

NEW 246

Biblioteca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências

**Investigação sobre um Fenômeno de  
Hipermutabilidade na Linhagem 17A2 de  
*Drosophila willistoni***



Trabalho apresentado  
como um dos requisitos  
para a obtenção do  
grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas –  
Ênfase em Biologia  
Molecular, Celular e  
Funcional.

**Marícia Fantinel D'Ávila**

Orientadora: Dra. Vera Lúcia S. Valente Gaiésky

Co-orientadores: Dr. Elgion Lúcio S. Loreto

MSc. Rosane Nunes Garcia

Porto Alegre  
Agosto, 2003

Dedico este trabalho a minha melhor amiga, minha motivação, meu apoio e meu porto seguro: minha mãe, que é a responsável por todo o meu sucesso na vida.

## AGRADECIMENTOS:

À Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesty. Vera, obrigada por ter me aceitado no teu grupo de pesquisa, ter me dado a oportunidade de aprender contigo e teus pupilos e pelo imenso incentivo e carinho. Tu és muito mais que uma orientadora, és uma amiga.

Ao Dr. Elgion Lúcio da Silva Loreto. Elgion, agradeço a ti pela orientação, por ter dispensado um pouco do teu tempo, que é escasso, para analisar os meus experimentos e por me dar sábios aconselhamentos científicos. Tu és um exemplo de cientista para mim.

À MSc. Rosane Nunes Garcia. Rô, obrigada por ter gastado o teu precioso tempo de supermãe comigo, por ter me ensinado muito do que eu sei e por tentar inserir a palavra paciência no meu dicionário(Quase consegui!).

Ao pessoal do laboratório de *Drosophila*: Adri, Ana, André, Chirlei, Cláudia, Fabi, Fabiano, Juliana, Liz, Luciano, Luis, Marco, Maríndia, Marisa, Monica, Norma, Rodolfo, Tiago e Victor Hugo e aos agregados: Adriano, Aline, Andrés (o argentino mais brasileiro que eu conheço), Ed, Leo e Martín - A vocês que estão aqui, ou que aparecem de vez em quando (provando que este é o lugar mais agradável para se fazer pesquisa, para tomar café, chimarrão, ver a baratinha...), agradeço por tudo, principalmente pela torcida!

Aos funcionários: Berê, D. Jane, Dani, Helena, Maria (*in memoriam*) e Marcelo – agradeço a colaboração e a amizade.

Adri, Ana, André, Chirlei e Norma - *Jesus, pregado na cruz!* Obrigada pelo apoio científico, pelas dicas, pela parceria e pela amizade. Vocês são pessoas incríveis e eu adoro vocês!

Marisa (minha sogra!), obrigada pela amizade, pelo carinho e por me ajudar a ouvir as cornetas dos colorados. Tô com saudades...

Fabiano (Amor!) & Luis Fernando (Loui) - Sem vocês este trabalho seria impossível. Brigadão por aturarem minhas reclamações diárias e minhas TPMs constantes. Eu sou apaixonada por vocês dois!

À Lala, ao Rico, a Mini e ao Martin (*My best friends!*) - Obrigada por me darem *cobertura* nestes últimos dias, por compreenderem a minha ausência e por serem tão "personagens" quanto eu!

À toda a minha família, em especial a meus pais (Círia e Marcial) e avós (Marcelino e Albertina), que sonham junto comigo e me permitem realizar meus objetivos mediante seus esforços. Mãe e Pai; Vó e Vô: vocês são as pessoas mais especiais que Deus colocou no mundo. Obrigada por me apoiarem em todos os meus projetos e me ensinarem os principais valores humanos. Eu amo vocês!

Aos órgãos financiadores deste estudo: PIBIC/CNPq, CNPq, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este estudo fosse possível.

