

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR – PPGGBM

Marícia Fantinel D'Ávila

**METILAÇÃO SEXO-ESPECÍFICA NO DNA DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Drosophila*: UM FENÔMENO RECORRENTE?**

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

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia da Silva Valente

Co-Orientadora: Dra. Rosane Nunes Garcia

Porto Alegre

Março, 2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de *Drosophila* do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com recursos do CNPq, PROPESQ-UFRGS e FAPERGS.

“. . . we perceive that, relative to the animal kingdom, we should chiefly devote our attention to the invertebrate animals, because their enormous multiplicity in nature, the singular diversity of their systems of organization, and of their means of multiplication, (. . .) , show us, much better than the higher animals, the true course of nature, and the means which she has used and which she still unceasingly employs to give existence to all the living bodies of which we have knowledge.”

(Jean Baptiste Lamarck, 1803)

“Could there be in natural history a more important conclusion, one to which we ought to give more attention, than the one which I have just revealed?”

(Jean Baptiste Lamarck, 1809)

*Aos meus pais Círia e Marcial e
aos meus irmãos Glauber e Maílson,
que se empenham além da conta
para que eu realize meus sonhos, dedico.*

Agradecimentos

Agradeço à Dra. **Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesty**, muito mais que minha orientadora, minha amiga e “mãe”. Vera, obrigada pelo acolhimento desde o primeiro semestre de graduação, pela confiança incondicional, por me dar liberdade para trabalhar e apoio nos meus projetos profissionais, que são também pessoais. Por permitir que eu me desenvolva como profissional e pessoa no melhor lugar para trabalhar e conviver que existe: o Laboratório de *Drosophila* da UFRGS. Se eu me apaixonei por essas mosquinhas, foi pra tentar “copiar” a tua paixão! Obrigada por ser a drosofilista mais vocacionada que eu conheço.

À Dra. **Rosane Nunes Garcia**, minha co-orientadora, amiga, irmã e quase “mãe” (porque de maternidade ela entende bem). Rô, te agradeço por todo carinho, dedicação, pela paciência comigo, por acreditar em mim e confiar a mim a seqüência de um trabalho maravilhoso que só me fez aprender mais sobre evolução, genética e biologia molecular, além de me introduzir no mundo da epigenética! Por estar comigo nas vitórias, nas horas difíceis e por apoiar meu trabalho com amizade sempre. Nada disso seria possível sem a nossa parceria! Obrigada por todas as palavras de incentivo e motivação (não foram somente palavras!).

Aos colegas de laboratório, que são também grandes amigos e cientistas exemplares. **Liz**, valeu pelas dicas, pelo carinho, pela assessoria idiomática, pela disponibilidade e pela parceria, obrigada de coração! **Maríndia**, obrigada pelas conversas, pelas palavras de apoio e pela convivência. Ao **Marco** pelas piadas, pelas pegações no pé, pelas dicas na escolha das espécies e pela identificação de algumas das espécies. À **Monica** pelas risadas, pelas dicas e pela amizade até de longe. Ao **Hermes** por me emprestar o seu conhecimento de identificação de espécies, pelas ‘filosofagens’, pelas revisões e por algumas mosquinhas das coletas também. Sobretudo, obrigada por ter vindo de Floripa depois de quatro anos e pela permanência da amizade que começou lá atrás e que se traduz diariamente no modo “tranquilo” de me aturar (hehehe)! Á **Ju** e à **Grazia** pelas conversas sobre trabalho e sobre a vida. E aos demais colegas e amigos do laboratório: **Sabrina** e **Jonas** (meus colegas em Floripa e aqui), **Adriana L.**, **Ana** e às novatas **Carol** e **Gisele**. Muito obrigada por tudo. Não posso deixar de agradecer àqueles que passaram nesses quase oito anos de Lab. de *Drosophila* e que continuam fazendo parte da minha vida todos os dias, estejam onde estiverem: a famosa turma da “velha guarda”: **Elgion**, **Victor Hugo**, **Luciano**, **Fabiana**, **Cláudia** e **Marisa** – minha “sogra” amada, pessoas com as quais eu

aprendi muito e que estarão sempre no meu coração. Agradeço também à turma do "apoio": **Berê, Marcelo, Dani, D. Jane e Helena**. Obrigada pela convivência e pela parte técnica.

Aos que são amigos, colegas e além de tudo, meus irmãos (que eu ganhei no laboratório e vão me acompanhar pra toda vida a partir de agora): **Adri, André, Fabiano, Ronaldo, Norma, e Luis Fernando**... Vocês fazem da amizade uma concretização e da convivência uma diversão. Saber que tenho vocês na minha vida torna absolutamente tudo mais leve e simples de viver. Não vou ter palavras pra expressar a gratidão que eu sinto. Mas amizade não se agradece, né? Então, continuem sendo meus irmãos. Amo vocês e nossa amizade é pra sempre!

Aos meus amigos de sempre (e pra sempre): **Mini, Martin, Lala e Rico**, a cúpula mais diversificada e indivisível que existe. Estiveram comigo o tempo todo apoiando e acreditando mesmo quando nem eu acreditava mais em mim. Sem vocês eu não seria metade do que eu sou hoje. Desta vez, tenho que dedicar um agradecimento especial ao **Rico**, que é metade do meu cérebro. Meu amor por ti é tão imenso que eu tenho que escancarar pra todos saberem: tu és definitivo na minha vida e eu te amo demais! E vou até a lua, se for contigo, tá?

À minha família que não entende até hoje o porquê de eu "trabalhar com moscas", mas que apóia mesmo assim! Aos meus avós (**Marcelino e Albertina**) e pais (**Marcial e Círia**) pelos sonhos e realizações; aos meus irmãos e sobrinho (**Glauber, Maílson e Felipe**), por compreenderem as minhas ausências e me amarem do mesmo jeito; aos meus tios e primos por acreditarem e se orgulharem de mim e ao meu afilhado **Antônio**, que é colorado, mas é meu amor e pronto!

Ao PPGBM/UFRGS, especialmente ao Sr. **Elmo Cardoso** pelo profissionalismo, pela integridade e pela paciência.

Ao CNPq pelo financiamento.

SUMÁRIO

Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Resumo	9
Abstract	10

Capítulo I

INTRODUÇÃO 11

O Gênero *Drosophila* e o Subgênero *Sophophora* 11

Epigenética e Evolução 14

A Metilação do DNA 19

A Metilação do DNA no Gênero *Drosophila* 21

A Metiltransferase de *Drosophila* 25

Técnicas para Análise da Metilação no DNA 29

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL 32

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 35

Capítulo II

Metilação sexo-específica em <i>Drosophila</i> : uma investigação no subgênero <i>Sophophora</i>	36
--	----

Capítulo III

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	74
---------------------------------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
-----------------------------------	----

RESUMO

Nós realizamos este estudo a fim de contribuir para o entendimento da evolução de espécies do gênero *Drosophila* e o quanto fenômenos epigenéticos estão relacionados a isto. Analisando 14 espécies do subgênero *Sophophora*, as quais apresentam diferentes histórias evolutivas e exploram ambientes divergentes, investigamos a possibilidade de recorrência do fenômeno de metilação sexo-específica do rDNA como descrito previamente para a espécie *D. willistoni*. Utilizando as técnicas de seqüenciamento e PCR bissulfito, nós demonstramos que o gene 28S apresenta-se metilado nas espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*, bem como na espécie *D. melanogaster*, corroborando a hipótese de que, em insetos, as regiões internas dos genes são metiladas. Entretanto, não detectamos padrões de metilação sexo-específicos para o DNA ribossomal das espécies *D. melanogaster* e *D. paulistorum*. Através da técnica de MSRE combinada com *Southern blot*, verificamos que a metilação diferencial entre sexos do rDNA ocorre exclusivamente nas espécies do subgrupo *willistoni*, com exceção de *D. paulistorum*. Nossos resultados indicam que o fenômeno de metilação do DNA pode variar bastante, mesmo entre espécies proximamente relacionadas, como *D. willistoni* e *D. paulistorum*, por exemplo. Nós também sugerimos que fatores ambientais, operando diferencialmente nos territórios ocupados pelas diferentes espécies e o menor tempo evolutivo de surgimento dos fenômenos epigenéticos, podem contribuir para a formação do panorama aqui detectado.

ABSTRACT

The present study aimed to contribute to the comprehension of the role of epigenetic phenomena for the evolution of species of the Genus *Drosophila*. We analyzed 14 species of the Sub Genus *Sophophora*, with different evolutionary histories and exploring very divergent environments, investigating the putative occurrence of the phenomenon of sex-specific methylation patterns of the rDNA, as described previously in *Drosophila willistoni*. Through the use of PCR bisulfite and sequencing, we demonstrated that the 28S gene is methylated in members of the *willistoni* subgroup of *Drosophila*, as in *D. melanogaster*, corroborating the hypothesis that the internal regions of the genes are methylated in insects. No sex-specific patterns of methylation, however, were detected in the ribosomal DNA of the species *D. melanogaster* and *D. paulistorum*. Using the methods of MSRE and *Southern blot*, we detected differential methylation of the rDNA between sexes exclusively in the species of the *willistoni* subgroup, excepting *D. paulistorum*. Our results indicate that the phenomenon of DNA methylation can varied considerably even so between species closely related, as *D. willistoni* and *D. paulistorum*, for example. We also suggested that different environmental factors operating in the territories occupied by the different species studied and the shorter evolutionary time of the raising of the epigenetic phenomena can contribute to the formation of the scenario detected.

INTRODUÇÃO

O Gênero *Drosophila* e o Subgênero *Sophophora*

Segundo a revisão de Wheeler (1981), o gênero *Drosophila* pertence à família *Drosophilidae*, subfamília *Drosophilinae*. *Drosophilinae* é a subfamília mais diversa, abrigando 3234 espécies em 44 gêneros (Bächli, 2006). Throckmorton (1975) aponta várias evidências que sugerem uma origem tropical para a família *Drosophilinae*. No entanto, até hoje, o quadro que se apresenta é que grande parte destas espécies se encontra em regiões neotropicais (Wheeler, 1981). Dos gêneros que abriga, *Drosophila* é o maior com 1148 espécies descritas. *Drosophila* é o gênero mais rico em espécies e o mais bem estudado no Brasil, principalmente os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora*.

O presente trabalho tem como objeto de estudo espécies do subgênero *Sophophora*, cuja radiação de espécies compreende, principalmente, a expansão das linhagens *saltans-willistoni*, grupos típicos de regiões Neotropicais, *melanogaster*, presente nos trópicos do Velho Mundo e *obscura*, grupo distribuído através da zona temperada terrestre (Throckmorton, 1975). As relações entre os grupos e as espécies estão esquematizadas na Figura 1.

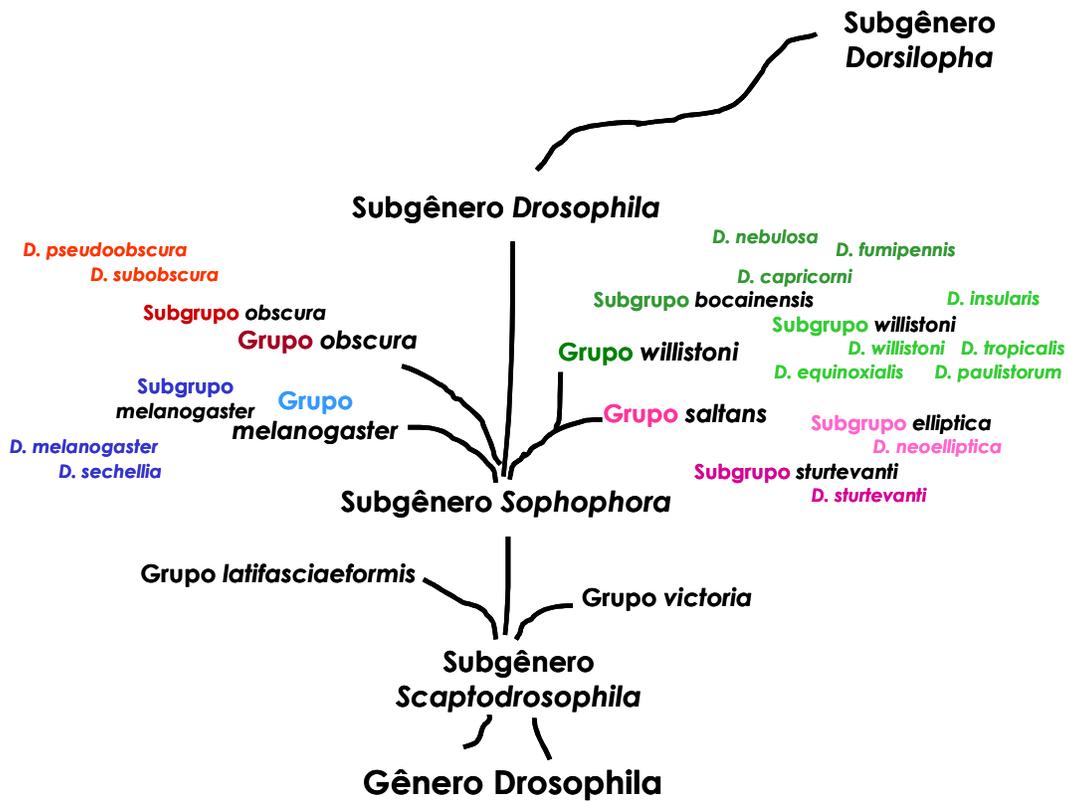


Figura 1. Esquema das relações de parentesco entre as espécies investigadas no presente trabalho (Baseada na filogenia de Throckmorton, 1975 e na filogenia consenso de Kwiatowskii & Ayala, 1999).

As linhagens do Novo Mundo são consideradas derivadas com relação às formas do Velho Mundo, a partir de ancestrais primitivos pertencentes a uma radiação anterior, a radiação *Scaptodrosophila*.

O grupo *saltans* é formado por um total de 21 espécies descritas divididas em cinco subgrupos listados em ordem ascendente, a partir do mais primitivo: *cordata*, *elliptica*, *sturtevantii*, *parasaltans*, *prosaltans* e *saltans*. Seu provável local de origem é a região tropical da América do Norte (Throckmorton, 1975). O grupo *willistoni* é formado por 25 espécies, divididas em dois subgrupos: o subgrupo *willistoni*,

contendo *D. willistoni* e suas espécies crípticas *D. paulistorum*, *D. tropicalis*, *D. equinoquixialis*, *D. insularis* e *D. pavlovskiana* e o subgrupo *bocainensis* que agrupa as demais espécies (Ashburner, 1989). Throckmorton (1975) argumenta que a origem deste grupo deve ter ocorrido na América do Sul. O grupo *obscura* é constituído por um total de 23 espécies, divididas entre os subgrupos *obscura* e *affinis*. Segundo Throckmorton (1975), evidências apontam para uma origem nos trópicos do Velho Mundo, a partir de uma linhagem *proto-melanogaster*, seguida de uma adaptação a ambientes temperados. A Figura 2 ilustra a distribuição geográfica de alguns dos grupos citados acima.

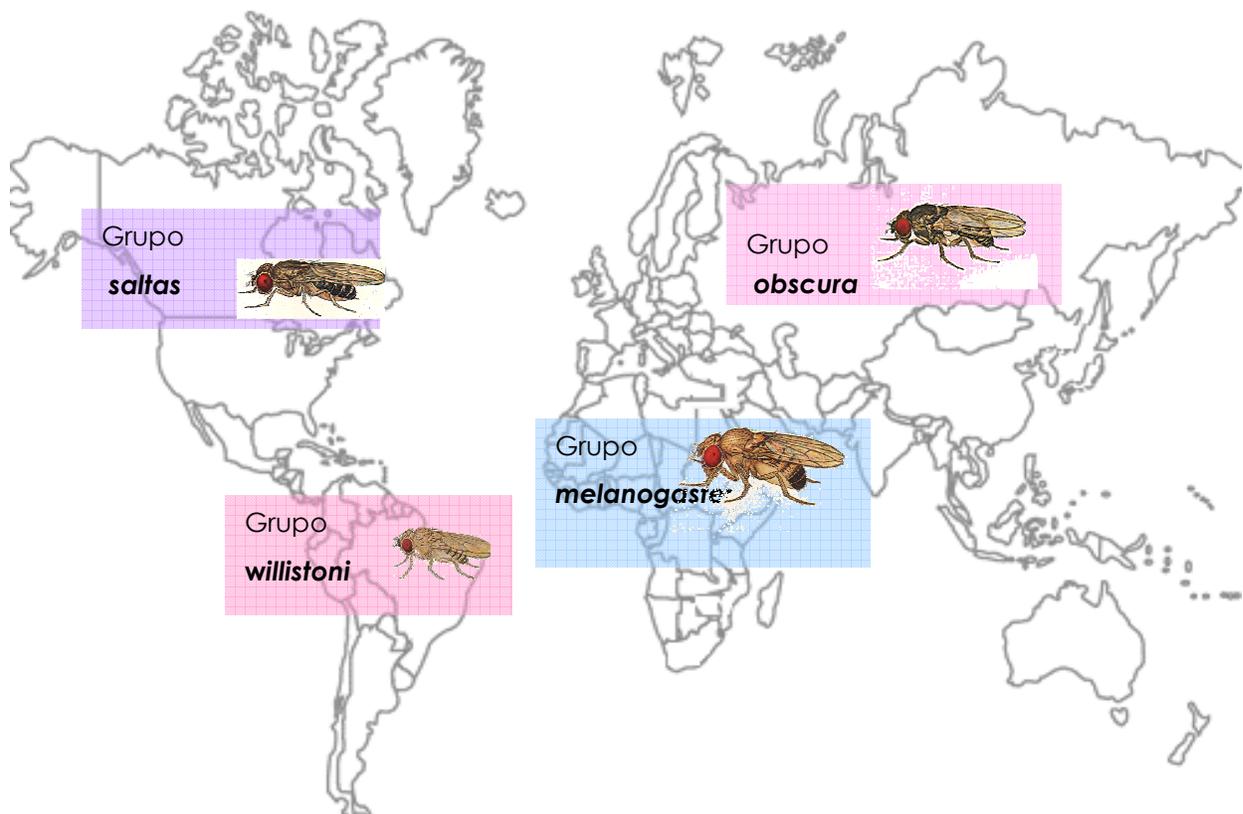


Figura 2. Origem das espécies do subgênero *Sophophora* de *Drosophila* segundo Throckmorton (1975).

