTA TS, OLIVEIRA CMR, CARVALHO-FILHO MA, CORREIA MTS. 2010. Environmental degradation at a public park in southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). *Water Air Soil Pollut* 211:61–68.
- ADAM ML, TORRES, MFP, FRANCI AC, SPONCHIADO G., TORRES RA., CORREIA MTS. 2011. On the stress by photoperiod, temperature and noise as possible causes of genomic damaging in an animal model. *Stress and Health* 27: e152–e156.
- ADAMS, M.D. et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287: 2185-2195.
- AHMAD AS, AHMAD WYW, ZAKARIA ZK, YOSOF NZ. Applications of bacterial pigments as colorant: the Malaysian perspective. New York: Springer Briefs in Molecular Science; 2012.
- ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. 2003. Wing Somatic Mutation and Recombination Test. In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E.K (eds). *Mutagênese Ambiental*, Canoas: ULBRA, pp. 281-307.
- ANDRADE, L. R., SANDIN BRITO, A., DE SOUZA MELERO, A. M. G., ZANIN, H., JOSÉ CERAGIOLI, H., BARANAUSKAS, V., PIERRE IRAZUSTA, S. 2014. Absence of mutagenic and recombinogenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila* wing-spot test and *Allium cepa* test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 99, 92-97.
- ARAVIND L, WALKER DR, KOONIN EV. (1998). Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repairs systems. *Nucleic Acids Research*, 27(5):1223-1242.
- ASANO, S. et al. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* enhances the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin (Cry 1C) against common cutworm, *Spodoptera litura*. *Nippon Noyaku Gakkaishi*. 1999. v. 24, n. 4, p. 381-385.

BABITHA S. Microbial pigments. In: Nigam PS, Pandey A, editors. Biotechnology for agro-industrial residues, 8. Dordrecht: Springer; p. 147–62. 2009.

BÄCHLI, G. 2014. TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae. Disponível em: <http://taxodros.unizh.ch/>, 2013. Acesso em 15/03/2014.

BEATRIZ M, NAVARRO S, PIQUE M, VILASECA M, MARTINELL M, GIRALT E, GIL J, PEROZ-TOMAS R (2000) Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induce apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. Br J Pharmacol 131:585-593.

BHALLI, J. A. et al. DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides. Environ. Mol. Mutagen. v.50, p.37-45, 2009.

BENFORD, D.J., HANLEY, B.A., BOTTRILL, K., OEHLSCHLAGER, S., BALLS, M., BRANCA, F., CASTENGNARO, J.J., DESCOTES, J., HEMMINIKI, K., LINDSAY, D., SCHITTER, B. 2000. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. Altern. Lab. Anim., 28, 119-131.

BRITO, C.H., LOPES E.B., ALBUQUERQUE I.C. 2008. Avaliação de produtos alternativos e pesticidas no controle da cochonilha-docarmim na Paraíba. *Jacinto de Luna Batista*. Revista De Biologia E Ciências Da Terra V 8 – Número 2 – 2º Semestre 2008.

CALIXTO JB. 2003. Biodiversidade Como Fonte De Medicamentos Ciência e Cultura 55 (3) July/Sept.

CAMPAS, C., DALMAU, M., MONTANER, B., BARRAGAN, M., BELLOSILLO, B., COLOMER, D., ... & GIL, J. (2003). Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 17(4), 746-750.

CAPPOEN, D., MAJCE, V., UYTHETHOFKEN, C., URANKAR, D., MATHYS, V., KOČEVAR, M., KOŠMRLJ, J. 2014. Biological evaluation of diazene derivatives as anti-tubercular compounds. European journal of medicinal chemistry.

CARMONA, E. R.; CREUS, A.; MARCOS, R. 2011. Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mutation Research, 724: 35-40.

CASSAL VB, AZEVEDO LF, FERREIRA RP, SILVA DG, SIMÃO RS. 2014. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a Saúde Pública. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, 18: 437-445.