## SUMÁRIO

### 1. INTRODUÇÃO

1.1 A Espécie <i>Drosophila willistoni</i> .....	1
1.2 Mutações espontâneas, elementos Transponíveis e hipermutabilidade .....	2
1.3 A linhagem 17A2 .....	3
1.4 Elementos transponíveis na linhagem 17A2 de <i>D. willistoni</i> .....	4
1.5 Mutações em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	5
1.6 O loco <i>white</i> .....	6
1.7 Citogenética e o loco <i>white</i> .....	9

### 2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral .....	11
2.2 Objetivos específicos .....	11

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos estoques de <i>D. willistoni</i> .....	12
3.2 Estresse de temperatura .....	12
3.3 Análise morfológica das antenas .....	13
3.4 Análise das gônadas de machos .....	13
3.5 Preparações citológicas .....	13
3.6 Extração de DNA .....	14
3.7 Extração de RNA .....	15
3.8 Preparação do cDNA (Sistema SMART™) .....	15
3.9 Amplificação por PCR .....	16
3.10 <i>Southern blot</i> .....	18

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....

20

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....

36

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1. A espécie *Drosophila willistoni*

*Drosophila willistoni* (subgênero *Sophophora*) é a espécie de drosofilídeo mais comum que habita as florestas das América do Sul e Central (Dobzhansky & Powell 1975). Como outros membros do grupo *willistoni*, a distribuição geográfica de *D. willistoni* é essencialmente Neotropical. É a espécie de mais ampla distribuição do grupo (Ehrman & Powell 1982), estendendo-se do México Central e Flórida, ao norte, ao Uruguai e Argentina, ao Sul.

O grupo *willistoni* é constituído de uma grande variedade de espécies, com subespécies e espécies crípticas, sendo considerado paradigma nos estudos evolutivos. As 6 espécies crípticas de *D. willistoni* são morfologicamente muito semelhantes (Dobzhansky & Powell 1975; Ehrman & Powell, 1982; Cordeiro & Winge, 1995), sendo de extrema importância estudos que determinem marcadores para diferenciar tais espécies.

Populações naturais de *D. willistoni* são usualmente polimórficas quanto a rearranjos cromossômicos, que ocorrem em todos os braços e são facilmente detectáveis nos núcleos politênicos. Mais de setenta inversões cromossômicas diferentes têm sido descritas e, dependendo da localização geográfica das populações amostradas, indivíduos capturados na natureza podem ser heterozigotos para até nove inversões cromossômicas (Da Cunha 1956, Da Cunha *et. al.* 1950, 1959, Da Cunha & Dobzhansky 1954, Dobzhansky *et. al.* 1957). Muitos trabalhos têm sido feitos no sentido de caracterizar o polimorfismo e a composição cromossômica de *D. willistoni* (revisão em Rohde, 2000).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado amplamente esta espécie e várias abordagens têm sido feitas a fim de investigá-la do ponto de vista molecular, ecológico e citogenético.

## 1.2. Mutações espontâneas, elementos transponíveis e hipermutabilidade

Na natureza, a mutação de um gene é muito rara. Em espécies de *Drosophila*, assim como em qualquer outro organismo, o aparecimento de novos mutantes é um evento de frequência extremamente baixa e usualmente se considera que a taxa de mutação é de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  por locus por geração.

Morgan, em 1914, observou: "*Na realidade, nossa experiência com Drosophila nos dá a impressão que as mutações são eventos raros, embora o número de mutações obtidas por nós até o momento tenha sido muito grande*" (Moore 1986). Alterações fenotípicas, como olhos brancos ou asas vestigiais, só foram encontradas após a análise minuciosa de milhares de indivíduos. Alguns fatores, no entanto, podem ocasionar em maior escala estas alterações. São os chamados agentes mutagênicos, que alteram o DNA e aceleram a taxa de mutações.

Os seres vivos têm em seu material genético, além dos genes responsáveis por sua construção e funcionamento, seqüências de DNA capazes de se reproduzir e se transferir para outros locais do genoma. Tais fragmentos, chamados de elementos transponíveis (ETs) - ou transposons, podem causar mutações e, por isso acredita-se que tenham um importante papel na evolução dos organismos.

Como podem se reproduzir de modo autônomo, graças às suas características estruturais, os ETs também são chamados de 'parasitas dos genomas' por alguns autores. Embora o genoma todos os seres vivos tenham ETs, sua quantidade varia muito em cada espécie.