Epigenética e Evolução

O uso do termo epigenética enfatiza mudanças herdáveis na expressão gênica que não podem ser vinculadas à variação genética (Richards, 2006). A herança epigenética envolve, pois, a transmissão de informações que não são codificadas pelas seqüências de DNA de uma célula para a célula filha ou de geração para geração. Diversos tipos de processos epigenéticos já têm sido identificados e incluem fenômenos do tipo: a) metilação, onde ocorre a substituição de um átomo de hidrogênio (H) por um grupo metil (CH₃) e é catalisada por metiltransferases; b) fosforilação, principal participante nos mecanismos de regulação das proteínas, com a adição de um grupo fosfato (PO₄) a um aminoácido de uma cadeia protéica. As fosfatases são as enzimas responsáveis pela desfosforilação e as quinases as responsáveis pela fosforilação; c) a ubiquitinação, processo que ocorre nas células no qual uma molécula é marcada por moléculas de ubiquitina com o objetivo de ser reconhecida por um proteossoma onde é degradada; d) a acetilação, que é controlada por duas famílias de enzimas: as histonas-acetiltransferases (acetiladoras) e as histonas-desacetilases (desacetiladoras). A acetilação está associada com a remodelação do nucleosoma e com a ativação da transcrição, enquanto que a desacetilação se associa com a repressão da transcrição, via condensação da cromatina (Malakhova *et al.*, 2003). As modificações covalentes do DNA ou seu empacotamento em histonas são os principais responsáveis pela transferência das informações epigenéticas (Fazzari & Grealley, 2004).

A característica fundamental do fenômeno epigenético é que um genótipo pode apresentar fenótipos alternativos, os quais são baseados no estado epigenético de um ou mais loci dentro do genoma. Muitos dos sistemas experimentais epigenéticos clássicos foram descobertos devido à aparente instabilidade genética ou a desvios nas proporções de heranças mendelianas esperadas (Richards, 2006).

A epigenômica pode ser definida, portanto, como uma abordagem geral do genoma para estudar epigenética, tendo como meta central definir as características das seqüências de DNA que direcionam os processos epigenéticos. Um exemplo de característica de seqüências é a presença das chamadas "ilhas" CpG, que são alvos reconhecidos para modificações covalentes do DNA (revisão em Fazzari & Grealley, 2004).

Reconhecendo-se, então, os mecanismos citados anteriormente como capazes de promover variabilidade mesmo sem mudanças nas seqüências de DNA, torna-se interessante reconsiderar uma antiga questão na biologia: "qual a origem da variação?". Mesmo sendo um tema que parecia resolvido através da óptica Darwinista, a epigenética fez com que dúvidas ressurgissem em torno dele, considerando-se duas idéias principais: (a) a variabilidade em populações aparece exclusivamente por mutações randômicas, posição esta defendida pelo neo-Darwinismo, ou (b) a formação de novos caracteres pode ser induzida por forças ambientais externas? O conhecimento atual sobre o efeito das modificações

epigenéticas do DNA torna, portanto, possível que tal dúvida exista (Guerrero-Bosagna *et al.*, 2005).

Na década de 80, Ernst Mayr propôs o termo *soft inheritance* vinculado à crença de que as bases genéticas dos caracteres poderiam ser modificadas pela indução direta do ambiente, pelo “uso e desuso” ou por uma falha intrínseca de constância nos processos biológicos, e que este fenótipo modificado passaria para a próxima geração. Esta definição abrange uma série de hipóteses, incluindo as hipóteses da teoria evolutiva do neo-Lamarckismo, principalmente por defender a indução ambiental ou comportamental de características somáticas adaptativas e sua subsequente transmissão à geração seguinte (revisão em Richards, 2006).

Neste contexto, Jaenisch & Bird (2003) sugeriram que as futuras linhas de investigação teriam que dar ênfase à identificação dos estímulos que poderiam iniciar mudanças evolutivas. Os autores propuseram ser possível, através de fatores externos, tais como a dieta, que compostos promovam a acumulação de mudanças epigenéticas dentro das populações ao longo de alguns anos.

Diversas pesquisas já vêm sendo realizadas, a fim de identificar alguns destes compostos como, por exemplo, nos experimentos realizados por Waterland & Jirtle (2003). Neste trabalho, foram observadas alterações na cor da pelagem de camundongos e tais alterações foram diretamente atribuídas à suplementação alimentar da mãe durante a gestação com vitamina B₁₂, ácido fólico, colina e betaína. Estas substâncias provocaram alteração nos padrões de metilação de algumas regiões do DNA e estes padrões foram mantidos nas gerações seguintes.

Num experimento mais recente, Dolinoy *et al.* (2006) também induziram alterações epigenéticas através da ingestão materna de genisteína, o principal fitoestrógeno de soja, em doses comparáveis àquelas que um humano deve receber quando submetido a uma dieta rica em soja. Os padrões de metilação do DNA se modificaram e a prole, aparentemente, ficou protegida contra a obesidade na idade adulta. Entretanto, existem indicações de que a genisteína possa causar problemas à saúde, via efeitos sinérgicos ou aditivos na metilação do DNA, quando interage com substâncias como o ácido fólico (Waterland & Jirtle, 2003).

A partir dos trabalhos citados anteriormente, portanto, é possível identificar que a epigenética se impõe como uma nova visão que requer muito estudo futuro para explicar os fatores que podem gerar variabilidade nas populações. Eva Jablonka e Marion Lamb em 1995, no livro *"Epigenetic Inheritance and Evolution, The Lamarckian Dimension"*, descrevem os Sistemas de Herança Epigenética (EIS) indicando-os como um canal adicional para transmissão de variação herdável entre gerações de células e sugerindo a interação desta variação com os Sistemas de Herança Genética (GIS). Os EIS, segundo as autoras, podem responder mais rapidamente às mudanças ambientais em ciclos intermediários (com escalas de tempo menores), gerando alterações evolutivas mais rápidas do que as mutações randômicas e seleção de variação de seqüência nucleotídica (revisão em Griesemer, 1998).

De acordo com a separação entre origem e fixação de uma novidade evolutiva, alguns autores afirmam que a evolução é sempre um processo de dois

passos, primeiro envolvendo variação mediada pelo desenvolvimento, e após a seleção, cuja operação resulta nas mudanças de frequências gênicas (West-Eberhard, 1998).

Nesse sentido, as mudanças ocorrem devido a alterações nos processos iniciais do desenvolvimento, os quais, mais adiante, poderiam, em alguns casos, ser ambientalmente induzidos, e tais modificações seriam então fixadas e prosperariam na população. Portanto, a diversidade e a evolução das espécies poderiam ser explicadas não somente por aqueles processos seletivos impostos pelo ambiente, mas também pela ação do ambiente como um indutor de variação genotípica e fenotípica, variação esta que é matéria prima para a seleção (Guerrero-Bosagna *et al.*, 2005).

Devido aos resultados de seus experimentos com *Drosophila*, Waddington, na década de 50, propôs dois novos conceitos relacionados à capacidade de influências ambientais induzirem a aparição de novos caracteres em organismos e a sua manutenção ao longo das gerações. O primeiro é a "canalização", ou seja, diante de distúrbios e influências externas estressantes, haveria uma perturbação das tendências do desenvolvimento normal do adulto em condições normais. O outro é a "assimilação genética": enquanto existem essas tendências conflitantes, se um estímulo estressante é capaz de modificar o desenvolvimento de uma linhagem em um organismo, a população derivada pode evoluir exibindo a modificação mesmo na ausência do estresse (revisão em Guerrero-Bosagna *et al.*, 2005).

Atualmente, sabe-se que a metilação do DNA é um dos principais mecanismos epigenéticos e hereditários que regulam a expressão genética em células de mamíferos (Khosla *et al.*, 2001). Além disso, a metilação do DNA é capaz de ser modificada pela ação de agentes externamente aplicados (MacPhee, 1998). Alguns compostos particulares encontrados na natureza poderiam atuar como tais agentes. Dessa forma, eles poderiam ser capazes de afetar a evolução dos organismos, induzindo profundas mudanças em indivíduos e populações, talvez com conseqüências transgeracionais (Guerrero-Bosagna *et al.*, 2005).

A Metilação do DNA

Dentre os processos epigenéticos estudados, talvez o mais conhecido seja a metilação do DNA (Weinhold, 2006), que é, basicamente, a adição de grupamentos metil na posição C5 de citosinas (Gruenbaum *et al.*, 1981). Em eucariotos, as citosinas são convertidas a 5-metilcitosinas pela ação enzimática das metiltransferases após a replicação do DNA e em torno de 5% do genoma dos mamíferos é metilado.

Esta conversão somente ocorre quando os resíduos de citosina estão seguidos de uma guanosina (CpG). A alteração da ligação de alguns fatores de transcrição é um possível mecanismo pelo qual a 5-metilcitosina controla a expressão gênica. Quando as citosinas são metiladas, o grupo metil protudente junto ao sulco maior do DNA produz dois efeitos importantes: a) os fatores de transcrição não conseguem

acessar o DNA e b) esta conformação atrai proteínas metil-ligantes que estão normalmente associadas ao silenciamento gênico e à compactação da cromatina (revisão em Fazzari & Grealley, 2004). Um modelo alternativo para o controle da expressão gênica baseado na metilação consiste em um grupo de proteínas e complexos protéicos que especificamente se ligam a metil-CpG e recrutam histonas desacetiladas aos sítios de metilação (Wade, 2001).

Nos eucariotos superiores, a metilação do DNA tem papel importante nos diferentes processos biológicos, incluindo a inativação do cromossomo X (Norris *et al.*, 1994), *imprinting* genômico (Lloyd, 2000), silenciamento da expressão gênica (Busslinger *et al.*, 1983), e também é essencial no processo de desenvolvimento normal em mamíferos (Li *et al.*, 1992). Um exemplo bastante estudado sobre metilação dentro do processo de desenvolvimento, é o que ocorre com os genes de globina das células sangüíneas de humanos e galinhas. A seqüência dos promotores destes genes não apresenta metilação nas células sangüíneas, enquanto que os mesmos promotores em outras células que não produzem globina apresentam as citosinas metiladas (Gilbert, 2000).

Em mamíferos, um exemplo prático que ilustra o envolvimento de *imprinting* em doenças é descrito para as Síndomes de Angelman e de Prader-Willi. Estas síndromes se caracterizam em humanos pela perda de um segmento particular do braço longo do cromossomo 15, resultando em diferentes fenótipos, dependendo se a perda é no cromossomo derivado do macho ou da fêmea. Se o cromossomo defectivo vem do pai, a criança nasce com a síndrome de Prader-Willi e se vem da

mãe, a criança apresenta síndrome de Angelman. Estas diferenças envolvem metilação diferencial nas células germinais (Gilbert, 2000).

A metilação no DNA em muitos organismos eucariotos também está envolvida no processo de modificação de seqüências repetitivas as quais podem ter efeito deletério para o genoma hospedeiro, tais como elementos transponíveis (TEs) e vírus. Importantes evidências indicam que, em alguns casos, o papel da metilação do DNA está relacionado a silenciamento de transposons e retrovírus endógenos (Bird, 2002). A metilação de seqüências repetitivas também pode suprimir recombinações entre repetições em diferentes posições no genoma, as quais poderiam levar a translocações ou a outros rearranjos cromosômicos desfavoráveis (Bender, 1998).

A Metilação do DNA no Gênero *Drosophila*

Ao contrário do que ocorre com muitos grupos animais multicelulares, que têm seus genomas metilados (Tweedie *et al.*, 1997), pouco se sabe a respeito da metilação do DNA em invertebrados. Estudos recentes feitos com insetos, contudo, têm indicado uma aparente diversidade funcional que parece argumentar contra a conservação funcional estrita da metilação (Field *et al.*, 2004).

Até recentemente, o genoma de *Drosophila* era considerado livre ou com níveis não detectáveis de metilação (Urieli-Shoval *et al.*, 1982). As conclusões se estendiam a todo o gênero *Drosophila*, embora somente *D. melanogaster* tivesse

sido investigada. A partir de estudos recentes, no entanto, esse panorama começou a mudar. Esse pressuposto era baseado provavelmente na incapacidade de se detectar bases metiladas no genoma de espécies do gênero devido à falta de metodologias disponíveis com a sensibilidade necessária para tal. Dessa forma, *Drosophila* parecia constituir um grupo de organismos que não possui esta modificação epigenética do DNA que, por sua vez, é um fenômeno altamente conservado desde bactérias até humanos (revisão em Lyko *et al.*, 2006).

O que se imaginava então, é que a metilação do DNA seria um processo dispensável para organismos menos complexos (Bird, 1995) ou para aqueles genomas com seqüências não-canônicas de centrossomo (Dong *et al.*, 2001). Entretanto, o genoma de *Drosophila* não é mais considerado como particularmente simples (Adams *et al.*, 2000) e a organização centrossômica é conservada em um grande número de organismos, incluindo humanos (Blower *et al.*, 2002). Além disso, a metilação do DNA começou a ser descrita em várias outras espécies de insetos (Field *et al.*, 2004).

A presença de um suposto gene para DNA metiltransferase no genoma de *D. melanogaster* abriu a possibilidade de que a metilação do DNA neste organismo poderia ter escapado à detecção no passado. Experimentos mostraram que *Dnmt2* é regulada no genoma desta espécie de acordo com o desenvolvimento, com o rápido aumento dos níveis de expressão de mRNA durante o desenvolvimento inicial (Hung *et al.*, 1999; Lyko *et al.*, 2000). Esta descoberta direcionou subseqüentes

análises de metilação do DNA genômico a partir de embriões, ao invés dos estágios tardios de desenvolvimento utilizados em estudos prévios.

Análises cromatográficas do DNA genômico de estágios iniciais do desenvolvimento embrionário revelam um baixo, mas significativo nível de citosinas metiladas (Gowher *et al.*, 2000; Lyko *et al.*, 2000). De modo interessante, a maioria das 5-metilcitosinas foi encontrada em um contexto de dinucleotídeos CpT/A (Lyko *et al.*, 2000). Essa descoberta é de substancial interesse porque implica que a metilação do DNA em *Drosophila* não é mantida pela metilação simétrica de dinucleotídeos CpG, ao contrário do que acontece nos demais organismos estudados.

Também se sabe que apenas 0,4% do DNA total de *D. melanogaster* está metilado, sendo que estes níveis são detectados apenas em embriões no estágio inicial de desenvolvimento. Em contraste com as células de vertebrados, que estavelmente mantêm seus padrões de metilação ao longo do desenvolvimento, a metilação do DNA em *D. melanogaster* parece ser um sinal epigenético transiente durante os estágios iniciais do desenvolvimento (Hung *et al.*, 1999; Tweedie *et al.*, 1999; Lyko *et al.*, 2000; Lyko, 2001; Kunert *et al.*, 2003).

Apesar das diversas informações que existem atualmente em torno do processo de metilação do DNA no genoma de *Drosophila*, a função da metilação no genoma deste gênero ainda permanece sendo discutida.

Salzberg *et al.* (2004) identificaram seqüências metiladas a partir do genoma de moscas adultas de *D. melanogaster* com o uso de imunoprecipitação utilizando

um anticorpo anti-5-metilcitosina. Vinte e sete clones foram analisados e foram identificadas seqüências de retrotransposons e elementos relacionados a retrotransposons, incluindo os elementos *rover*, *R1Dm* e *Pilger*, além de elementos repetitivos de heterocromatina (repetições centroméricas e um satélite, o *dodeca*). Seqüências adicionais isoladas por esta metodologia incluem ainda DNAs que codificam proteínas *dusky*, *doublesex* e *soxneuro*, e ainda um homólogo que codifica uma RNA-helicase. Tendo em vista a identificação de algumas seqüências metiladas como sendo elementos de transposição, Salzberg *et al.* (2004) sugerem que esta modificação epigenética pode estar sendo responsável pela regulação dos TEs em *Drosophila*.