CDC Public Health Image Library. 2014. Disponível em <<http://www.bu.ufsc.br/framerefer.html>>. Acesso em: 17 mai. 2014.

CHAGAS, M. C. M.; BARRETO, M. F. P.; GUERRA, A. G.; SOBRINHO, J. F. S. *Controle de pragas associadas à queda de frutos do coqueiro*. Disponível em: <www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/entomologia/090.htm>. Acesso em: 18 de set. de 2008.

- CHANG, C.C., CHEN, W.C., HO, T.F., WU, H.S., WEI, Y.H. 2011. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111, 501-511.
- CLARK, A. G. et al. *Drosophila* 12 Genomes Consortium. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, v. 450, p.203-218, 2007.
- CLIFT, M. D., & THOMSON, R. J. (2009). Development of a merged conjugate addition/oxidative coupling sequence. Application to the enantioselective total synthesis of metacycloprodigiosin and prodigiosin R1. *Journal of the American Chemical Society*, 131(40), 14579-14583.
- COLLINS, A. R., OSCOZ, A. A., BRUNBORG, G., GAIVÃO, I., GIOVANNELLI, L., KRUSZEWSKI, M., ... & ŠTĚTINA, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143-151.
- CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60:52-60.
- CREBELLI, R., CARTA, P., ANDREOLI, C., ARU, G., DOBROWOLNY, G., ROSSI, S., & ZIJNO, A. (2002). Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 516(1), 63-70.
- COOKE, J.A.L. 2014. http://www.everythingabout.net/articles/biology/animals/arthropods/insects/flies/fruit_fly. Acesso em: 17 maio 2014.
- DAMS, R. I. Pesticidas: usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. 2006. Disponível em: <<http://www.periodicos.univille.br/index.php/RSA/article/download/89/139>>. Acesso em: 08 jun. 2013.
- DE SMET, P.A.G.M. 1997. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs*, 54: 801-840.
- DEMAIN AL. 1980. Microbial production of primary metabolites. *Naturwissenschaften* 67:582-587.
- DEMAIN AL. 1995. In: Hunter PA, Darby GK and Russel NJ (eds) Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends. Soc for Gen Microbiol, Cambridge pp 205-228.
- DOSSIÊ ABRASCO (Associação Brasileira de Saúde Coletiva). Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Disponível em: <<http://www4.planalto.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2013.
- DROSOPHILA 12 GENOMES CONSORTIUM. 2007. CLARK et al. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, 450:203-218.

FERVEUR, J. 2003. *Drosophila* behaviour, concepts and tools, from arousal to memory in fruitflies. *Behavioural Processes*, 64:v-vi.

FESTING, M.F.W., BAUMANS, V., COMBES, D.R., HADLER, M., HENDRIKSEN, F.M., HOWARD, B.R., LOVELL, D.P., MOORE, G.J., OVEREND, P. AND WILSON, M.S. 1998. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. *Altern. Lab. Anim.*, 26: 283-301.

FLYMOVE 2014. Disponível em <<http://www.open.ac.uk/personalpages/r.d.saunders/WhyFlies.html>>. Acesso em: 17 maio 2014.

FREIRE-MAIA, N., & PAVAN, C. (1949). Introdução ao estudo da drosófila. *Cultus*, 1(5), 1-71.

GAIVAO, I., SIERRA, L.M., COMENDADOR, M.A. 1999. The w/w+ SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reactive oxygen species inducing compounds. *Mutat. Res.*, 440:139-145.

GUILLET, E. et al. *In vitro* DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by alkaline comet assay. *Mutagenesis*, v.19, p. 129-135, 2004.

GURYANOV, I. D., KARAMOVA, N. S., YUSUPOVA, D. V., GNEZDILOV, O. I., & KOSHKAROVA, L. A. (2013). Bacterial pigment prodigiosin and its genotoxic effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39(1), 106-111.