A capacidade de causar mutações é um dos mais importantes efeitos causados pelos ETs ao genoma hospedeiro. Ao se transpor, o ET pode se instalar dentro, ou próximo, de um gene, levando a mudanças na estrutura ou no funcionamento de partes do corpo que dependam da atividade desse gene. Por

provocar estes efeitos, os ETs são apontados como geradores de variabilidade, podendo causar um repertório de efeitos mutacionais, desde a simples interrupção de seqüências codificantes, resultando em fenótipos nulos ou letais, ou ao se inserir em uma região regulatória de um gene, podem criar um novo padrão de expressão fenotípica. Assim, os elementos de transposição estão relacionados com a hipermutabilidade e com a reestruturação dos genomas ao promoverem rearranjos cromossômicos. Todos estes mecanismos podem ser de grande importância como fonte de variabilidade para a evolução (disponível no portal *LabDros* - Laboratório de Biologia Molecular - Depto. de Biologia Universidade Federal de Santa Maria).

Freqüentemente as mutações em *Drosophila* são atribuídas à mobilização de elementos transponíveis (Finnegan 1990), sendo que em situações de estresses físicos, químicos e genômico, essa mobilização pode ser ativada. A freqüência de mutações espontâneas causadas por transposons varia muito nos diferentes organismos. Em *Drosophila* é reportado que causam cerca de 85% delas (Loreto & Valente 2002). Além de mutações, eles também provocam rearranjos cromossômicos: ao se transpor, os transposons podem eliminar ou inverter trechos do DNA, levando a ligações incorretas entre partes de um cromossomo ou de cromossomos diferentes.

Quando ocorre uma série de eventos de mutações espontâneas, pode se caracterizar um fenômeno de hipermutabilidade. Loreto *et al.*, 1998 caracterizaram uma linhagem hipermutável de *D. simulans*, e recentemente verificaram, em uma sublinhagem *white* desta, que o agente causador destas mutações é a mobilização de um elemento transponível semelhante a *hobo* (Fonte *et al.* 2002).

### 1.3. A linhagem 17A2

A linhagem 17A2 foi coletada no ano de 1991 na Estação Agronômica de Eldorado do Sul – RS (30°05'S, 51°39'W), e, desde então, é mantida em estoques

no laboratório de *Drosophila* (Departamento de Genética – UFRGS). A descendência desta linhagem já foi utilizada para estudos citogenéticos que detectaram um alto grau de polimorfismo para inversões cromossômicas paracêntricas (considerando somente os cromossomos II e III). O braço esquerdo do segundo cromossomo (III), por exemplo, apresenta as inversões A, B, D, E, F, H e I, as quais compreendem de 11 a 33% do total da eucromatina do comprimento do braço. Já o cromossomo III apresenta as inversões A, B, Cv<sub>1</sub> e J as quais compreendem de 5 a 13% da eucromatina total do comprimento do cromossomo (revisão em Santos-Colares 2003). O cromossomo XL, no entanto apresenta somente o arranjo XL-B caracterizado por Rohde (2000), que é característico das populações do sul do Brasil.

É importante acrescentar ainda que alguns transposons, como *P* e *hobo* estão presentes no genoma da linhagem 17A2. Regner *et al.* (1999) evidenciaram níveis de disgenesia gonadal dependente de temperatura na progênie de cruzamentos inter e intralinhagens envolvendo a linhagem 17A2 e outra linhagem de *D. willistoni* (WIP-11A). Sabe-se que este efeito pode ser decorrente da mobilização de elementos transponíveis.

Diferentemente das demais linhagens de *D. willistoni* mantidas no laboratório, já surgiram mutantes espontâneos machos do tipo *white* (olhos brancos) e do tipo *sepia* (olhos marrons) em estoques mantidos a 17°C. Estes mutantes foram isolados e, através de cruzamentos direcionados, foram estabelecidas linhagens estáveis para ambos os fenótipos.