Esta idéia foi posteriormente analisada por Mandrioli & Borsatti (2006) e os autores relacionam o processo de metilação do DNA em *Drosophila* não ao controle de TEs, mas à regulação do processo de desenvolvimento, tendo em vista que foi muito pequena a representatividade de seqüências de TEs no conjunto de seqüências analisadas e que o elemento transponível *R1* que ocorre inserido dentro do gene 28S do rDNA é ativamente transcrito junto com o gene. Entretanto, como será descrito adiante, o silenciamento do gene *dDnmt2* (responsável por promover a metilação no DNA em *Drosophila*) não provoca efeitos fenotípicos detectáveis ao longo do desenvolvimento (Kunert *et al.*, 2003).

Mais recentemente Garcia *et al.* (2007) (Anexo I), relacionam o processo de metilação do DNA na espécie *D. willistoni* com um possível processo de compensação de dose, tendo em vista que entre as diferentes seqüências

metiladas que foram isoladas do genoma desta espécie, encontrava-se rDNA. Como estas seqüências estão localizadas em cromossomos sexuais e estão metiladas diferencialmente entre sexos, é possível que este fato seja indicativo de possível função da metilação dentro do processo de compensação de dose para genes ribossomais.

De uma forma geral, os dados parecem apontar para uma diversidade na função da metilação no genoma de diferentes espécies de *Drosophila*. Esta idéia pode ser corroborada pelo fato de que ao ser comparada à seqüência de aminoácidos da proteína dDnmt2 de *D. willistoni* e *D. melanogaster* (como será descrito adiante), apenas no domínio responsável pela função de metilação do DNA ocorre uma conservação das seqüências entre as espécies. O domínio responsável pelo reconhecimento da seqüência alvo a ser metilado é altamente variável, indicando que mesmo entre espécies do mesmo gênero, pode ocorrer uma variação nas seqüências alvo a serem metiladas (Garcia *et al.*, 2007).

A metiltransferase de *Drosophila*

O seqüenciamento do genoma de *D. melanogaster* revelou a presença de um único candidato a gene de metiltransferase, o qual pertence à família Dnmt2 das DNA-metiltransferases de eucariotos (Hung *et al.*, 1999; Tweedie *et al.*, 1999).

Com base na homologia das seqüências, as metiltransferases de animais podem ser subdivididas dentro de três famílias: Dnmt1, Dnmt2 e Dnmt3 (Colot &

Rossignol, 1999). Devido à sua preferência por dinucleotídeos CpG hemimetilados (Bestor & Ingram, 1983; Gruenbaum *et al.*, 1981), a enzima Dnmt1 é geralmente considerada a metiltransferase que tem como função primária copiar o padrão de metilação da fita parental para a nova fita de DNA, durante ou logo após a replicação (Kunert *et al.*, 2003).

A função da segunda família de DNA metiltransferases, Dnmt2, não está bem estabelecida, mas evidências recentes têm apontado que estas enzimas não têm função como DNA metiltransferase, apesar de funcionar como tal em células de camundongos e humanos (Liu *et al.*, 2003).

O papel da terceira família de metiltransferases tem sido definida pela sua preferência por DNA "desmetilado". Dnmt3a e Dnmt3b teriam a função de metiltransferase *de novo* (Hsieh, 1999; Lyko *et al.*, 2000; Okano *et al.*, 1999) e são consideradas importantes para o estabelecimento dos padrões de metilação do DNA durante a embriogênese (Kunert *et al.*, 2003).

No gênero *Drosophila* existem poucos trabalhos caracterizando metilação no genoma das espécies (Marhold *et al.*, 2004), pois, como citado anteriormente, os níveis de citosinas metiladas são baixos e não apresentam uma função relevante no genoma de *D. melanogaster*. Experimentos utilizando RNA de interferência (RNAi) nesta espécie confirmaram que existe somente uma DNA metiltransferase (dDnmt2) em *D. melanogaster*, mas não revelaram uma função para a metilação nesta mosca. O silenciamento da expressão de *dDnmt2* parece não ter conseqüências

detectáveis para o desenvolvimento embrionário em *D. melanogaster* (Kunert *et al.*, 2003).

Apesar disso, a metiltransferase dDnmt2 foi considerada ainda como a mais forte candidata para promover a metilação em *D. melanogaster*, tendo em vista que em experimentos onde havia superexpressão desta enzima em culturas celulares, as células tinham seus níveis de metilação do DNA aumentados. A atividade catalítica de dDnmt2 precisa, entretanto, da formação de multicomplexos *in vivo* e estes componentes ainda necessitam ser identificados (Reddy *et al.*, 2003).

Já foram identificadas, em *D. melanogaster*, algumas proteínas relacionadas à família das DNA metiltransferases de vertebrados. São elas: uma DmMTR1 similar à dnmt1 de vertebrados, que interage com outra proteína (PCNA) envolvida na replicação e reparo do DNA, e a DNMT2 (ou dDnmt2) que apresenta homologia com a região carboxi-terminal (domínio catalítico) da Dnmt2 de mamíferos (essencial no desenvolvimento embrionário inicial) e com a enzima *dcm* de bactérias (Hung *et al.*, 1999). Também um homólogo às proteínas da família MDB2/3 de vertebrados (que pode ou não se ligar em DNA metilado), a dMBD2/3, já foi descrito para *D. melanogaster*, sendo que esta proteína apresenta uma perda do domínio de ligação metil-CpG, corroborando uma hipótese de que *D. melanogaster* poderia ter perdido a capacidade em maior escala de metilação do DNA ao longo da evolução (Tweedie *et al.*, 1999).

O gene *dDnmt2* já foi identificado em outras espécies de dípteros, tais como *Anopheles gambiae*, *D. pseudoobscura*, *D. simulans*, *D. hydei* e *D. virilis*, sendo que

estas espécies demonstraram níveis comparáveis de 5-metilcitosina no seu DNA e uma forte conservação na seqüência de aminoácidos da proteína dDnmt2, indicando uma ampla distribuição do gene entre insetos dípteros (Marhold *et al.*, 2004).

Lyko *et al.* (2000), analisando a distribuição do gene *dDnmt2* em diferentes espécies do gênero e a expressão desse gene em *D. melanogaster*, não detectaram a seqüência do gene em *D. willistoni*, apesar da baixa estringência das condições de hibridação. Entretanto, Garcia *et al.* (2007) através de uma busca *in silico* no genoma da espécie, identificaram uma seqüência homóloga à *dDnmt2* no genoma de *D. willistoni* a qual é 33% divergente de *D. melanogaster*.

Além disso, existem outras interessantes diferenças que ocorrem no elemento *dDnmt2* de *D. willistoni*. A região promotora maior e a presença de somente uma isoforma da enzima com identidade de seqüências de aminoácidos de somente 70% com a proteína de *D. melanogaster* podem indicar importantes modificações que se refletiriam na expressão do gene ou na variação de função da enzima. Também ocorrem diferenças na conservação entre o domínio de reconhecimento do DNA alvo e do que promove a metilação do DNA na proteína *dDnmt2*. Somente o segundo é conservado entre as duas espécies (conforme citado anteriormente).

Dado o papel crucial das diversas Dnmts nas modificações epigenéticas do DNA, é, portanto, de grande interesse saber se existem agentes ambientais capazes de modificar os níveis intracelulares de tais enzimas ou seus padrões de expressão gênica (Guerrero-Bosagna *et al.*, 2005).

Técnicas para Análise da Metilação no DNA

Os estudos que revelam efeitos herdáveis, independentes de modificações na seqüência do DNA, utilizam diversas metodologias diferentes, devido à ampla variedade de objetivos (revisão em Jablonka, 2004).

Dentre elas, destacam-se DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography), HPLC (high-performance liquid chromatography), HPCE (high-performance capillary electrophoresis), COBRA (combined bisulfite restriction analysis) e MSRE (Methylation-sensitive restriction endonuclease).

Dentre os mais diversos métodos, o método de análise através do uso de endonucleases de restrição sensíveis à metilação (MSREs), por exemplo, tem sido amplamente utilizado para determinar o padrão de metilação de citosinas em sítios específicos (revisão em Dahl & Guldborg, 2003). Basicamente, este método avalia mudanças em padrões esperados de clivagem das seqüências, pois as citosinas metiladas impedem o acesso da enzima sensível a metilação aos seus sítios de reconhecimento.

Outra técnica recentemente difundida para a investigação da metilação do DNA é o Seqüenciamento Bissulfito, que consiste em analisar fragmentos de DNA gerados por PCR a partir de amostras de DNA previamente tratadas com Bissulfito de Sódio (NaHSO_3). O Bissulfito promove a desaminação das citosinas não metiladas gerando resíduos de uracil e os sítios metilados permanecem "protegidos" da atuação deste composto, permanecendo citosinas (figura 3).

A conversão da citosina a uracil pelo tratamento bissulfito é altamente seletiva e eficiente. A taxa de conversão química de todas as citosinas é estimada numa ordem de 99,5-99,7% (Grunau *et al.*, 2001; Clarck *et al.*, 1995). Para a maioria das aplicações esta taxa de conversão é mais do que suficiente e os baixos níveis de citosinas não convertidas são detectáveis somente por análises detalhadas de fragmentos clonados (Warnecke *et al.*, 2002).

Os iniciadores (*primers*) para PCR com amostras de DNA tratadas com bissulfito de sódio são desenhados para evitar sítios CpG e/ou CpNpG e, ao mesmo tempo, devem ser ricos em citosinas em sítios não CpG, permitindo dessa forma, a amplificação preferencial de moléculas inteiramente convertidas (Warnecke *et al.*, 2002). O objetivo de desenhar *primers* para análises quantitativas de metilação é amplificar seqüências metiladas e não metiladas com igual eficiência, evitando a amplificação de qualquer seqüência não convertida. De modo alternativo, pode-se desenhar *primers* para amplificar somente seqüências metiladas (Herman *et al.*, 1996).

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

Utilizando a técnica de MSREs (Methylation-sensitive restriction endonuclease), Garcia *et al.* (2007) (Anexo I) verificaram que o DNA genômico de machos e fêmeas adultos de duas populações de *Drosophila willistoni* apresenta um padrão de restrição sexo-específica bem definido dentro de cada população, sendo que os fragmentos diferenciais ocorrem no genoma de fêmeas. Estas modificações poderiam ser explicadas por modificação epigenética e não por herança mendeliana. As bandas suspeitas de estarem metiladas foram isoladas, clonadas, seqüenciadas e algumas analisadas através de técnica de hibridação em DNA genômico (*Southern blot*), demonstrando, de forma inédita, que várias regiões do genoma de *D. willistoni* estariam sujeitas a metilação, dentre elas, às de genes de DNA ribossomal. Em contrapartida, o DNA genômico de *D. melanogaster*, quando submetido à mesma análise, não apresentou fragmentos sexo-específicos. Além disso, estes padrões diferenciais de metilação são detectáveis, também, em diferentes estágios de desenvolvimento de *D. willistoni* (Garcia *et al.*, 2007).

Dentro do contexto do referido trabalho, o presente estudo chama especialmente a atenção ao fato de que *D. willistoni* apresenta uma ampla distribuição geográfica e uma grande variabilidade genética, que é expressa, principalmente, através de polimorfismo cromossômico e enzimático (Valente & Morales, 1985; Valente & Araújo, 1986; Valiati & Valente, 1997, Valente *et al.*, 1993). Ao comparar este genoma com o da espécie cosmopolita *D. melanogaster*, Garcia

et al. (2007) encontraram, de forma pioneira, a particularidade de metilação diferencial no genoma de *D. willistoni*.

Algumas questões levantadas por Garcia *et al.* (2007), portanto, foram: Qual a explicação para que espécies de um mesmo gênero (no caso, do mesmo subgênero *Sophophora*) apresentem um padrão distinto no *status* de metilação do DNA? Fatores ambientais relacionados aos ecossistemas onde os diferentes grupos de espécies evoluíram poderiam atuar como pressões seletivas diferenciais sobre este mecanismo de controle da expressão gênica? A resposta pode estar na história evolutiva de cada uma das espécies. *D. willistoni* é neotropical e *D. melanogaster* tem uma história evolutiva relacionada a regiões temperadas. Existem, atualmente, estudos indicando que agentes ambientais podem induzir alterações epigenéticas no DNA as quais modificam padrões de metilação e estes podem ser passados para a progênie e, conseqüentemente, fixados em uma linhagem (Waterland & Jirtle, 2003; Dolinoy *et al.*, 2006).

A partir, portanto, do vasto campo de investigação surgido pelo trabalho realizado de Garcia *et al.* (2007), se fez necessário avaliar qualitativa e quantitativamente o fenômeno de metilação no genoma de diferentes espécies do gênero *Drosophila*.

Análises neste sentido são importantes para esclarecer a história evolutiva dos diferentes grupos de espécies do gênero. O presente estudo tem como objetivo geral contribuir para o entendimento das razões pelas quais existe distinção na

ocorrência do fenômeno de metilação do DNA em espécies de um mesmo subgênero.

Para tanto os objetivos específicos foram os seguintes:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o padrão de metilação do DNA entre sexos em diferentes espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* (críptico e não críptico) e de outras espécies do subgênero *Sophophora* (*D. sturtevanti*, *D. neoelliptica*, *D. melanogaster*, *D. sechellia*, *D. pseudoobscura* e *D. subobscura*), a fim de verificar se os padrões de metilação diferencial do DNA genômico podem ser conservados em outros grupos de espécies utilizando:

A. Metodologia de MSREs (Methylation-Sensitive Restriction Endonucleases) na tentativa de verificar a ocorrência ou não de conservação dos padrões sexo específicos.

B. Seqüenciamento Bissulfito, para verificar se existe conservação nos sítios metilados de rDNA entre as espécies que apresentaram padrão diferencial de metilação detectável por MSREs.

2. Verificar através da técnica de MSREs combinada com *Southern blot*, se o rDNA também apresenta metilação diferencial entre sexos nas diferentes espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* (críptico e não críptico), tal como ocorre em *Drosophila willistoni*.

Metilação sexo-específica em *Drosophila*: uma investigação no subgênero *Sophophora*

Marícia Fantinel D'Ávila. (Dep. de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil) ✉ maryfantinel@gmail.com

Rosane Nunes Garcia. (Dep. de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil)**

Vera Lúcia da Silva Valente. (Dep. de Genética, Caixa Postal 15053; fax: (51) 3308-7311, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 91501-970; Porto Alegre, RS, Brasil)**

* Trabalho em preparação a ser submetido para a revista *Insect Molecular Biology*.

** Estes autores contribuíram igualmente.

RESUMO

Fenômenos epigenéticos têm sido amplamente caracterizados, principalmente no genoma de vertebrados, mas as implicações evolutivas que podem ocorrer por influência destes fenômenos só mais recentemente vêm sendo discutidas. Experimentos têm comprovado que elementos externos, como por exemplo, determinados compostos químicos presentes na dieta podem modificar padrões de metilação do DNA, sendo que estas modificações podem posteriormente ser fixadas em populações, colaborando para o surgimento de novidades evolutivas entre as espécies. No presente trabalho, analisando espécies do subgênero *Sophophora*, que apresentam diferentes histórias evolutivas e exploram ambientes divergentes, buscamos identificar a recorrência do fenômeno de metilação sexo-específica do rDNA como descrito previamente para a espécie *D. willistoni*. Utilizando as técnicas de seqüenciamento e PCR bissulfito, nós demonstramos que o gene 28S apresenta-se metilado nas espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*, bem como na espécie *D. melanogaster*, corroborando a hipótese de que, em insetos, as regiões internas dos genes estão metiladas. Utilizando também as técnicas de MSRE combinada com *Southern blot*, buscamos verificar se o fenômeno de metilação diferencial entre é recorrente em algumas espécies dos grupos *willistoni*, *melanogaster*, *saltans* e *obscura* de *Drosophila*. Verificamos que a metilação diferencial entre sexos do rDNA ocorre exclusivamente nas espécies do subgrupo *willistoni*, com exceção da espécie *D. paulistorum*. Estes resultados indicam que o fenômeno de metilação do DNA pode apresentar diferenças importantes mesmo entre espécies relacionadas, sendo que o ambiente

no qual estas espécies evoluem e tempos evolutivos menores de surgimento das novidades ligadas aos fenômenos epigenéticos, podem ser os responsáveis pela construção deste panorama.

Palavras-chave: *Drosophila*; metilação do DNA; *Sophophora*; subgrupo *willistoni*, rDNA.

INTRODUÇÃO

A herança epigenética envolve a transmissão de informações que não são codificadas pelas seqüências de DNA de uma célula para a célula filha ou de geração para geração. Muitos dos sistemas epigenéticos foram descobertos devido à aparente instabilidade genética ou a desvios nas proporções de heranças mendelianas esperadas (Richards, 2006). O fenômeno epigenético é caracterizado por um genótipo que pode apresentar fenótipos alternativos, os quais são baseados no estado epigenético de um ou mais locus dentro do genoma. Dentre os diversos tipos de processos epigenéticos que se conhecem estão fenômenos como metilação, fosforilação, ubiquitinação e acetilação (Malakhova *et al.*, 2003). Talvez o mais conhecido destes seja a metilação do DNA (Weinhold, 2006), que consiste, basicamente, na adição de grupamentos metil na posição C5 de citosinas (Gruenbaum *et al.*, 1981). Em eucariotos, as citosinas são convertidas a 5-metilcitosinas pela ação enzimática das metiltransferases após a replicação do DNA e em torno de 5% do genoma dos mamíferos é metilado. Atualmente, sabe-se que a metilação do DNA é um dos principais mecanismos epigenéticos e hereditários que

regulam a expressão genética em células de mamíferos (Khosla *et al.*, 2001). Ao contrário do que ocorre com muitos grupos animais multicelulares, que tem seus genomas metilados (Tweedie *et al.*, 1997), pouco se sabe a respeito da metilação do DNA em invertebrados.