GRAF, U., WÜRGLER, F.E., KATZ, A.J., FREI, H., JUON, H., HALL, C.B., KALE, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 271: 59-67.

GRIMALDI, D.A. 1990. A phylogenetic, revised classification of genera in the Drosophilidae (Diptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 197:1-139.

HAJISHARIFI, ZOHRE, *et al.* 2014. Predicting anticancer peptides with Chou's pseudo amino acid composition and investigating their mutagenicity via Ames test. *Journal of Theoretical Biology* 341: 34-40.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.23, p. 299-305, 1994.

HARVEY, A. 2000. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, 5:294-300,

HENDRY GAF, HOUGHTON JD. 1997. Natural food colorants. Glasgow: Blackie & Son.

HOFFMANN J.A. 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 426:33-38.

- HULTMARK, D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology*, v. 15, n.1, p. 12-19, 2003.
- HSIEH HY, SHIEH JJ, CHEN CJ, PAN MY, YANG SY, LIN SC, CHANG JS, LEE AYL, CHANG CC. (2012). Prodigiosin down-regulates SKP2 to induce p27KIP1 stabilization and antiproliferation in human lung adenocarcinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 166:2095–2108.
- INGLIS GD, LAWRENCE AM. 2001. Effects of *Serratia marcescens* on the F1 generation of laboratory-reared *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*, 94:362–366.
- JOSHI VK, ATTRI D, BALA A, BHUSHAN S. 2003. Microbial pigments. *Ind J Biotechnol* 2:362–9.
- KALIVODA, E. J., STELLA, N. A., ASTON, M. A., FENDER, J. E., THOMPSON, P. P., KOWALSKI, R. P., & SHANKS, R. M. (2010). Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Research in microbiology*, 161(2), 158-167.
- KAR CHOWDHURI, D., NAZIR, A., SAXENA, D.K. 2001. Effect of three chlorinated pesticides on hsrw stress gene in transgenic *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 15:173-186.
- KHANNA KK, JACKSON SP. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27:247-254.
- KIENZLER A, BONY S, DEVAUX A. (2013). DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. *Aquatic Toxicology*, 134-135:47-56.
- KUMAR A, PRAMEELA TP, SUSEELABHAI R. (2013). A unique DNA repair and recombination gene (*recN*) sequence for identification and intraspecific molecular typing of bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and its comparative analysis with ribosomal DNA sequences. *Journal of Biosciences*, 38(2):267-278.
- LAU, A. H. Testes de Genotoxicidade em Planárias – Análise de Aberrações Cromossômicas e Testes Cometa. Dissertação de Mestrado (Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- LIANG TW, CHEN SY, CHERN Y, CHEN CH, YEN YH, WANG SL. 2013. Enhancement of Prodigiosin Production by *Serratia marcescens* TKU011 and Its Insecticidal Activity Relative to Food Colorants. *Journal of Food Science*, 78(11):1743-1751.
- LU, C. H., LIN, S. C., YANG, S. Y., PAN, M. Y., LIN, Y. W., HSU, C. Y., ... & CHANG, C. C. (2012). Prodigiosin-induced cytotoxicity involves RAD51 down-regulation through the JNK and p38 MAPK pathways in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology letters*, 212(1), 83-89.

MANDERVILLE, R.A. 2001. Synthesis, proton-affinity and anti-cancer properties of the prodigiosin-group natural products. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, 1:195-218.

MONTANER, B., CASTILLO-ÁVILA, W., MARTINELL, M., ÖLLINGER, R., AYMAMI, J., GIRALT, E., & PÉREZ-TOMÁS, R. (2005). DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicological Sciences*, 85(2), 870-879.

MONTANER, B., & PÉREZ-TOMÁS, R. (2003). The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. *Current cancer drug targets*, 3(1), 57-65.