#### **1.4. Elementos Transponíveis na linhagem 17A2 de *D. willistoni***

Regner *et al.* (1996) analisaram duas populações de *Drosophila willistoni* (17A2 e WIP-4) quanto à presença do elemento transponível *P*, por *Southern Blot* e hibridização *in situ*, sugerindo a existência de elemento *P* aparentemente ativo em 17A2. Regner *et al.* (1998) em uma ampla varredura de linhagens de *D. willistoni* provenientes de praticamente toda a distribuição geográfica desta

espécie, por sua vez, não observaram nenhuma linhagem livre desse elemento. Seqüências homólogas a *P* foram identificadas em todos os estoques examinados e em todos os casos, o padrão de hibridização indicou um reduzido número de elementos em relação ao encontrado nas linhagens de *D. melanogaster* (Lansman *et al.* 1985, Daniels & Strausbaugh 1986; Daniels *et al.* 1990). Outro dado interessante é que a seqüência de *P* encontrada no genoma de *D. willistoni* difere em apenas um nucleotídeo da seqüência desse elemento em *D. melanogaster*, o que reforça a hipótese de *D. willistoni* ser a doadora destes elementos, por transferência horizontal, para a cosmopolita *D. melanogaster* (Daniels *et al.* 1990).

Klein (2002), fazendo a análise por PCR em diferentes populações de *D. willistoni*, a fim de verificar a possível relação entre disgenesia do híbrido e mobilização de elementos transponíveis, verificou que a linhagem 17A2 apresenta seqüências homólogas ao elemento *hobo* de *D. melanogaster*, sendo que havia indícios de que este elemento estaria possivelmente ativo nesta linhagem. Em trabalhos anteriores, Sassi *et al.* (2000) e Loreto *et al.* (1998) já haviam detectado por *Southern blot* a presença de seqüências de *hobo* no genoma de *D. willistoni*, embora com baixa homologia com as de *D. melanogaster*. A análise por PCR (Klein 2002), no entanto, permitiu um maior refinamento desta análise, a fim de resolver esta questão importante ligada à mobilização do elemento transponível *hobo*.

### 1.5. Mutações em *Drosophila melanogaster*

A maioria das mutações em *D. melanogaster* já é bem caracterizada. As que afetam a pigmentação do olho, por exemplo, apresentam alterações nas seqüências dos genes envolvidos em rotas metabólicas importantes para a pigmentação dos omatídeos (que fazem parte do olho composto da mosca), podendo ocasionar o aparecimento de olho marrom (mutante *sépia*) e branco (mutante *white*), ao contrário de indivíduos de tipo selvagem, que têm olhos vermelhos. Já as mutações que atingem genes necessários para a formação das

estruturas da asa na mosca adulta, alteram a estrutura dos epitélios superior e inferior das asas, resultando na sua curvatura (mutante *Curly*) ou na formação de bolhas de hemolinfa entre os epitélios (mutante *blistered*) (Lindsley & Zimm 1992).

O gene *white* está envolvido na produção e distribuição dos pigmentos omocromos (marrons) e pteridinas (vermelhos) encontrados nos olhos compostos e ocelos de moscas adultas, bem como nos testículos dos machos adultos e nos túbulos de Malpighi de larvas de ambos os sexos. A função específica da proteína de transporte, associada à membrana, é de ligação a ATP, para pigmentos precursores nas vias dos omocromos e das pteridinas (Sullivan & Sullivan 1975, Dressen *et al.* 1988, Tearle *et al.* 1989).

O mutante *sepia* (*se*) possui pigmentação ocelar normal e apresenta olhos de cor marrom na eclosão, escurecendo até sépia com o passar da idade. Cromatograficamente, olhos *sepia* se caracterizam por não apresentar pigmentos vermelhos (por exemplo, drosóptero e isodrosóptero) e apresentar um acúmulo de pigmento amarelo (Lindsley & Zimm 1992). Existem cerca de dez alelos de *sepia* bem descritos.

A mutação *Curly* (*Cy*) é uma mutação dominante de *D. melanogaster*, utilizada como um marcador preferencial do segundo cromossomo em laboratórios de genética. Mosca *Cy* são facilmente distinguíveis de indivíduos de tipo selvagem pelas asas marcadamente encurvadas. A curvatura é causada por uma concentração desigual de epitélio superior e inferior durante o período seco após a emergência desde a pupa (Lindsley & Zimm 1992).