Estudos recentes feitos no gênero *Drosophila*, contudo, tem demonstrado as particularidades do fenômeno da metilação do DNA em algumas espécies. Análises cromatográficas do DNA genômico de *D. melanogaster* nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário revelam um baixo, mas significativo nível de citosinas metiladas (Gowher *et al.*, 2000; Lyko *et al.*, 2000). A maioria das 5-metilcitosinas foi encontrada em um contexto de dinucleotídeos CpT/A (Lyko *et al.*, 2000). Essa descoberta é de substancial interesse porque implica que a metilação do DNA em *Drosophila* não é mantida pela metilação simétrica de dinucleotídeos CpG, ao contrário do que acontece nos demais organismos estudados. Também se sabe que apenas 0,4% do DNA total de *D. melanogaster* está metilado, sendo que estes níveis são detectados apenas em embriões no estágio inicial de desenvolvimento. Em contraste com as células de vertebrados, que estavelmente mantêm seus padrões de metilação ao longo do desenvolvimento, a metilação do DNA em *D. melanogaster* parece ser um sinal epigenético transiente durante os estágios iniciais do desenvolvimento (Hung *et al.*, 1999; Tweedie *et al.*, 1999; Lyko *et al.*, 2000; Lyko, 2001; Kunert *et al.*, 2003).

Apesar das diversas informações que existem atualmente em torno do processo de metilação do DNA de *Drosophila*, a função da metilação no genoma

deste gênero ainda permanece sendo discutida. Salzberg *et al.* (2004) identificaram seqüências metiladas a partir do genoma de moscas adultas de *D. melanogaster* com o uso de imunoprecipitação utilizando um anticorpo anti-5-metilcitosina. Vinte e sete clones foram analisados e foram identificadas seqüências de retrotransposons e elementos relacionados a retrotransposons, incluindo os elementos *rover*, *R1Dm* e *Pilger*, além de elementos repetitivos de heterocromatina (repetições centroméricas e um satélite, o *dodeca*). Seqüências adicionais isoladas por esta metodologia incluem ainda DNAs que codificam proteínas *dusky*, *doublesex* e *soxneuro*, e ainda um homólogo que codifica uma RNA-helicase. Tendo em vista a identificação de algumas seqüências metiladas como sendo elementos de transposição, Salzberg *et al.* (2004) sugerem que esta modificação epigenética pode estar sendo responsável pela regulação dos elementos transponíveis em *Drosophila*.

Esta idéia foi posteriormente analisada por Mandrioli & Borsatti (2006) e os autores relacionam o processo de metilação do DNA em *Drosophila* não ao controle de Elementos Transponíveis, mas à regulação do processo de desenvolvimento, tendo em vista que foi muito pequena a representatividade de seqüências de TEs no conjunto de seqüências analisadas por Salzberg *et al.* (2004) e que o elemento transponível *R1* que ocorre inserido dentro do gene 28S do rDNA é ativamente transcrito junto com o gene. Entretanto, o silenciamento do gene *dDnmt2* (responsável por promover a metilação no DNA em *Drosophila*) não provoca efeitos fenotípicos detectáveis ao longo do desenvolvimento (Kunert *et al.*, 2003).

Mais recentemente, Garcia *et al.* (2007) relacionam o processo de metilação do DNA na espécie *D. willistoni* com um possível processo de compensação de dose, tendo em vista que entre as diferentes seqüências metiladas que foram isoladas do genoma desta espécie, encontrava-se rDNA que são seqüências localizadas em cromossomos sexuais.

De uma forma geral, os dados parecem apontar para uma diversidade na função da metilação no genoma de diferentes espécies de *Drosophila*. Esta idéia pode ser corroborada pelo fato de que ao ser comparada a seqüência de aminoácidos da proteína dDnmt2 de *D. willistoni* e *D. melanogaster*, apenas no domínio responsável pela função de metilação do DNA ocorre uma conservação das seqüências entre as espécies. O domínio responsável pelo reconhecimento da seqüência alvo a ser metilado é altamente variável, indicando que mesmo entre espécies do mesmo gênero, pode ocorrer uma variação nas seqüências alvo a serem metiladas (Garcia *et al.*, 2007).

Mas qual a explicação para que espécies de um mesmo gênero (no caso, do mesmo subgênero *Sophophora*) apresentem um padrão distinto no *status* de metilação do DNA? Fatores ambientais relacionados aos ecossistemas onde os diferentes grupos de espécies evoluíram poderiam atuar como pressões seletivas diferenciais atuantes sobre este mecanismo de controle da expressão gênica? A resposta para estas perguntas poderia estar na história evolutiva de cada uma das espécies? *D. willistoni* é neotropical e *D. melanogaster* evoluiu a partir de uma linhagem *proto-melanogaster* de regiões temperadas, que se expandiu para a

região afrotropical (Throckmorton, 1975). Existem, atualmente, estudos indicando que agentes ambientais podem induzir alterações epigenéticas no DNA as quais modificam padrões de metilação e estes podem ser passados para a progênie e, conseqüentemente, fixados em uma linhagem (Waterland & Jirtle, 2003; Dolinoy *et al.*, 2006). Além disso, a metilação do DNA é capaz de ser modificada pela ação de agentes externamente aplicados (MacPhee, 1998). Alguns compostos particulares encontrados na natureza poderiam atuar como tais agentes. Dessa forma, eles poderiam ser capazes de afetar a evolução dos organismos, induzindo profundas mudanças em indivíduos e populações, talvez com conseqüências transgeracionais (Guerrero-Bosagna *et al.*, 2005).

Jablonka e Lamb em 1995, no livro "*Epigenetic Inheritance and Evolution, The Lamarckian Dimension*", descrevem os Sistemas de Herança Epigenética (EIS) indicando-os como um canal adicional para transmissão de variação herdável entre gerações de células e sugerindo a interação desta variação com os Sistemas de Herança Genética (GIS). Os EIS, segundo as autoras, podem responder mais rapidamente às mudanças ambientais em ciclos intermediários (com escalas de tempo menores), gerando alterações evolutivas mais rápidas do que as mutações randômicas e seleção de variação de seqüência nucleotídica (revisão em Griesemer, 1998).

Tendo em vista a variação detectada do fenômeno de metilação do DNA em diferentes espécies de um mesmo gênero de *Drosophila* e a possibilidade de que fatores ambientais possam estar determinando esta variação, o presente

trabalho tem o intuito de contribuir para o conhecimento do quanto o fenômeno de metilação diferencial do DNA está conservado em espécies relacionadas ou não e o quanto isto pode estar ligado à história evolutiva de cada uma. Através de análise por MSRE combinada com *Southern Blot* e sequenciamento bissulfito, bem como detecção da presença do gene da *dDnmt2* através de PCR, nós verificamos que o fenômeno de metilação diferencial entre sexos do rDNA está conservado somente em espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila*. Também ficou demonstrado que em todas as espécies estudadas do subgrupo e em *D. melanogaster*, o gene 28S está metilado.

RESULTADOS

Os DNAs genômicos totais de indivíduos adultos (machos e fêmeas) de espécies do subgrupo *willistoni* (*D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. insularis*, *D. equinoxialis* e *D. tropicalis*) foram digeridos com as enzimas de restrição *AluI* (5'AG↓CT3') e *HaeIII* (5'GG↓CC3'), ambas sensíveis à metilação e *RsaI* (5'GT↓AC3') que não é sensível à metilação. Como controle do experimento foi clivado também o DNA de *D. melanogaster*. As enzimas *AluI* e *HaeIII* geraram padrões de clivagem diferenciais entre sexos nas espécies do subgrupo *willistoni*, após serem fracionados em gel de agarose 1%. Contudo a diferença entre machos e fêmeas não foi verificada no DNA de *D. melanogaster* para todas as enzimas, bem como também não foram encontradas diferenças no padrão de clivagem entre sexos para a enzima *HaeIII* em *D. insularis*.

Também foi observado que padrão de metilação diferencial entre sexos é conservado dentro do subgrupo *willistoni*, mas o padrão de fragmentos gerado pelas enzimas de restrição *AluI* e *HaeIII* é diferente entre as espécies. As espécies *D. insularis*, *D. equinoxialis* e *D. tropicalis*, por exemplo, apresentam visíveis padrões de clivagens diferentes entre si e diferentes dos padrões de *D. willistoni*. O padrão de clivagem com a enzima *RsaI* foi o mesmo para todas as espécies analisadas e entre sexos (figuras 1A e 1B).

Figura 1 aqui

Para a técnica de MSRE combinada com *Southern blot* os DNAs genômicos de machos e fêmeas adultos das espécies apresentadas na tabela 1, foram clivados com as enzimas de restrição *AluI* (5'AG↓CT3') e *TaqI* (5'TC↓GA3'), que não constituem um par de isosquisômeros mas possuem sítios de restrição semelhante, sendo que, como descrito anteriormente, a *AluI* é sensível à metilação e a *TaqI* cliva independente de seu sítio de reconhecimento possuir a citosina metilada. Após a eletroforese em gel de agarose 0,8%, os fragmentos foram analisados por *Southern blot* com a sonda pDm 238, que contém os genes do rDNA de *D. melanogaster*.

As análises por *Southern blot* não revelaram diferenças nos padrões entre os sexos para as espécies *D. sturtevanti* e *D. neoelliptica* (grupo *saltans*), *D. melanogaster* e *D. sechellia* (grupo *melanogaster*) e *D. pseudoobscura* e *D. subobscura* (grupo *obscura*) (Figura 2), bem como para as espécies *D. nebulosa*, *D. capricorni* e *D. fumipennis* (grupo *willistoni*) (Figura 3).

Figura 2 aqui

Figura 3 aqui

Nas espécies do subgrupo *willistoni*, no entanto, os resultados revelam que o padrão diferencial de metilação entre sexos é um fenômeno que ocorre nas

espécies *D. tropicalis*, *D. insularis* e *D. equinoxialis* que são do subgrupo críptico ao qual pertence a já estudada *D. willistoni*, o subgrupo *willistoni*. A exceção ocorre para a espécie *D. paulistorum* que não apresenta diferenças entre machos e fêmeas para o padrão de bandas (Figura 4).

Figura
4 aqui

Os DNAs das espécies do subgrupo *willistoni* foram posteriormente submetidos à conversão com bissulfito de sódio e análise por PCR com um primer desenhado para anelar no gene 28S e amplificar somente se a região em análise estivesse metilada. Os DNAs de *D. willistoni*, *D. melanogaster* e amostras de DNA não submetidas a conversão foram utilizadas como controle. Ocorreu amplificação em DNA tratado e não tratado com bissulfito de sódio, indicando que a região estudada do gene ribossomal 28S está metilada (Figura 5).

Figura
5 aqui

Os fragmentos das espécies *D. willistoni* (dados não mostrados) e *D. paulistorum* (Figura 6) tratados e não tratados com bissulfito de sódio foram purificados e submetidos a seqüenciamento automático, a fim de verificar quais sítios particulares dentro da seqüência que apresentavam metilação. Foi demonstrado que todas as citosinas estão metiladas na região analisada, pois a seqüência tratada com bissulfito não difere do controle não tratado. A metilação ocorre nos duplets CpT, CpA e também em CpT e CpG.

Figura
6 aqui

Para atestar a eficiência da conversão com bissulfito de sódio, apesar de a taxa de conversão química de todas as citosinas ser estimada em uma ordem de 99,5%-99,7% (Grunau *et al.*, 2001; Clark and Frommer, 1995), as mesmas amostras de DNAs das espécies do subgrupo *willistoni* foram submetidas a PCR com *primers* do

gene de β -actina. Este gene foi escolhido como controle da conversão porque está descrito previamente como não metilado em diferentes organismos tais como *Psammochinus miliaris* e *Branchiostoma lanceolatum* (Tweedie et al., 1997). Exclusivamente nas amostras de DNA tratadas com bissulfito de sódio não houve amplificação do gene, indicando que houve conversão das citosinas não metiladas e isto não permitiu o anelamento dos *primers* para amplificação (Figuras 7).

Figura
7 aqui

A análise da presença do gene *dDnmt2* nas espécies do subgrupo *willistoni* (*D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, *D. insularis* e *D. tropicalis*) por PCR, demonstrou que, apesar do fragmento amplificado apresentar o tamanho esperado (891pb), a quantidade final de produto é menor do que nas espécies utilizadas como controle positivo (*D. melanogaster*, *D. virilis* e *D. hydei*) (figura 8). Os resultados sugerem que, mesmo sendo o gene *dDnmt2* altamente conservado entre dípteros, nas espécies do subgrupo *willistoni* parece haver uma menor identidade na seqüência de nucleotídeos que codifica o motivo catalítico da enzima, em relação às espécies utilizadas como controle.

Figura
8 aqui

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que o fenômeno de metilação diferencial do DNA em *D. willistoni* descrito por Garcia et al. (2007), ocorre também em outras espécies proximoamente relacionadas a ela. Através de técnica de MSRE combinada com *Southern blot* e seqüenciamento bissulfito, foi possível

levantar algumas questões importantes relacionadas à diversidade na forma como o fenômeno de metilação do DNA pode ocorrer, mesmo em espécies próximas.

Nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, nos quais foi verificado que no genoma de espécies do gênero *Drosophila* a metilação ocorre preferencialmente em sítios CpT e CpA (Lyko *et al.*, 2000; Kunert *et al.*, 2003 e Garcia *et al.*, 2007). Entretanto, também encontramos metilação em sítios CpC e CpG no gene 28S, coincidindo com os resultados de Garcia *et al.* (2007) que, através de análise com as enzimas de restrição *HaeIII* (5'GG↓CC3'), e os isoesquizômeros *MspI* (5'C↓CGG3') e *HpaII* (5'C↓CGG3') detectaram que estes duplets também estariam metilados no DNA ribossomal de *D. willistoni*.

Embora nossos resultados tenham demonstrado que o fenômeno de metilação diferencial esteja presente em espécies muito relacionadas tais como as do subgrupo *willistoni*, ele apresenta um grau de variação considerável que vai desde uma similaridade total com *D. willistoni*, no caso de *D. tropicalis* (referindo-se aqui ao padrão de bandas observadas através de *Southern Blot*) até uma ausência de diferenças no padrão sexo-específico, como observado em *D. paulistorum* (figura 4).

Cabe chamar atenção para dois detalhes importantes: (a) o fato de que, ao observar os padrões de clivagem obtidos com a enzima *AluI* em *D. paulistorum*, estes se assemelham aos padrões de *D. willistoni* (figura 1A e 1B). Entretanto, os resultados obtidos em *Southern blot* demonstram que as diferenças observadas entre machos e fêmeas não estão relacionadas aos genes ribossomais. (b) O

padrão de clivagem observado em *D. insularis* para a enzima *AluI* semelhante entre machos e fêmeas (figura 1A) num primeiro momento parece indicar que não ocorrem diferenças sexo-específicas. Porém, as análises através de *Southern blot* demonstraram que o padrão de bandas sexo-específico está em fragmentos menores (~1,2kb) do rDNA (figura 4) não detectadas em gel de agarose. Através destes resultados, nós demonstramos que o processo de metilação do rDNA pode ser um marcador promissor para distinguir espécies intimamente relacionadas pertencentes ao subgrupo *willistoni*.

Estudos já realizados investigando as relações filogenéticas do subgrupo críptico *willistoni* não são de todo conclusivos, porém alguns trabalhos como os de Ayala *et al.* (1974) e O'Grady & Kidwell (2002) descrevem *D. willistoni* e *D. tropicalis* como as espécies mais próximas dentro do subgrupo *willistoni*. O estudo de O'Grady & Kidwell (2002), inclusive, além de utilizar os genes *Adh* (alcohol dehydrogenase) e *COII* (cytochrome oxidase II) para a construção da filogenia, utilizou o gene 28S. Corroborando essa idéia, em nossos resultados, por exemplo, os padrões de clivagem de *D. tropicalis* se assemelham àqueles demonstrados por Garcia *et al.* (2007) para a enzima *Alu I* em *D. willistoni*.

Dessa forma, os padrões de clivagem distintos nas diferentes espécies do subgrupo críptico *willistoni* (grupo *willistoni*) surgem como mais um marcador molecular capaz de distinguir espécies praticamente idênticas morfologicamente. Esta metodologia pode ser aplicável principalmente para diferenciar as espécies *D. willistoni* e *D. paulistorum* que possuem as distribuições mais amplas dentre as

espécies do subgrupo, além de ocorrerem em simpatria. Convém observar que as espécies do grupo *willistoni* apresentam um alto grau de variabilidade genética, comprovada através de um amplo polimorfismo cromossômico e enzimático (Da Cunha *et al.*, 1950; Valente & Morales, 1985; Ayala e Powell, 1972; Valente & Araújo, 1986; Valente *et al.*, 1993; Valiati & Valente, 1997) e em nossos resultados encontramos evidências de que esta variabilidade também ocorre em nível epigenético.