MELVIN, M.S.; TOMLINSON, J.T.; SALUTA, G.R.; KUCERA, G.L.; LINDQUIST, N. MANDERVILLE, R.A. 2000. DNA cleavage by copper-prodigiosin. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 6333- 6334

MELVIN, MS; FERGUSON, DC; LINDQUIST, N.; MANDERVILLE, RA. DNA Binding by 4-methoxypyrrolic natural products. Preference for Intercalation at AT Sites by Tambjamine E and Prodigiosin. *J. Org. Chem.*, 64: 6861-6869.

MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D.K.; BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. 2004. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay 1. *Mutagenesis*, 19(2):85-90.

NARCISO, L.E.; NAKAGAWA, E.S. 2009. Análise de praguicidas por bioensaio com mosca *Drosophila melanogaster* e cromatografia em camada delgada. *Arq. Inst. Biol.*, 76(2): 313-316.

NAZIR, A., MUKHOPADHYAY, I., SAXENA, D.K. AND KAR CHOWDHURI, D. 2003a. Evaluation of No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) of solvent dimethyl sulphoxide in *Drosophila melanogaster*: a developmental, reproductive and cytotoxicity study. *Toxicol. Mech. Methods*, 13, 147-152.

NAZIR, A., MUKHOPADHYAY, I., SAXENA, D.K. AND KAR CHOWDHURI, D. 2003b. Evaluation of toxic potential of captan: Induction of hsp70 and tissue damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17:98-107.

ORTIZ, F. 2013. Um terço dos alimentos consumidos pelos brasileiros está contaminado por agrotóxicos. Disponível em: <[http://www.noticias.uol.com.br/saude/ultimas-noticias/redacao/2012/05/01/um-terco-dos -alimentos- consumidos- pelos- brasileiros- esta-contaminado-por-agrotoxicos.htm](http://www.noticias.uol.com.br/saude/ultimas-noticias/redacao/2012/05/01/um-terco-dos-alimentos-consumidos-pelos-brasileiros-esta-contaminado-por-agrotoxicos.htm)>. Acesso em: 20 dez. 2013.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PALCHAUDHURI, R., & HERGENROTHER, P. J. (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current opinion in biotechnology*, 18(6), 497-503.

- PANDEY, R.C. 1998. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. *Med. Res. Rev.*, 18: 333-346.
- PATIL, C. D., PATIL, S. V., SALUNKE, B. K., & SALUNKHE, R. B. (2011). Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology research*, 109(4), 1179-1187.
- PATIL, C. D., PATIL, S. V., SALUNKE, B. K., & SALUNKHE, R. B. (2012). Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. *Parasitology research*, 110(5), 1841-1847.
- PÉREZ-TOMÁZ, R AND VIÑAS, M. New Insights on the Antitumoral Properties of Prodiginines. *Current Medicinal Chemistry*, 17: 2222-2223, 2010.
- PORTAL AGRONEGÓCIO. 2014. Produtos naturais são estudados para uso no controle de pragas. <ururau.com.br/ururaurural2210_Produtos_naturais_são_estudados_para_uso_no_controle_de_pragas>. Acesso em 07/05/2014.
- POWELL, J.R. 1997. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model. Oxford University Press, New York.
- RAGUGNETTI, M., ADAMS M.L., GUIMARÃES, A.T.B., SPONCHIADO, G., VASCONCELOS, E.C., OLIVEIRA, C.M.R. 2011. Ibuprofen genotoxicity in aquatic environment: an experimental model using *oreochromis niloticus*. *Water Air Soil Pollut* 218:361–364.
- RAND, M. D. 2010. *Drosophotoxycology*: the growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol Teratol*, 1: 32-74.
- REMSEN, J.; O'GRADY, P.2002. Phylogeny of *Drosophilinae* (Diptera: *Drosophilidae*), with comments on combined analysis and character support. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24:249-264.
- RICHARD, A. M. Application of SAR methods to noncongeneric data bases associated with carcinogenicity and mutagenicity: issues and approaches. *Mutation Research*, v.305, p.73-97, 1994.
- ROHDE, C. 2012. Desenvolvimento dos Insetos: *Drosophila*. Capítulo 20. *Embriologia* 3ª. edição (Sonia M.L. Garcia & Casimiro G. Fernandes, eds.), ARTMED, Porto Alegre, pp. 335-355.
- ROOS, W.P.; KAINA, B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.*, 12:440-450.
- RUBIN, G. M.; LEWIS, E. B. A brief history of *Drosophila's* contributions for genome research. *Science*, v.287, p.2216-2218, 2000.