Existem vários mutantes em *D. melanogaster* que apresentam formações de bolhas de hemolinfa entre os epitélios das asas. Algumas mutações são causadas por defeitos em proteínas chamadas integrinas de *Drosophila*, que são heterodímeros transmembrana, componentes das junções basais, que mantêm unidas as duas superfícies das asas (Fristrom *et al.* 1993). Mutações nos genes das integrinas, como *inflated* (*if*), *myosferoid* (*mys*) e *blistered* (*bs*), causam defeitos na adesão dorsal-ventral das células intervenais da asa e resultam em bolhas nessas estruturas (Brower & Jaffe 1989, Wilcox *et al.* 1989, Zusman *et al.* 1990). Desta

forma, as integrinas são um dos maiores efetores da diferenciação das células intervenais da asa (Fristrom *et al.* 1994).

### 1.6. O locus *white*

A primeira mutação reconhecida claramente no gênero *Drosophila*, por Morgan em abril de 1910, foi uma alteração que surgiu espontaneamente na cor do olho de um macho da espécie *Drosophila melanogaster*. Os olhos, que são normalmente vermelhos, apresentavam-se brancos (revisão em Judd 1987).

O locus *white* de *D. melanogaster* vem sendo, desde então, muito estudado. Nestes muitos anos de estudos citogenéticos e moleculares, os inúmeros alelos e rearranjos no locus *white* expõem uma extensa gama de fenótipos que fazem desse locus um excelente modelo para examinar mecanismos de mutação gênica, transmissão e regulação (Judd, 1987). Muitos desses alelos surgiram pela inserção de elementos transponíveis, como, por exemplo, *Doc*, *roo* e *copía* (Lindsley & Zimm 1992).

Também em *D. simulans*, o locus *white* foi caracterizado molecularmente. O locus inteiro está inserido em um fragmento de 13 Kb, obtido pela clivagem com *EcoRI*, tendo sua organização estrutural de éxons e íntrons semelhante ao locus *white* de *D. melanogaster* (Inoue & Yamamoto 1987).

Torres 2001, fazendo alinhamento das seqüências disponíveis no GenBank, verificou que o locus *white* é constituído de 6 éxons e 5 íntrons, tanto em *D. simulans*, como em *D. melanogaster*, apresentando regiões de semelhanças e divergências. Todos os éxons são semelhantes entre essas duas espécies (cerca de 90% de similaridade), no entanto, em *D. melanogaster* encontram-se seqüências adicionais em cada éxon. Além disso, é observado algum grau de divergência (4%) nos éxons 1, 2 e 6. Em relação aos íntrons, os íntrons 1, 2, 3 e 4 são bastante semelhantes (99%) entre as duas espécies, o que não é observado para o íntron 5.

Em termos de morfologia, *D. simulans* e *D. melanogaster* são distinguíveis somente por características menores, como a genitália do macho e o tamanho do olho (Inoue *et al.* 1988). As duas espécies também são muito semelhantes nas estruturas cromossômicas, padrões de bandeamento e mapas de ligação (Ashburner & Lemeunier 1976).

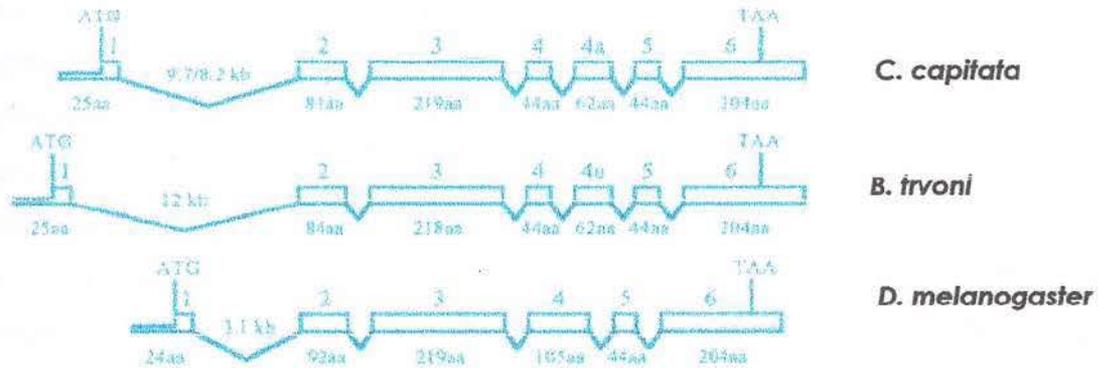
O gene *white* tem sido objeto de considerável caracterização genética e molecular em *D. melanogaster* (revisão em Hazelrigg 1987), e homologias correspondentes têm sido identificadas em muitos outros insetos de interesse econômico e de importância médica.