É interessante destacar que mesmo as espécies que não apresentam metilação diferencial entre sexos para o gene 28S, tem esta região do genoma metiladas, como comprovado através do seqüenciamento e PCR bissulfito para as espécies *D. melanogaster* e *D. paulistorum*. Este fenômeno provavelmente está relacionado ao fato de que rDNA já foi descrito como metilado em diferentes organismos, sendo a metilação responsável pela regulação da expressão deste grupo de genes. A metilação parcial em genes de rDNA ocorre em diversos organismos tais como peixes e anfíbios (Tweedie *et al.*, 1997), ratos (Santoro & Grummt, 2005), no protozoário parasita *Entamoeba histolytica* (Fisher *et al.*, 2003) e em humanos, onde alguns estados aberrantes da metilação em genes ribossomais podem estar associados ao câncer (Ghoshal *et al.*, 2004). O estado ativo ou silenciado dos genes de rDNA é determinado pelo padrão de metilação e modificação específica das histonas a ele associadas (Santoro & Grummt, 2005).

De uma forma geral, nosso trabalho aponta para uma ampla conservação da presença do processo de metilação do DNA em diferentes espécies de

Drosophila. A amplificação do gene *dDnmt2* nas espécies do subgrupo *willistoni* confirma que todas as espécies analisadas possuem uma conservação na região catalítica do gene como previamente descrito por Marhold *et al.* (2004). Estes autores testaram o DNA genômico de várias espécies de *Drosophila* para a presença de metilação do DNA a partir de amostras de DNA genômico de embriões das espécies *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. pseudoobscura*, *D. hydei* e *D. virilis*, sugerindo uma conservação geral da metilação do DNA em drosofilídeos. Além disso, a identidade de uma seqüência homóloga ao gene *dDnmt2* já foi identificada em *D. willistoni* por Garcia *et al.* (2007), através de busca *in silico* na seqüência do genoma desta espécie.

Apesar de encontrarmos uma conservação em parte do gene responsável pela metilação em *Drosophila*, não é possível assumir que a função da metilação no genoma das diferentes espécies possa ser equivalente, mesmo em espécies proximamente relacionadas tais como *D. willistoni* e *D. paulistorum*, tendo em vista que esta última não apresenta metilação sexo-específica. Um fator importante que corrobora esta idéia são os resultados descritos por Garcia *et al.* (2007) que, ao comparar as seqüências das proteínas Dnmt2 de *D. melanogaster* e *D. willistoni*, verificou que existem variações no domínio responsável pelo reconhecimento da seqüência a ser metilada.

Por tudo isso, a idéia de que a história evolutiva das espécies do subgrupo *willistoni* pode ser um fator determinante para o surgimento da metilação diferencial entre sexos, que pôde ser observado em quatro das cinco espécies examinadas

para este fenômeno, deve ser considerada. Podemos aqui retomar os trabalhos que descrevem alguns fatores ambientais como promotores de modificações epigenéticas (Waterland & Jirtle, 2003; Guerrero-Bosagna *et al.*, 2005; Dolinoy *et al.*, 2006). Além disso, a ocorrência e fixação de tais modificações em uma linhagem podem acontecer em uma escala de tempo menor do que aquela determinada para mutações randômicas e seleção de seqüências de nucleotídeos (revisão em Jablonka, 2004). As espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila* (subgrupos *willistoni* e *bocainensis*) evoluíram em regiões neotropicais da América do Sul, que consiste um ambiente totalmente diferenciado, quando comparado aos locais de origem dos demais grupos de espécies já analisados. E isto poderia ter favorecido o surgimento desta modificação epigenética em uma linhagem ancestral. As espécies pertencentes ao subgrupo *bocainensis* são mais basais que as do subgrupo *willistoni* de acordo com as filogenias consenso descritas (O'Grady & Kidwell, 2002, Ayala *et al.*, 1974, Gleason *et al.*, 1998). A ausência da metilação diferencial entre sexos em *bocainensis* poderia ser explicada, então, pelo tempo de surgimento do fenômeno.

Embora altamente conservada desde leveduras e fungos até plantas e vertebrados, a metilação do DNA em insetos permanece enigmática. Existem evidências de seqüências metiladas em sítios CpG para muitas espécies de insetos (Field, 2000; Field *et al.*, 2004), mas nenhuma metiltransferase exclusiva de invertebrados foi descrita até agora.

Wang *et al.* (2006) identificaram genes relacionados a *Dnmt1* e *Dnmt3* de vertebrados no genoma de *Apis mellifera*, sugerindo sistemas de metilação

semelhantes ao de vertebrados que ocorreriam amplamente em insetos. Entretanto, como em *Drosophila* esse modelo geral seguido pela maioria dos insetos não é conservado, existem muitos aspectos evolutivos a serem explorados sobre a regulação do genoma por modificações epigenéticas, incluindo a aparente perda da metilação simétrica preferencial em sítios CpG nas espécies de *Drosophila* até agora estudadas.

Algumas diferenças importantes ocorrem na metilação de *A. mellifera* em relação ao sistema dos vertebrados. Um deles é que a metilação deste inseto está predominantemente limitada a regiões codificantes de genes (Wang *et al.*, 2006). Os dados obtidos para *A. mellifera* corroboram trabalhos anteriores como o de Salzberg *et al.* (2004), por exemplo, que já haviam identificado genes metilados de *Drosophila* predominantemente dentro de porções codificantes (como nós também constatamos para o gene 28S de *D. melanogaster* e das espécies do subgrupo *willistoni*). Logo, não há como relacionar a função da metilação em insetos com aquela atribuída a vertebrados, onde o fenômeno vem sendo bastante estudado.

Segundo Simmen (1999), a metilação dentro de genes pode ser positivamente correlacionada com a transcrição, podendo prevenir a ocorrência de transcritos iniciados erroneamente através do silenciamento de promotores ilegítimos. Além disso, a presença de metilação em insetos poderia ser essencial para direcionar o início da transcrição em promotores verdadeiros a fim de garantir a expressão de genes suscetíveis a interferência transcricional (Mandrioli, 2004).

De uma forma geral, o presente trabalho veio contribuir para consolidar a idéia de que a metilação em insetos ocorre preferencialmente em regiões codificantes de genes. Mas é importante considerar que os dados obtidos aqui apontam também para a ocorrência de uma grande variação funcional da metilação em insetos, tendo em vista que genes ribossomais modificados epigeneticamente podem estar relacionados a outro tipo de função da metilação nos genomas até agora não identificada. Para uma completa compreensão deste fenômeno, torna-se, portanto necessário, observar a questão não somente pelo ângulo funcional, mas também explorar aspectos evolutivos particulares de cada espécie que podem influenciar fortemente nessa grande diversidade.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Espécies utilizadas no estudo

Buscando encontrar indicações das possíveis causas de diferenças nos padrões de metilação entre espécies do mesmo gênero e visando testar a hipótese de que o ambiente pode ser determinante para este padrão distinto encontrado nas diferentes espécies do gênero *Drosophila*, analisamos as espécies contidas na Tabela 1. Trata-se de espécies do subgênero *Sophophora*, (ao qual pertence *D. willistoni*), mas de clados distintos – grupos de origem Holártica, Afrotropical e Neotropical – que apresentam diferentes histórias evolutivas e exploram ambientes divergentes, conforme indicado na tabela 1.

Isolamento do DNA genômico e Análises com a técnica MSRE (Methylation-Sensitive Restriction Endonuclease)

As linhagens das espécies utilizadas no trabalho foram mantidas em meios de cultura (Marques *et al.*, 1966 e Burdick, 1954), em câmaras a $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com 60% de Umidade Relativa. O DNA genômico de machos e fêmeas adultos foi extraído de acordo com os métodos de Sassi *et al.* (2005) e Lodhi *et al.* (1994). As endonucleases de restrição sensíveis e não sensíveis a metilação utilizadas estão indicadas na Tabela 2. A digestão foi feita de acordo com as instruções dos fabricantes. A quantidade de DNA usada em cada procedimento foi de aproximadamente 10 μg . Todas as amostras foram fracionadas em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. Os marcadores de peso moleculares utilizados foram 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen®).

Análises por Southern blot

A sonda utilizada nos experimentos foi o plasmídeo pDm 238 (Tautz *et al.*, 1988) que contém uma unidade completa do DNA ribossomal de *D. melanogaster* (12 kb), incluindo os genes 28S, 18S, 5.8S e 2S, além das regiões espaçadoras ITS, IGS, ETS (GenBank M21017 and M29800). A sonda foi marcada pelo método *random primer* utilizando o *kit* Gene Images® (GE Healthcare). O DNA das amostras foi fracionado em gel de agarose 0,8%, transferido para uma membrana Hybond N+ (GE Healthcare) e hibridado de acordo com o protocolo do fabricante a 60°C . A membrana foi lavada duas vezes a 60°C , primeiramente com SSC 1X e SDS 0,1% e

após com SSC 0,5X e SDS 1%, sob agitação por 15 min em ambos os casos. Para a detecção foi utilizado o método do kit CPDStar® (GE Healthcare).

Seqüenciamento e PCR Bissulfito de um fragmento do gene 28S

Cinco µg de DNA das espécies que apresentaram metilação diferencial foram tratadas com Bissulfito de Sódio (NaHSO₃). O DNA foi extraído conforme os protocolos de Sassi *et al.* (2005) e Lodhi *et al.* (1994) e a seguir as amostras foram tratadas conforme protocolo adaptado disponível na URL <http://www.protocol-online.org/prot/Detailed/3160.html>). O par de *primers* utilizado para amplificar um fragmento do gene 28S após o tratamento com bissulfito de sódio foi F: 5' ATA GGG GGG AAA GAG CAA TCG 3' e R: 5' GAC TTC CCT TAC CTA CAT TA 3' que anelam na região interna do gene, amplificam exclusivamente seqüências metiladas e geram um fragmento de aproximadamente 1,1Kb. As condições de reação foram: 45s a 94°C, 45s a 53°C e 1min a 72°C para um total de 30 ciclos. Amostras de DNA não tratados com bissulfito de sódio também foram submetidas à amplificação com este mesmo par de *primers* como controle. Os produtos de PCR bissulfito e das amostras controles foram diretamente purificados por incubação a 37°C por 30 min com exonuclease I e *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) seguida por uma inativação de 15 min a 80°C. Posteriormente foram submetidos a seqüenciamento automático (MegaBACE 500) e os alinhamentos múltiplos das seqüências foram feitos com o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). A análise dos cromatogramas foi feita através do programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Como controle para eficiência da conversão foi utilizado um par de *primers* que amplifica um fragmento de 733 pb da posição nucleotídica 1262 a 2005 do gene de β -actina de *D. melanogaster*: F: 5'-AAT CAC CAT CGG CAA CGA G-3' e R: 5'-AAG CAC TTG CGG TGG ACG AT-3' (GenBank M18829).

Detecção do gene da dDnmt2 através de PCR

O par de primers para *dDnmt2* e as condições da reação utilizadas são descritos por Marhold et al. (2004). Na espécie *D. willistoni* a seqüência completa do gene *dDnmt2* já foi caracterizada por Garcia et al. (2007) (seqüência disponível-<http://www.ufsm.br/labdros/links/seqswill.fasta>) e os primers descritos por Marhold et al. (2004) anelam na região do gene que codifica a isoforma B da enzima *dDnmt2*, promovendo amplificação de um fragmento que se estende das posições dos nucleotídeos 1907 a 2888. As espécies analisadas foram as do subgrupo *willistoni*: *D. willistoni* (Itaqui, RS, Brasil), *D. paulistorum* (Andino-Brasileira, R. Preto, SP, Brasil), *D. equinoxialis* (C. México, México), *D. tropicalis* (San Salvador, El Salvador) e *D. insularis* (Saint Kitts, Caribe). Como controle positivo, foram utilizadas as mesmas espécies de Marhold et al., 2004: *D. melanogaster*, *D. hydei* e *D. virilis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashburner, M. (1989) The family Drosophilidae. Chapter 35 in *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 1331p.
- Ayala, F.J. and Powell, J.F. (1972) Allozymes as Diagnostic Characters of Sibling Species of *Drosophila*. *PNAS* **69**(5): 1094-1096.
- Ayala, F.J., Tracey, M.L., Hedgecock, D. and Richmond, R. C. (1974) Genetic Differentiation During the Speciation Process in *Drosophila*. *Evolution*, **28**(4): 576-592.
- Burdick, A.B. (1954). New medium of reproductive quality stable at room temperature. *Dros Inf Serv* **28**: 170.
- Clark, S.J. and Frommer, M. (1995) Deamination with NaHSO₃ in DNA methylation studies in: Saluz, H. P. and Wiebauer, K. *DNA and Nucleoprotein Structure In Vivo*. Springer Verlag. Heidelberg, Germany, pp. 123-135.
- Da Cunha, A.B., Burla, H. and Dobzhansky, T. (1950) Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution* **4**: 212-235.
- Dolinoy, D.C., Weidman, J.R., Waterland, R.A. and Jirtle, R.L. (2006) Maternal Genistein Alters Coat Color and Protects A^{yy} Mouse Offspring from Obesity by Modifying the Fetal Epigenome. *Environmental Health Perspectives* **114**(4): 567-572.
- Field, L.M. (2000) Methylation and expression of amplified esterase genes in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem J.* **349**: 863–868.
- Field, L.M., Lyko, F., Mandrioli, M. and Prantera, G. (2004) DNA methylation in insects. *Insect Mol. Biol.* **13**(2): 109-115.
- Fisher, O., Siman-Tov, R. and Ankri, S. (2004) Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Ehmeth) in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res* **32**(1): 287–297.

- Garcia, R.N., D'Ávila, M.F., Loreto, E.L.S., Panzera, Y., Heredia, F.O. and Valente, V.L.S. (2007) First evidence of methylation in the genome of *Drosophila willistoni*. *Genetica* **131**: 91-105.
- Ghoshal, K., Majumder, S., Datta, J., Motiwala, T., Bai, S., Sharma, S.M., Frankel, W. and Jacob, S.T. (2004) Role of Human Ribosomal RNA (rRNA) Promoter Methylation and of Methyl-CpG-binding Protein MBD2 in the Suppression of rRNA Gene Expression. *J Biol Chem* **279**(8): 6783-6793.
- Gleason, J.M., Griffith E.C. and Powell, J.R. (1998) A Molecular Phylogeny of the *Drosophila willistoni* Group: Conflicts Between Species Concepts? *Evolution*, **52**(4): 1093-1103.
- Gowher, H., Leismann, O. and Jeltsch, A. (2000) DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO* **19**: 6918–6923.
- Griesemer, J.R. (1998) Turning back to go forward. A review of *Epigenetic Inheritance and Evolution, The Lamarckian Dimension*, by Eva Jablonka and Marion Lamb, 1995, Oxford and New York: Oxford University Press, xiv + 346 pages., *Biology & Philosophy* **13**:103-112.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Manly, T., Cedar, H. and Razin, A. (1981) Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* **292**: 860 – 862.
- Grunau, C., Clark, S.J. and Rosenthal, A. (2001) Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* **29**: E65-E66.
- Guerrero-Bosagna, C., Sabat, P. and Valladares, L. (2005) Environmental signaling and evolutionary change: can exposure of pregnant mammals to environmental estrogens lead to epigenetically induced evolutionary changes in embryos? *Evolution & Development* **7**(4): 341-350.
- Hung, M. S., Karthikeyan, N., Huang, B., Koo, H. C., Kiger, J. and Shen, C. K. J. (1999) *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 11940-11945.

- Jablonka, E. (2004) Epigenetic epidemiology. *Int. J. Epidemiol.* **33**(5): 929-935.
- Khosla, S., Dean, W., Brown, D., Reik, W. and Feil, R. (2001) Culture of preimplantation mouse embryos affects development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* **64**: 918-926.
- Kunert, N., Marhold, J., Stach D. and Lyko, F. (2003) A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* **130**: 5083-5090.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**(1): 6-13.
- Lyko, F. (2001) DNA methylation learns to fly. *Trends Genet* **17**(4): 169-172.
- Lyko, F., Ramsahoye, B.H. and Jaenisch, R. (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **408**(30): 538-540.
- MacPhee, D.G. (1998) Epigenetics and epimutagens: some new perspectives on cancer, germ line effects and endocrine disrupters. *Mutat Res* **400**: 369-379.
- Malakhova, M.P., Kim, K.I., Malakhova, O.A., Jacobs, B.S., Borden, E.C. and Zhang, D.E. (2003) High-throughput immunoblotting: ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem*, **278**(19): 16608-16613.
- Mandrioli, M. (2004) Epigenetic tinkering and evolution: is there any continuity in the functional role of cytosine methylation from invertebrates to vertebrates? *Cell Mol Life Sci* **61**: 2425-2427.
- Mandrioli, M. and Borsatti, F. (2006) DNA methylation of fly genes and transposons. *Cell Mol Life Sci* **63**(17): 1933-1936.
- Marhold J., Rothe N., Pauli A., Mund, C., Kuehle, K., Brueckner B. and Lyko, F. (2004) Conservation of methylation in dipteran insects. *Insect Mol Biol* **13**(2): 117-123.