- SIDDIQUE, H.R.; GUPTA, S.C.; DHAWAN, A.; MURTHY, R.C.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. 2005. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46:189-197.
- SILVA, E.J. 2012. Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar. Dissertação de Mestrado (Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco.
- SINGH,N.P.;SINGH N.P.; McCOY M.T.; TICE R.R.; SCHNEIDER, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184-191.
- SCHAEFFER, S.W.; BHUTKAR, A.; MCALLISTER, B.F.; MATSUDA, M., MATZKIN, L.M.; ROHDE, C.; VALENTE, V.L.S. et al. 2008. Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: The order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics*, 179:1601-1655.
- SHARMA, A., SHUKLA, A.K., MISHRA, M., CHOWDHURI D.K. 2011. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. *Mutat Res.* 721(2):142-146.
- SHU, Y.Z. 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61: 1053-1071.
- SHUKLA, A.K.; PRAGYA, P., CHOWDHURI, D.K. 2011.A modified alkaline Comet assay for *in vivo* detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 726(2):222-226.
- SKORSKI T. 2002. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to treatment and in genomic instability. *Oncogene*, 21:859-804.
- SMITHEN,D.A., FORRESTER A.M., CORKERY D.P., DELLAIRE G., COLPITTS J., MCFARLAND S.A., BERMANB J.N., THOMPSON A. 2013. Investigations regarding the utility of prodigiosenes to treat leukemia. *Org. Biomol. Chem.*, 11: 62–68.
- SOBELS, F.H.; VOGEL, E. 1976. The capacity of *Drosophila* for detecting relevant genetic damage. *Mutation Research*, 41:95-106.
- SONG MJ, BAE J, LEE DS, KIM CH, KIM JS KIM SW, HONG I (2006) Purificacion and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp.KH-95. *J Biosci Bioeng* 101:157-161.
- SPONCHIADO G., FORTUNATO E.M. REYNALDO E.M.F.L., ANDRADE, A.C.B., VASCONCELOS E.C., ADAM M.L., OLIVEIRA C.M.R. 2011. Genotoxic effects in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to nanograms-per-liter concentration of 17 β -estradiol (E2): an assessment using micronucleus test and Comet Assay. *Water Air Soil Pollut* 218:353–360.

STRICKBERGER, M.W. Experiments in genetics with *Drosophila*. New York: John Wiley and Sons. P. 144, 1962.

TICE, R. R. *et al.* 2000. Single cell el / Comet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A. 2006. Genotoxicidade Ambiental. In: Zagatto, P.A.; Bertolotti (eds). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*, São Carlos: RiMa, Cap.14, pp. 327-346.

VAN HEERWAARDEN, V.B., HOFFMANN, A.S. 2007. Global warming: fly populations are responding rapidly to climate change. *Current Biology* 17(1):R16-R18.

VENIL CK, LAKSHMANAPERUMALSAMY P. 2009. An insightful overview on microbial pigment: prodigiosin. *Ele J Biol*; 5(3):49–61.

VENIL, C.K., ZAKARIA, Z.A., AHMAD, W.A. 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry* 48.7: 1065-1079.

VERPOORTE, R. 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3:232-238.

WILLIAMSON, N. R., FINERAN, P. C., LEEPER, F. J., & SALMOND, G. P. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), 887-899.