De um modo geral, para *D. melanogaster*, o locus apresenta um tamanho de 14kb estruturado em 6 éxons e 5 íntrons, sendo que o primeiro íntron é o maior (com 3,1kb). O tamanho do transcrito é de 2,6kb e é encontrado em embriões, larvas, pupas e adultos (Lindsley & Zimm, 1992).

Gomulski *et al.*, 2001, faz uma comparação da estrutura do locus com outros dípteros (Figura 1). *Ceratitis capitata*, *Bactrocera tryoni* e *Lucilia cuprina* apresentam 7 éxons e 6 íntrons, sendo que o primeiro íntron apresenta uma grande variação no tamanho, podendo conter inclusive seqüências de elementos transponíveis e DNA satélite. O tamanho do transcrito de *C. capitata* é de aproximadamente 2,9kb, com níveis altos de expressão detectados no estágio adulto. Comparações entre os genes *white* de *L. cuprina* e *D. melanogaster* mostram um grande nível de identidade entre as seqüências de DNA e as seqüências de aminoácidos derivada (Garcia *et al.* 1996).

*Anopheles gambiae* e *A. albimanus* apresentam uma organização mais divergente do locus *white*, quando comparado com os demais dípteros. Existem 4 éxons e uma variação no número e tamanho dos íntrons. *A. gambiae* apresenta 4 íntrons, sendo o segundo, o maior, e *A. albimanus* apresenta 3 íntrons no locus. A caracterização do gene *white* de *Anopheles gambiae* pode ser um importante subsídio para desenvolver mecanismos de controle de vetores biológicos importantes como esta espécie. O gene *white* foi escolhido como marcador para

linhagens geneticamente transformadas pela facilidade do fenótipo ser visualizado (Besansky *et al.* 1995).



**Figura 1.** Organização do locus *white* nas diferentes espécies utilizadas para a construção dos "primers" degenerados. Os tamanhos dos primeiros íntrons são dados em quilobases e o dos éxons são mostrados em resíduos de aminoácidos (Gomuski *et al.* 2001).

O locus *white* possui importantes características que facilitam uma investigação molecular mais detalhada de sua organização. Trata-se de um locus de tamanho reduzido e tem a seqüência conhecida e disponível no *GenBank*, de todas as diferentes espécies para as quais já foi caracterizado. Sem dúvida, estes fatores facilitam os estudos, pois dão subsídios para que se construam mapas de restrição, oligonucleotídeos iniciadores, além de permitir que se façam medições mais exatas quanto ao tamanho das seqüências. Desta forma, através de análises moleculares com *white* espera-se identificar o agente causador da hipermutabilidade encontrada na linhagem 17A2 de *D. willistoni*, tomando como modelos as espécies já estudadas.

### 1.7. Citogenética e o locus *white*

O locus *white* está mapeado na posição 3C2 do cromossomo X de *D. melanogaster*. Além dos fatores descritos anteriormente que podem alterar a

expressão do locus *white*, outras situações também podem interferir na sua expressão gênica.

Regiões de heterocromatina têm a habilidade de silenciar genes eucromáticos. Isto ocorre quando estes genes são levados para junto de regiões heterocromáticas por rearranjos ou por transposição. O silenciamento de genes é observado em um subgrupo de células que normalmente expressariam este gene, resultando na chamada variegação por efeito de posição (PEV). PEV foi descoberta em *Drosophila* quando o gene *white* foi levado, por uma inversão, para próximo a heterocromatina cêntrica. Isto tornou o gene "silenciado" no núcleo de algumas células e não em outras, o que produziu um mosaicismo de vermelho e branco na coloração do olho composto deste inseto (revisão em Weiler *et al.* 1995).