- Marques, E.K., Napp, M., Winge, H., Cordeiro, A.R. (1966) A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *Dros Inf Serv* **41**: 187.
- O'Grady, P.M. and Kidwell, M.G. (2002) Phylogeny of the Subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) Based on Combined Analysis of Nuclear and Mitochondrial Sequences. *Mol Phylogenet Evol* **22**(3): 442-453.
- Richards, E.J. (2006) Inherited epigenetic variation - revisiting soft inheritance. *Nat Rev Genet* **7**: 395-401.
- Salzberg, A., Fisher, O., Siman-Tov, R. and Ankri, S. (2004) Identification of methylated sequences in genomic DNA of adult *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* **322**(2): 465-469.
- Santoro R. and Grummt I. (2005) Epigenetic mechanism of rDNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodelling, and DNA methylation. *Mol Cell Biol* **25**: 2539–2546.
- Sassi, A.K., Herédia, F.O., Loreto, E.L.S., Valente, V.L.S. and Rohde, C. (2005). Transposable elements *P* and *gypsy* in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Gen Mol Biol* **4**: 734-739.
- Simmen, M.W., Leitgeb, S., Charlton, J., Jones, S.J.M., Harris B.R., Clark, V.H. and Bird, A. (1999) Nonmethylated Transposable Elements and Methylated Genes in a Chordate Genome. *Science* **19**(283): 1164-1167.
- Tautz, D., Hancock, J., Webb, D., Tautz, C. and Dover, G. (1988) Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* **5**: 366-376.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.

- Throckmorton, L.H. (1975) The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King R.C. (ed) Handbook of Genetics v 3. Plenum Press, New York, pp 421-469.
- Tweedie, S., Charlton, J., Clarck, V. and Bird, A. (1997) Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol Cell Biol* **17**: 1469-1475.
- Tweedie, S., Ng, H.H., Barlow, A.L., Turner, B.M., Hendrich, B., Bird, A. (1999) Vestiges of a methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat Genet* **23**: 389-390.
- Valente, V.L.S. and Araújo, A.M. (1986) Chromosomal polymorphism, climatic factors, and variation in population size of *Drosophila willistoni* in southern Brazil. *Heredity* **57**: 149-159.
- Valente, V.L.S. and Morales, N.B. (1985) New inversions and qualitative description of inversion heterozygotes in natural populations of *D. willistoni*. *Rev Bras Gen* **VIII**(1): 167-173.
- Valente, V.L.S., Rusczyk, A. and Santos, R.A. (1993) Chromosomal polymorphism in urban *Drosophila willistoni*. *Rev Bras Genet* **16**(2): 307-319
- Valiati, V.H. and Valente, V.L.S. (1997) Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. *Braz. J. Genet.* **20**(4): 567-582.
- Wang, Y., Jorda, M., Jones, P.L., Maleszka, R., Ling, X., Robertson, H.M., Mizzen, C.A., Peinado, M.A. and Robinson, G.E. (2006) Functional CpG Methylation System in a Social Insect. *Science* **27**(314): 645 – 647.
- Waterland, R.A. and Jirtle, R.L. (2003) Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. *Mol Cell Biol* **23**(15): 5293-5300.
- Weinhold, B. (2006). Epigenetics: The Science of Change. *Environmental Health Perspective* **114**(3): A160-A167.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Tabela 1. Espécies do subgênero *Sophophora* de *Drosophila* que foram analisadas neste estudo (de acordo com Ashburner, 1989).

Tabela 2. Endonucleases de restrição utilizadas na digestão do DNA genômico.

Fig. 1 Padrões de clivagem obtidos após digestão do DNA genômico total de machos (♂) e fêmeas (♀) adultos de **(a)** *D. willistoni*, *D. insularis*, *D. equinoxialis*; **(b)** *D. tropicalis*, *D. paulistorum*, *D. melanogaster* com as enzimas *AluI*, *HaeIII* e *RsaI*. Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.

Fig. 2. Análise por *Southern blot* do DNA genômico de machos (♂) e fêmeas (♀) adultos de: **(a)** *D. sturtevantii* e *D. neoelliptica*; **(b)** *D. melanogaster* e *D. sechellia* e **(c)** *D. pseudooscura* e *D. subobscura* digeridos com *AluI* e *TaqI* e hibridados com a sonda pDm238. Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.

Fig. 3 Análise por *Southern blot* do DNA genômico de machos (♂) e fêmeas (♀) adultos de *D. nebulosa*, *D. capricorni* e *D. fumipennis* digeridos com *AluI* e *TaqI* e hibridados com a sonda pDm238. Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.

Fig. 4 Análise por *Southern blot* do DNA genômico de machos (♂) e fêmeas (♀) adultos de *D. tropicalis*, *D. insularis*, *D. equinoxialis* e *D. paulistorum* digeridos com *AluI* e *TaqI* com a sonda pDm238. Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.

Fig. 5 Fragmentos obtidos por PCR bissulfito com *primers* para o gene 28S de rDNA a partir do DNA genômico total de machos (♂) e fêmeas (♀) adultos das espécies: **(a)** *D. equinoxialis*, *D. insularis* e *D. willistoni*; **(b)** *D. paulistorum*, *D. tropicalis* e *D. melanogaster*. As amostras tratadas com bissulfito de sódio estão identificadas com a letra **B**. Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.

Fig. 6 Análise por sequenciamento bissulfito de sódio do gene 28S na espécie *D. paulistorum* (DNA genômico de fêmeas adultas). **(a)**. Produto de PCR obtido a partir de DNA genômico não tratado e **(b)**. Produto obtido a partir de DNA genômico tratado com bissulfito de sódio. Os resíduos de citosinas metilados são resistentes ao tratamento bissulfito (assinaladas por asterisco).

Fig. 7 Fragmentos obtidos por PCR bissulfito com *primers* para o gene \exists -actina partir do DNA genômico total de machos (♂) e fêmeas (♀) adultos das espécies: **(a)** *D. insularis* e *D. willistoni* ; **(b)** *D. tropicalis*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis* e *D. melanogaster*. As amostras tratadas com bissulfito de sódio estão identificadas com a letra **B**. Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.

Fig. 8 Padrões de amplificação obtidos por PCR a partir do *primer* para a região catalítica do gene *Dnmt2* nas espécies *D. willistoni*, *D. paulistorum*, *D. equinoxialis*, *D. insularis* e *D. tropicalis*. As espécies *D. virilis*, *D. melanogaster* e *D. hydei* foram utilizadas como controle. Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder Invitrogen®.

Tabela 1

GRUPO (origem)	SUBGRUPO	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA	HÁBITAT
<i>willistoni</i> (Neotropical)	<i>willistoni</i>	<i>D. willistoni</i>	Itaqui, Rio Grande do Sul, Brasil	Mata e cidade
		<i>D. paulistorum</i>	Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil	Mata e cidade
		<i>D. equinoxialis</i>	Cidade do México, México	Restrita a mata
		<i>D. tropicalis</i>	San Salvador, El Salvador	Restrita a mata
		<i>D. insularis</i>	Saint Kitts, Caribe	Endêmica (insular)
	<i>bocainensis</i>	<i>D. capricorni</i>	Florianópolis, Santa Catarina, Brasil	Restrita a mata
		<i>D. fumipennis</i>	Arima Valley, Trinidad & Tobago	Mata
<i>saltans</i> (Neotropical)	<i>sturtevanti</i>	<i>D. sturtevanti</i>	Florianópolis, Santa Catarina, Brasil	Mata e cidade
		<i>D. neoeiptica</i>	Joinville, Santa Catarina, Brasil	Restrita a mata
	<i>melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i>	Zarate, Argentina	Cosmopolita
<i>obscura</i> (Holártico)	<i>obscura</i>	<i>D. pseudobscura</i> (Neártica)	Mesa Verde, Colorado, USA	Mata
		<i>D. subobscura</i> (Paleártica)	La Florida, Santiago, Chile	Mata e cidade
		<i>D. sechellia</i>	Ilhas Seychelles	Endêmica (insular)

Tabela 2

Endonucleases de Restrição	
Sensíveis a metilação	NÃO SENSÍVEIS A METILAÇÃO
<i>HaeIII</i> (5'GG↓ CC 3')	<i>RsaI</i> (5'GT↓ AC 3')
<i>AluI</i> (5'AG↓ CT 3')	<i>TaqI</i> (5'T↓ CGA 3')

*A letra C em negrito mostra que não há clivagem neste sítio, quando ele estiver metilado.

Figura 1

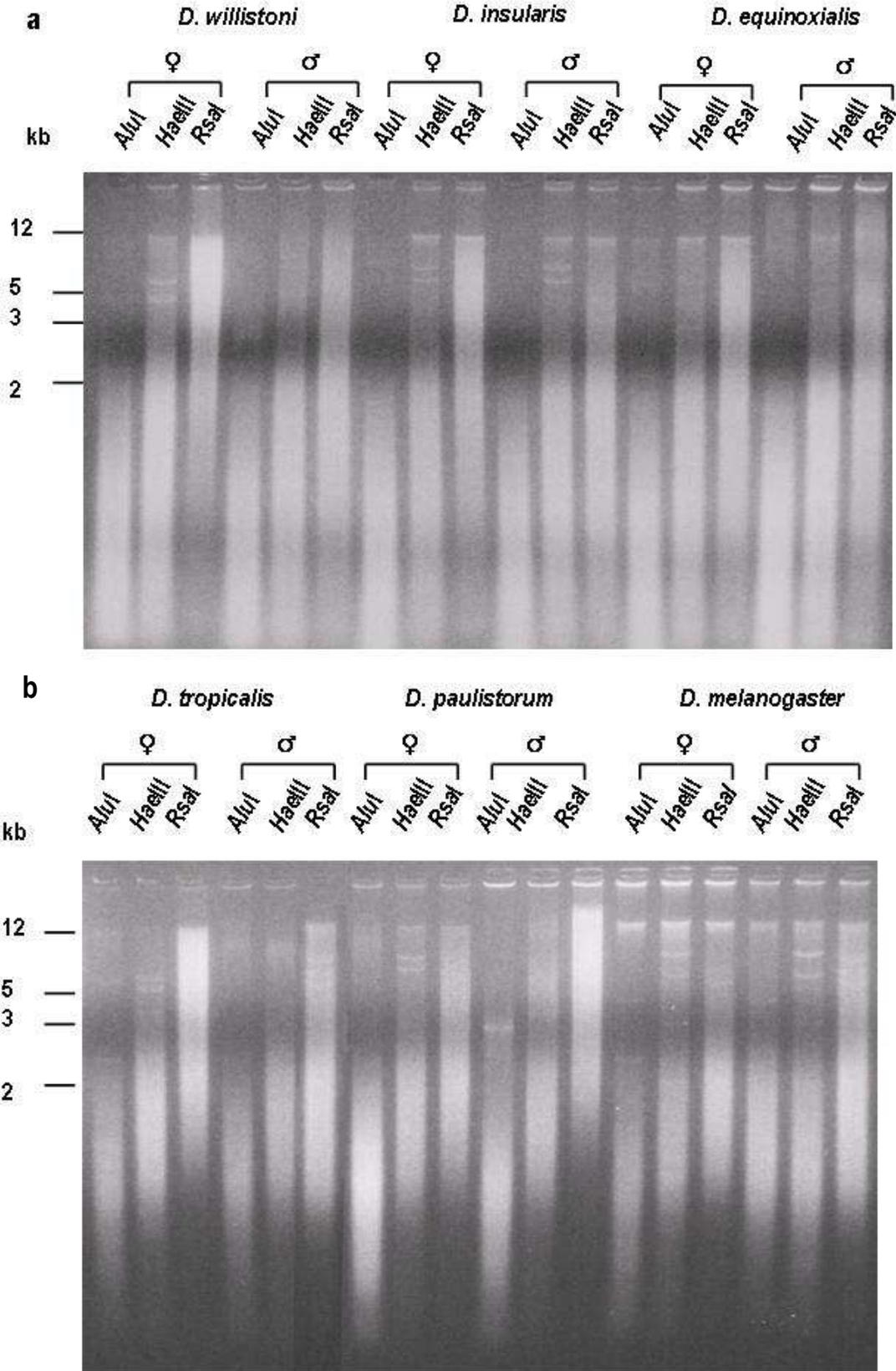


Figura 2

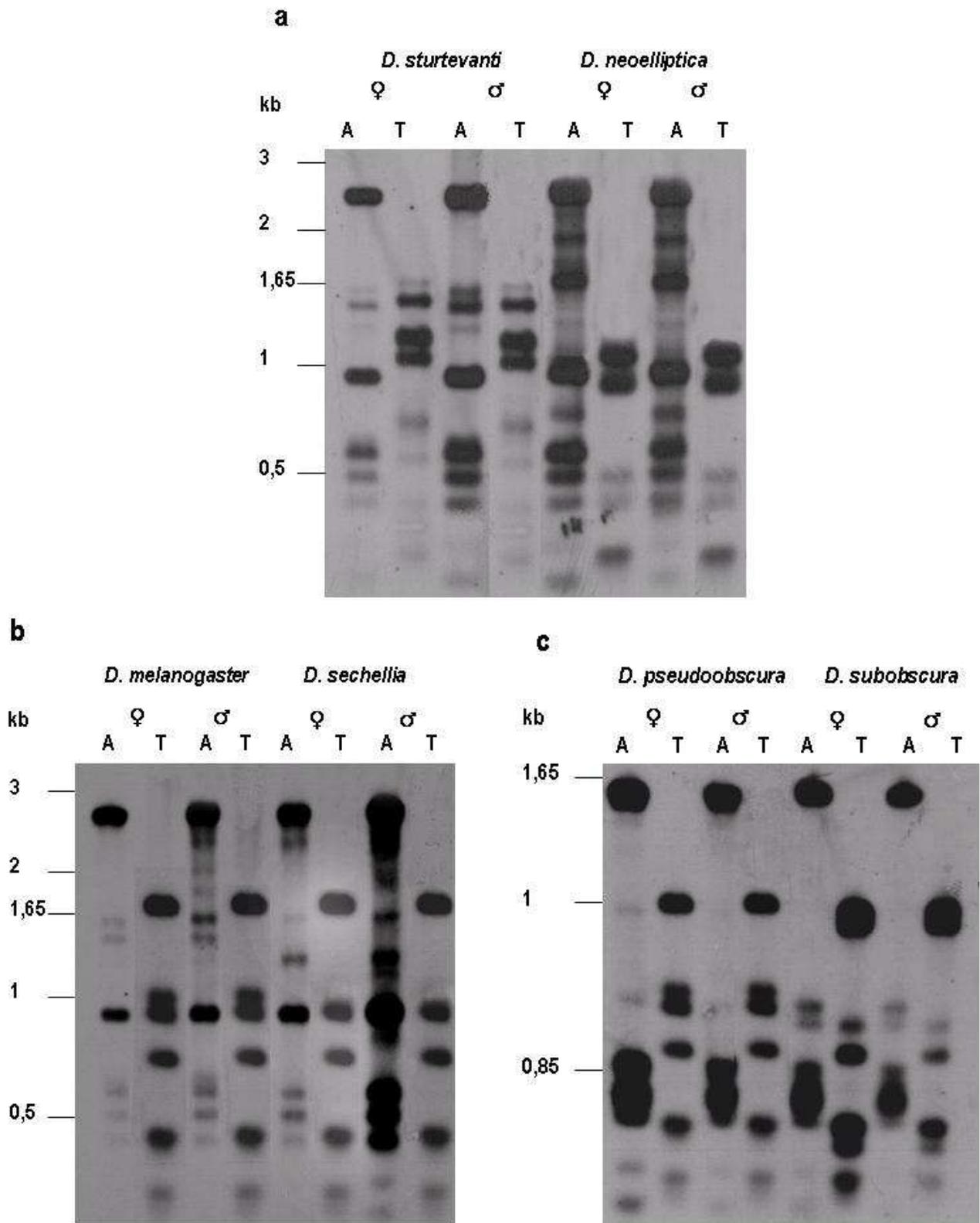


Figura 3

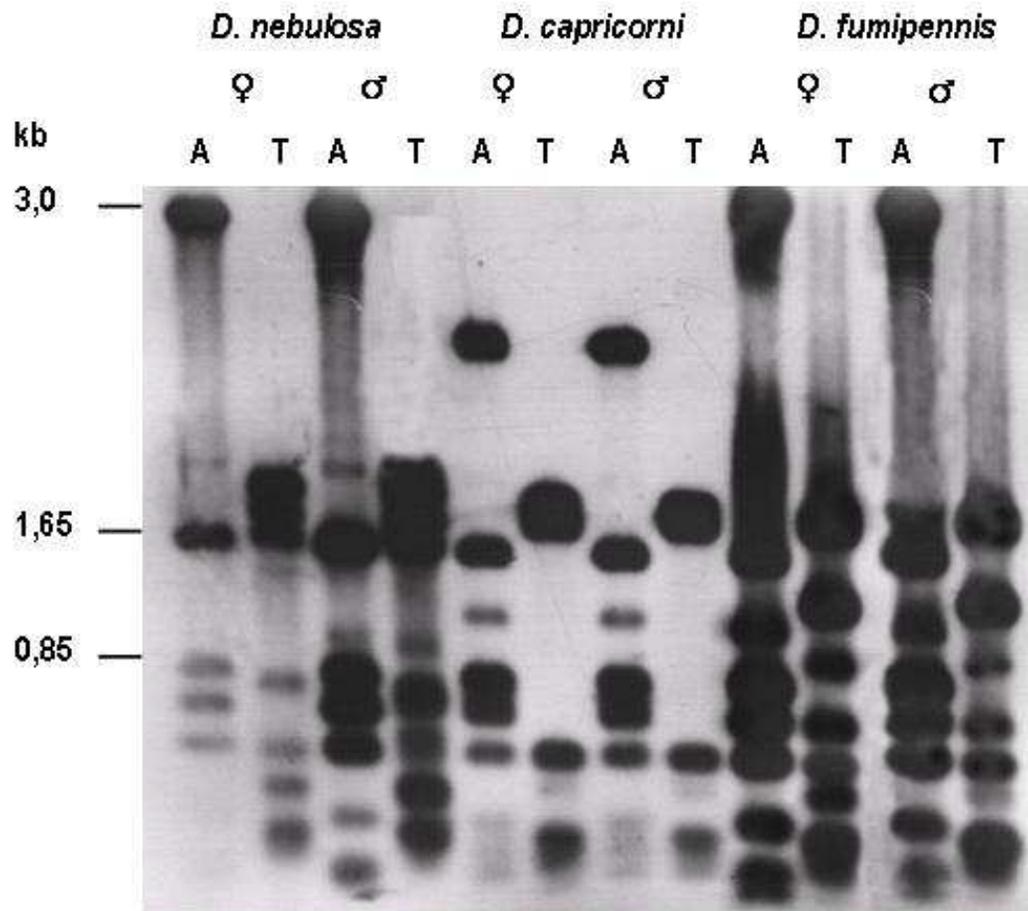


Figura 4

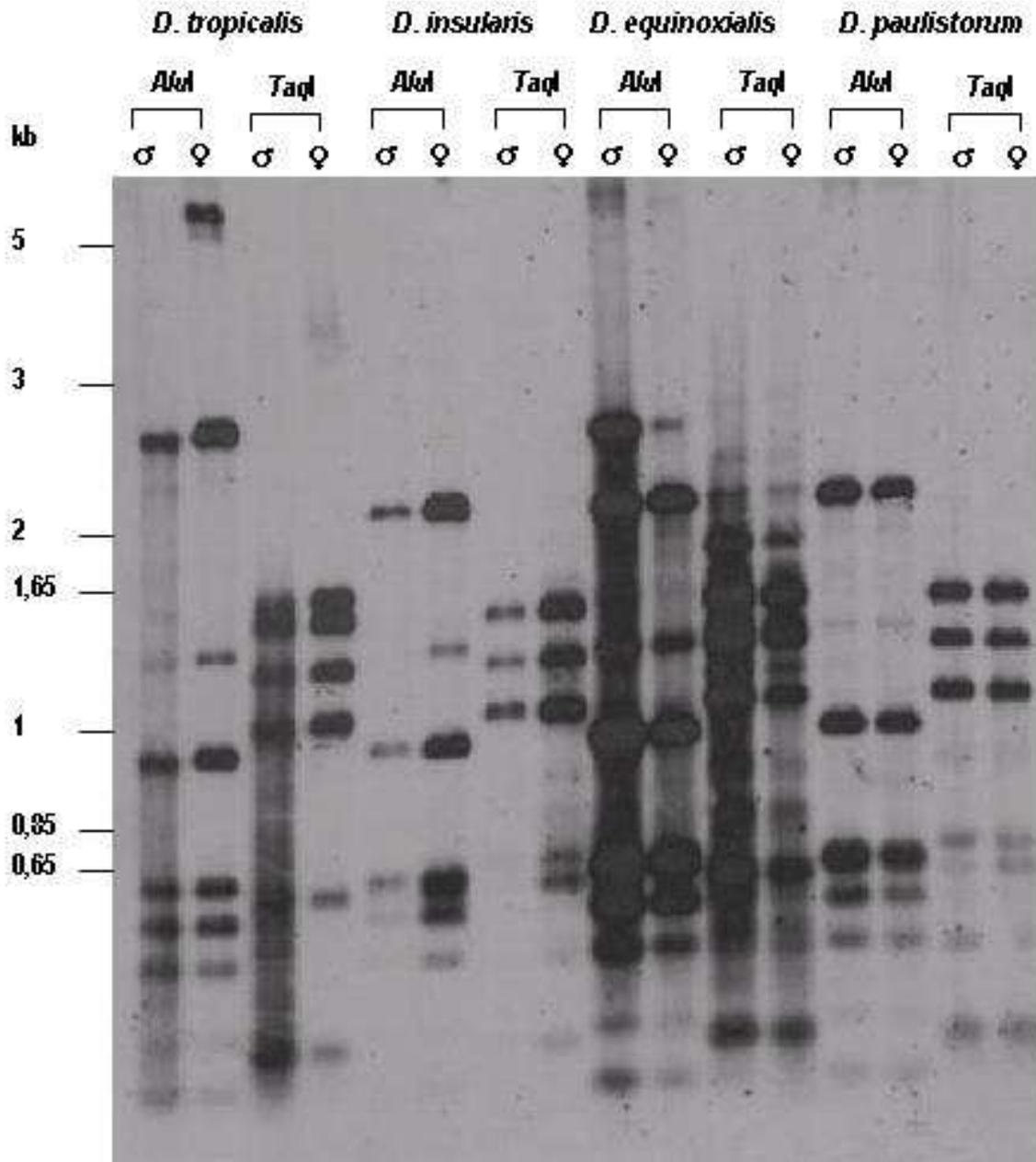


Figura 5

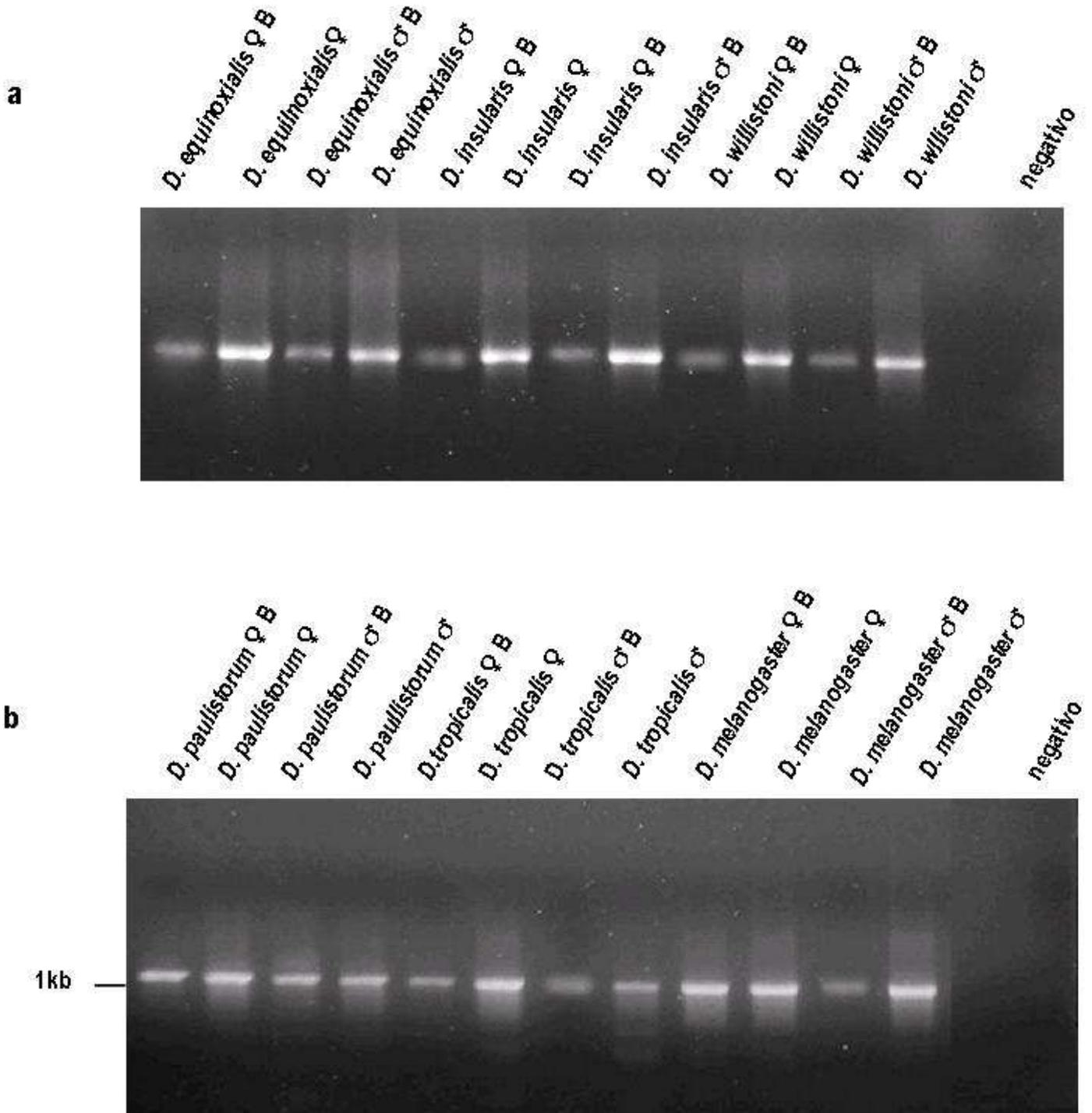
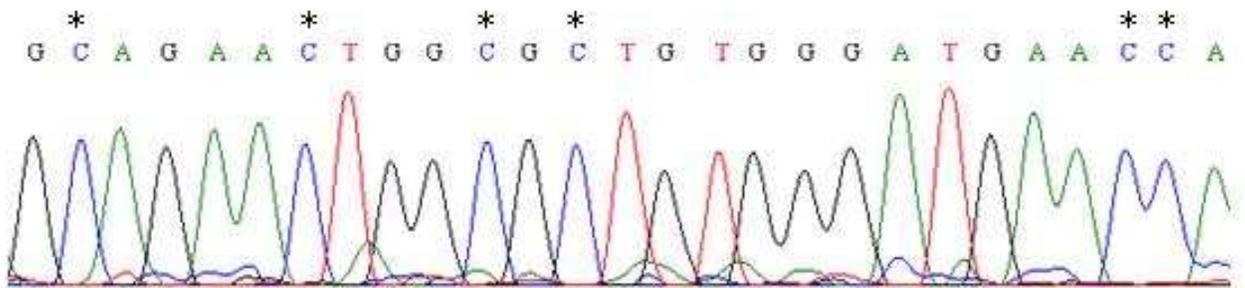


Figura 6

a



b

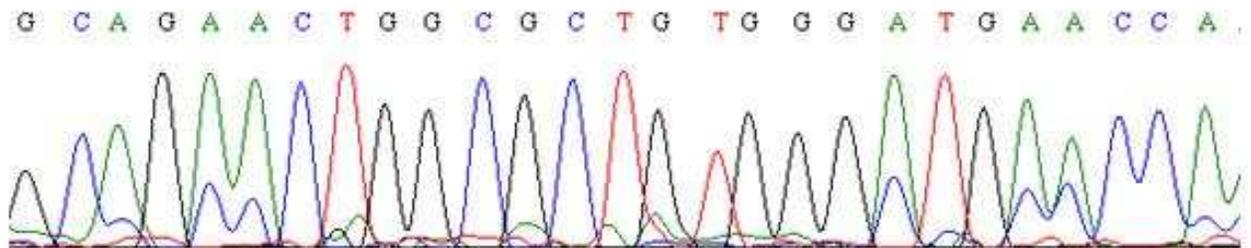


Figura 7

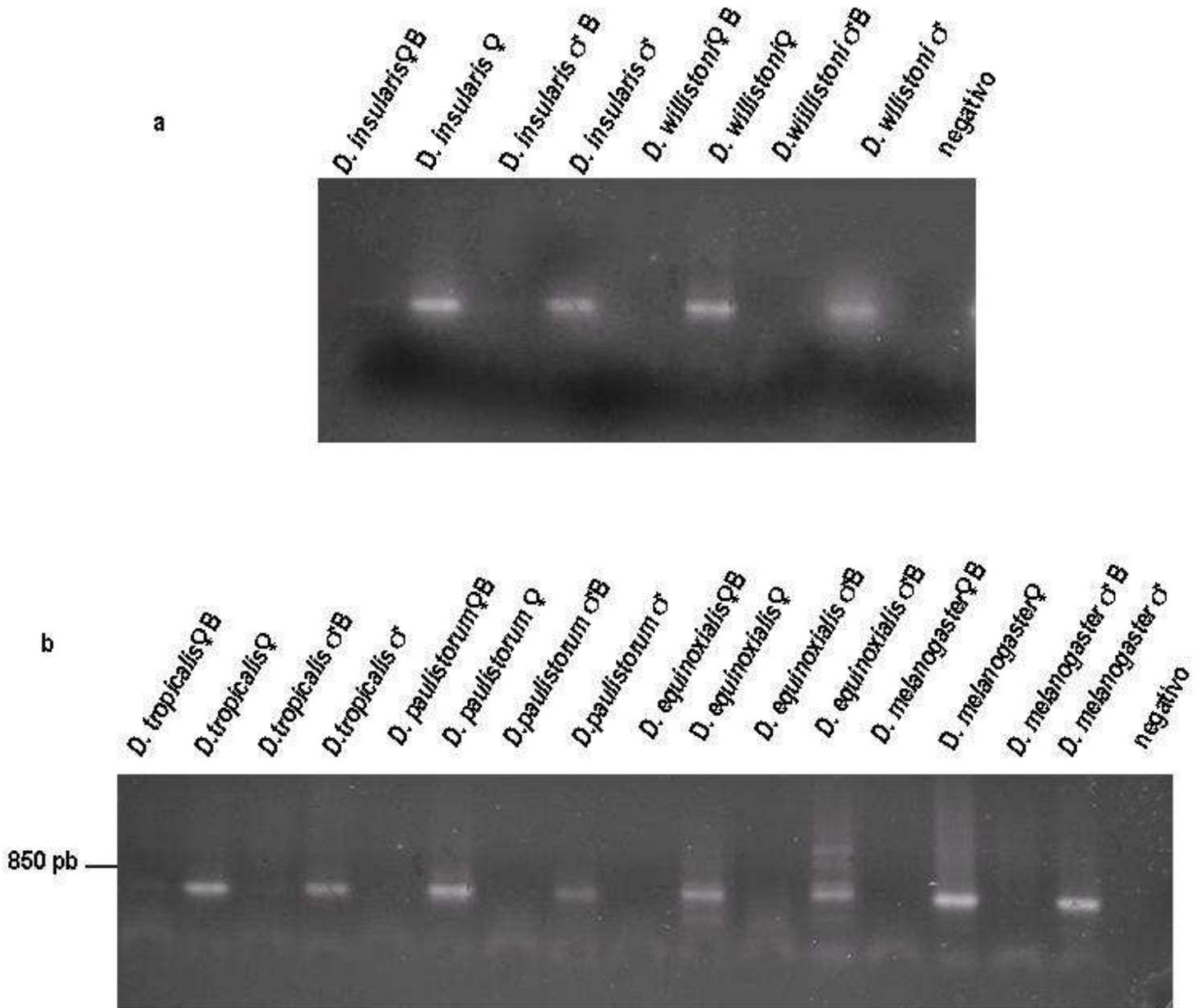
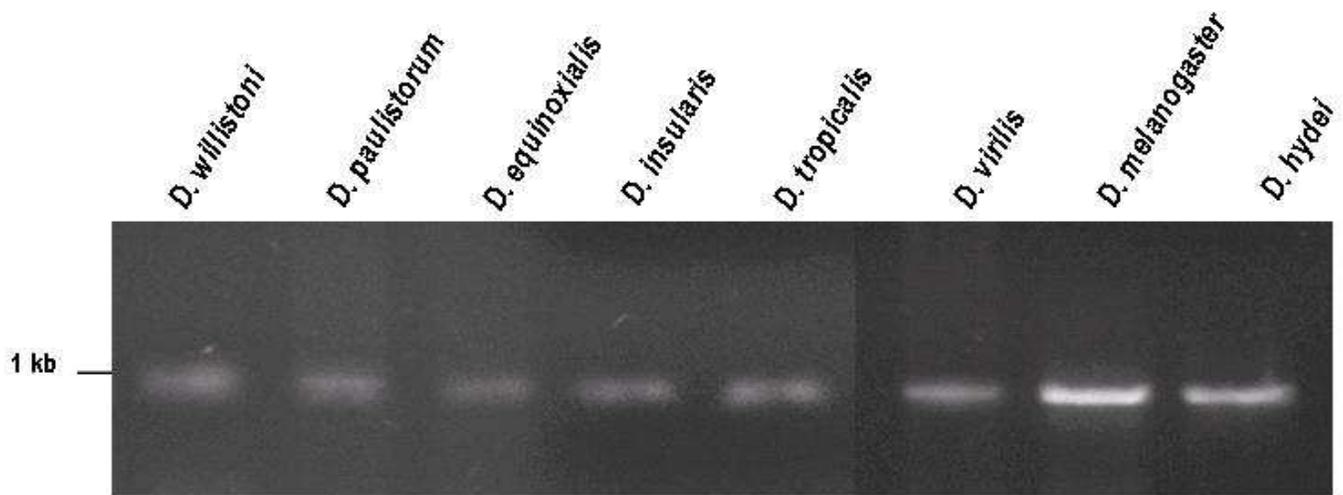


Figura 8



DISCUSSÃO GERAL CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A epigenética tem se tornado um campo importante de pesquisa tanto na identificação das causas de algumas doenças (Paz *et al.*, 2003; Ehrlich *et al.*, 2006) como referente a questões evolutivas (revisão em Jablonka, 2004). A abordagem de temas ligados às modificações epigenéticas dos genomas é relativamente recente e abriu um amplo campo de pesquisa.

A retomada das idéias Lamarckistas de que os caracteres adquiridos poderiam ser herdáveis suscitou uma rediscussão a respeito dos agentes causadores de variabilidade nas populações, pois esta pode se dar não só em nível genético, como também em nível epigenético. Jablonka e Lamb (1995), descrevem que os Sistemas de Herança Epigenética podem responder mais rapidamente às mudanças ambientais em ciclos intermediários possibilitando alterações evolutivas mais rápidas do que as mutações aleatórias e da seleção de variação de seqüência (revisão em Griesemer, 1998).

Nosso trabalho tem a intenção de contribuir com argumentos para essa discussão de quanto o ambiente pode influenciar o surgimento de características diferenciadas para determinadas espécies. Demonstramos através de diferentes técnicas que vêm sendo amplamente empregadas para a análise de metilação do

DNA que o subgrupo *willistoni* de *Drosophila*, além de apresentar uma grande variabilidade genética, denota variabilidade também em nível epigenético.

Isso ficou demonstrado porque, apesar de quatro das cinco espécies estudadas do subgrupo apresentarem metilação sexo-específica dos genes ribossomais, cada uma exibe um perfil próprio, com exceção da espécie *D. tropicalis*, que tem um padrão similar ao de *D. willistoni* para a enzima *Alu I*. Se pensarmos então nos ambientes nos quais essas espécies evoluíram comparando-as com as demais aqui estudadas (o grupo *saltans* originou-se na região tropical da América do Norte, o grupo *obscura* evoluiu nos trópicos do Velho Mundo e o grupo *melanogaster* em ambientes temperados) poderíamos tentar estabelecer possíveis correlações com a ocorrência da modificação epigenética que descrevemos, pois diversos estudos têm apontado que fatores ambientais relacionados a dieta, por exemplo, podem efetivamente provocar alterações que são passadas para a progênie e fixadas nas populações (Waterland & Jirtle, 2003; Guerrero-Bosagna *et al.*, 2005; Dolinoy *et al.*, 2006).

Nossa intenção com o presente estudo é abrir novas possibilidades de pesquisas que venham dar suporte a essa idéia inicialmente lançada por nós, uma vez que as espécies do subgrupo *willistoni* de *Drosophila* apresentaram uma particularidade que pode constituir uma nova ferramenta para detectar o quanto o ambiente pode determinar a variabilidade epigenética entre as espécies.

Outro exemplo, além dos já citados anteriormente com camundongos (Waterland & Jirtle, 2003; Dolinoy *et al.*, 2006) é o que ocorreu durante a Segunda

Guerra Mundial, no inverno de 1944-1945, quando houve um período de severa fome na Holanda. Como esperado, os recém-nascidos das mulheres que estavam grávidas neste período nasceram com um peso em média 300g abaixo do normal. Quando estas crianças cresceram e por sua vez se reproduziram, seus bebês apresentaram peso ao nascimento menor do que a média, apesar de uma dieta perfeitamente adequada. Em outras palavras, a subnutrição das mulheres na guerra afetou não apenas a saúde de seus filhos, mas também de seus netos (www.dutchfamine.nl).

A base para a estruturação do nosso projeto foram os achados de Garcia *et al.* (2007). Nossos resultados do seqüenciamento bissulfito confirmaram as hipóteses de que a metilação em *Drosophila* ocorre não em duplets CpT e CpA, mas também em duplets CpC e CpG, o que já havia sido demonstrado para *D. willistoni* através da técnica de MSRE associada com *Southern blot* por Garcia *et al.* (2007). Também foi demonstrado que o gene 28S está metilado em todas as espécies analisadas, mas não necessariamente apresentando padrões sexo-específicos, que é o que ocorre com *D. paulistorum* e *D. melanogaster*. Estes achados abrem a perspectiva de ampliar a investigação em outras espécies, tendo em vista que somente para o subgênero *Sophophora* existem 331 descritas.

Além dessa abordagem, outro estudo que poderia ser feito é sobre a conservação do gene *dnmt2* em outras espécies do gênero *Drosophila* a partir do alinhamento e análise das seqüências com as já disponibilizadas no Genbank através de busca *in silico* ou mesmo análise por PCR nas espécies que ainda não

tem seqüências disponíveis. Esta pesquisa pode ampliar o conhecimento a respeito da metilação do DNA no gênero *Drosophila*, tendo em vista que Garcia *et al.* (2007) encontrou conservação na porção catalítica da enzima, mas uma variabilidade na porção responsável pelo reconhecimento da seqüência a ser metilada.

Outra perspectiva interessante e que pode dar mais consistência para as discussões em nível evolutivo a respeito do subgrupo *willistoni*, seria comparar nas demais espécies se os padrões de metilação diferencial variam ao longo do desenvolvimento tal como ocorre em *D. willistoni*. Nesta espécie as seqüências metiladas do genoma têm padrões diferenciados em gônadas, embriões, larvas e adultos. Isso poderia dar suporte para analisar em que níveis ocorrem conservação ou variação.

Finalmente, é possível vislumbrar que pesquisas relacionadas a Epigenética poderão possibilitar a compreensão de inúmeros fenômenos não só em nível de regulação de expressão gênica como também em nível evolutivo. Nossos dados confirmam a hipótese que tem sido freqüentemente levantada por diversos autores de que o fenômeno da metilação é amplamente distribuído nos insetos e outros invertebrados, mas com funções variáveis e bastante distintas quando comparadas com vertebrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams M D, Celniker S E, Holt R A, Evans C A, Gacayne J D, Amanatides P G, Scherer, S E, Li, P W, Hoskins, R A, Gale R F *et al.* 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-21195.
- Ashburner M (1989) The family Drosophilidae. Chapter 35 in *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 1331p.
- Ayala F J and Powell J R (1972) Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1094-1096.
- Ayala F J, Tracey M L, Barr L G, McDonald J F and Perez-Salas S (1974) Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypotheses of the dselective neutrality of protein polymorphism. *Genetics* 77: 343-384.
- Bächli G (2006) Taxodros: The database on taxonomy of Drosophilidae. Consulted February 2007. URL: <http://www.taxodros.unizich.ch>
- Bender J (1998) Cytosine methylation of repeated sequences in eucaryotes: the role of DNA pairing. *Trends Biochem Sci* 23(7):252-256.
- Bestor T H and Ingram V M (1983) Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5559-5563.
- Bird A P (1995) Gene number: noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 11: 94-100.
- Bird A P (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16(1): 6–21.
- Blower M D, Sullivan B A and Karpen G H (2002) Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* 2:319-330.

- Burdick A B (1954). New medium of reproductive quality stable at room temperature. *Dros Inf Serv* 28: 170.
- Busslinger M, Hurst J and Flavell R A (1983) DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* 34: 197–206.
- Clark S J., Harrison J and Frommer M (1995) CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat Genet* 10: 20 – 27.
- Colot V and Rossignol J L (1999) Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 21: 402–411.
- Da Cunha A B, Burla H and Dobzhansky T (1950) Adaptive chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution* 4: 212-235.
- Dahl C and Guldberg P (2003) DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology* 4: 233-250.
- Dolinoy D C, Weidman, J R, Waterland, R A and Jirtle R L (2006) Maternal Genistein Alters Coat Color and Protects *A^{vy}* Mouse Offspring from Obesity by Modifying the Fetal Epigenome. *Environmental Health Perspectives* 114(4): 567-572.
- Dong A, Yoder J A, Zhang X, Zhou L, Bestor T H and Cheng X (2001) Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res* 29(2): 439–448.
- Ehrlich M, Jackson K and Weemaes C (2006). Immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome (ICF). *Orphanet J Rare Dis* 1:1-2.
- Fazzari M J and Grealley J M (2004) Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature* 5: 446-455.
- Field L M, Lyko F, Mandrioli M and Prantera G (2004) DNA methylation in insects. *Insect Mol Biol* 13(2): 109-115.
- Field L M (2000) Methylation and expression of amplified esterase genes in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem J* 349: 863–868.

- Fisher O, Siman-Tov R and Ankri S (2004) Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Eh₅meth) in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res* 32(1): 287–297.
- Garcia R N, D'Ávila M F, Loreto E L S, Panzera Y, Heredia F O and Valente V L S (2007) First evidence of methylation in the genome of *Drosophila willistoni*. *Genetica* 131: 91-105.
- Ghoshal K, Majumder S, Datta J, Motiwala T, Bai S, Sharma S M, Frankel W and Jacob S T (2004) Role of Human Ribosomal RNA (rRNA) Promoter Methylation and of Methyl-CpG-binding Protein MBD2 in the Suppression of rRNA Gene Expression. *J Biol Chem* 279(8): 6783-6793.
- Gilbert SF (2000) The genetics core development: differential gene expression *in*: Chapter 5. *Developmental Biology*; sixth edition. Sinauer Associates Inc, Publishers Sunderland, Massachusetts, p. 109-141.
- Gleason J M, Griffith E C and Powell J R (1998) A Molecular Phylogeny of the *Drosophila willistoni* Group: Conflicts between Species Concepts? *Evolution*, 52(4): 1093-1103.
- Gowher H, Leismann O and Jeltsch A (2000) DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO* 19: 6918–6923.
- Griesemer J R (1998) Turning back to go forward. A review of *Epigenetic Inheritance and Evolution, The Lamarckian Dimension*, by Eva Jablonka and Marion Lamb, 1995, Oxford and New York: Oxford University Press, xiv + 346 pages. *Biology & Philosophy* 13: 103-112.
- Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H and Razin A (1981) Methylation of CpG sequences in eukariotic DNA. *FEBS Lett* 124: 67–71.
- Grunau C, Clark S J and Rosenthal A (2001) Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 29: E65-E66.
- Guerrero-Bosagna C, Sabat P and Valladares L (2005) Environmental signaling and evolutionary change: can exposure of pregnant mammals to environmental

estrogens lead to epigenetically induced evolutionary changes in embryos?
Evolution & Development 7(4): 341-350.

Herman J G, Graff J R, Myohanen S, Nelkin B D and Baylin S B (1996) Methylation specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821-9826.

Hsieh C L (1999) In vivo activity of murine de novo methyltransferases Dnmt3 and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 19: 8211-8218.

Hung M S, Karthikeyan N, Huang B, Koo H C, Kiger J and Shen C K J (1999) *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11940-11945.

Jablonka E (2004) Epigenetic epidemiology. *Int. J. Epidemiol.* 33(5): 929-935.

Jaenisch R and Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33(suppl.): 245-254.

Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W and Feil R (2001) Culture of preimplantation mouse embryos affects development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 64: 918-926.

Kunert N, Marhold J, Stanke J, Stach D and Lyko F (2003). A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083–5090.

Kwiatowski J and Ayala F J (1999) Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. *Mol Phylogenet Evol* 13: 319-328.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915–926.

Liu K, Wang Y F, Cantemir C and Muller M (2003) Endogenous assays of DNA methyltransferases: evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells *in vivo*. *Mol Cell Biol* 23: 2709-2719.

- Lloyd V. (2000) Parental imprinting in *Drosophila*. *Genetica* 109: 35–44
- Lyko F, Beisel C, Marhold J, et al. (2006) Epigenetic regulation in *Drosophila*. *Curr Trop Microbiol Immunol* 310: 23–44.
- Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408(30): 538–540.
- Lyko F (2001) DNA methylation learns to fly. *Trends Genet* 17(4): 169-172.
- MacPhee D G (1998) Epigenetics and epimutagens: some new perspectives on cancer, germ line effects and endocrine disrupters. *Mutat Res* 400: 369-379.
- Malakhova, M P, Kim, K I, Malakhova, O A, Jacobs, B S, Borden, E C and Zhang, D E (2003) High-throughput immunoblotting: ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 278(19): 16608-16613.
- Mandrioli M (2004) Epigenetic tinkering and evolution: is there any continuity in the functional role of cytosine methylation from invertebrates to vertebrates? *Cell Mol Life Sci* 61: 2425-2427.
- Mandrioli M and Borsatti F (2006) DNA methylation of fly genes and transposons. *Cell Mol Life Sci* 63(17): 1933-1936.
- Marhold J, Rothe N, Pauli A, Mund C, Kuehle K, Brueckner B and Lyko F (2004) Conservation of methylation in dipteran insects. *Insect Mol Biol* 13(2): 117-123.
- Marques E K, Napp M and Winge H (1966) A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. *Drosoph Inf Serv* 41: 187
- Norris D P, Patel D, Kay G F, Penny G D, Brockdorff N, Sheardown S A and Rastan S (1994) Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation. *Cell* 77: 41–51

- O'Grady, P M and Kidwell, M G (2002) Phylogeny of the Subgenus *Sophophora* (Diptera: Drosophilidae) Based on Combined Analysis of Nuclear and Mitochondrial Sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22(3): 442-453.
- Okano M, Bell D W, Haber D A and Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247–257.
- Paz M F, Fraga M F, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman J G and Esteller M (2003) A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 63(5): 1114–1121.
- Reddy M N, Tang L- Y, Lee T- L and James Shen C-K (2003) A candidate gene for *Drosophila* genome methylation. *Oncogene* 22: 6301-6303.
- Richards E J (2006) Inherited epigenetic variation - revisiting soft inheritance. *Nat Rev Genet* 7: 395-401.
- Salzberg A, Fisher O, Siman-Tov R and Ankri S (2004) Identification of methylated sequences in genomic DNA of adult *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res Commun* 322(2): 465-469.
- Santoro R and Grummt I (2005) Epigenetic mechanism of rDNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodelling, and DNA methylation. *Mol Cell Biol* 25: 2539–2546.
- Simmen M W, Leitgeb S, Charlton J, Jones S J M, Harris B R, Clark, V H and Bird A (1999) Nonmethylated Transposable Elements and Methylated Genes in a Chordate Genome. *Science* 19(283): 1164-1167.
- Tautz D, Hancock J M, Webb D A, Tautz C and Dover G A (1988) Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 5: 366–376.

- Thompson J D, Higgins D G and Gibson T J (1994) CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Throckmorton, L H (1975) The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King R.C. (ed) *Handbook of Genetics* v 3. Plenum Press, New York, pp 421-469.
- Tweedie S, Charlton J, Clark V and Bird A (1997) Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol Cell Biol* 17: 1469-1475.
- Tweedie S, Ng H H, Barlow A L, Turner B M, Hendrich B and Bird A (1999) Vestiges of a methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat Genet* 23: 389-390.
- Urieli-Shoval S, Gruenbaum Y, Sedat J and Razin A (1982) The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *FEBS Lett* 146(1): 148-152.
- Valente V L S and Araújo A M (1986) Chromosomal polymorphism, climatic factors, and variation in population size of *Drosophila willistoni* in southern Brazil. *Heredity* 57: 149-159.
- Valente, V L S and Morales, N B (1985) New inversions and qualitative description of inversion heterozygotes in natural populations of *D. willistoni*. *Revista Brasileira de Genética*, VIII(1): 167-173.
- Valente, V L S, Rusczyk, A and Santos, R A (1993) Chromosomal polymorphism in urban *Drosophila willistoni*. *Rev. Bras. Genet.* 16(2): 307-319.
- Valiati, V H and Valente, V L S (1997) Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. *Braz. J. Genet.* 20(4): 567-582.
- Wade P A (2001) Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 20: 3166-3173.

- Wang Y, Jorda M, Jones P L, Maleszka R, Ling X, Robertson H M, Mizzen C A, Peinado M A and Robinson G E (2006) Functional CpG Methylation System in a Social Insect. *Science* 27 (314): 645 – 647.
- Warnecke P M, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki J R and Clark S J (2002) Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* 27: 101-107.
- Waterland R A and Jirtle R L (2003) Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. *Mol Cell Biol* 23(15): 5293-5300.
- Weinhold, B (2006). Epigenetics: The Science of Change. *Environmental Health Perspective* 114(3): A160-A167.
- West-Eberhard M J (1998) Evolution in the light of developmental and cell biology, and *vice versa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8471-8419.
- Wheeler M R (1981) The Drosophilidae: a taxonomic overview. pp.1-97 *in*: M Ashburner, H L Carson and J. N. Thompson, eds. *The genetics and biology of Drosophila*. Vol. 3a. Academic Press, New York.