Em *D. willistoni* ainda não existe qualquer informação a respeito do mapeamento do locus *white*. O que se sabe é que, nessa espécie, o padrão de herança dessa mutação é recessivo e ligado ao cromossomo X, como ocorre em *D. melanogaster*. Dada à correspondência entre os braços dos cromossomos politênicos de *D. melanogaster* e *D. willistoni*, estabelecida por Sturtevant & Novitski (1941) e apresentada na Figura 2, espera-se que o locus *white* de *D. willistoni* esteja também localizado nas seções mais próximas à ponta do cromossomo XL. Devido à existência de alto polimorfismo cromossômico para inversões em *D. willistoni* e à existência de ordens gênicas diferentes fixadas em distintas populações naturais (Rohde 2000), a posição exata do gene precisa ser definida.

<i>D. melanogaster</i>	<i>D. willistoni</i>
X	XL
3L	XR
2R	III
2L	II
3R	iii
4(pontual)	?

**Figura 2.** Correspondência entre os braços dos cromossomos politênicos de *D. melanogaster* e *D. willistoni* estabelecida por Sturtevant & Novitski (1941).

## 2. OBJETIVOS

Uma vez que foi observado o surgimento de mutantes espontâneos na linhagem 17A2, que foi identificada a presença de diferentes elementos transponíveis em seu genoma e o seu padrão de arranjo cromossômico está bem estabelecido, este trabalho tem os seguintes objetivos:

### 2.1. Objetivo geral

Caracterizar, através de diferentes abordagens, a hipermutabilidade da linhagem 17A2 de *D. willistoni*.

### 2.2. Objetivos específicos

- I. Verificar, através de estresse por temperatura, se a linhagem 17A2 de *D. willistoni* apresenta um perfil de hipermutabilidade através do aumento da frequência de fenótipos mutantes.
- II. Estabelecer linhagens estáveis de mutantes de *D. willistoni* que possam servir para estudos futuros, como investigação da mobilização de elementos transponíveis agindo como fonte endógena de variabilidade genética.
- III. Realizar análises moleculares iniciais para a caracterização do loco *white* de *D. willistoni*, através da investigação dos mutantes do tipo *white* da linhagem 17A2, a fim de identificar o possível agente do fenômeno de hipermutabilidade nessa espécie.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Manutenção dos estoques de *Drosophila willistoni*

Os estoques são mantidos por cruzamento massal, em meio de cultura padrão de farinha (Marques et al. 1966) em câmaras com temperatura e umidade constantes:  $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e com aproximadamente 60% de umidade relativa.

- $17^{\circ}\text{C}$  - linhagem 17A2 de *D. willistoni*.
- $25^{\circ}\text{C}$  - linhagens de *D. simulans* (controle nos experimentos de biologia molecular) - selvagens (ELD), mutantes *white* e demais linhagens mutantes de *D. willistoni*.

As linhagens estáveis de *D. willistoni* com fenótipo mutante utilizadas nesse trabalho foram obtidas por cruzamentos direcionados, a partir de mutantes espontâneos que surgiram nos estoques da linhagem 17A2 mantidos a  $17^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2. Estresse de Temperatura

Dez isolinhagens da linhagem 17A2, mantidas em estoque à temperatura de  $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , foram obtidas a partir de fêmeas maduras. A partir da primeira geração, todos os indivíduos de cada isolinhagem foram submetidos ao estresse por temperatura, sendo mantidos em câmara de cultura a  $29^{\circ}\text{C}$ . Cada nova geração foi analisada e contada. Os mutantes eram retirados e submetidos a cruzamentos direcionados para obtenção de linhagens mutantes estáveis. Os indivíduos com fenótipo de tipo selvagem foram colocados em novos meios de cultura para cruzarem e ovopositarem novamente. As isolinhagens foram acompanhadas até, no máximo, 11 gerações.

### 3.3. Análise Morfológica das Antenas

As alterações fenotípicas detectadas a cada geração foram monitoradas e, em alguns casos, se fizeram necessárias análises complementares. Em função disso alguns segmentos e aristas de moscas com a alteração fenotípica e com fenótipo de tipo selvagem foram retirados e montados em lâmina permanente com Entellan® (Merck) para visualização em estereomicroscópio com captura de imagem.

Uma outra amostra destes indivíduos foi submetida a tratamento de desidratação e fixação para posterior análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das antenas. Os procedimentos de preparação dessas amostras e a captura das imagens foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

### 3.4. Análise das gônadas de machos

Machos da linhagem 17A2, bem como mutantes do tipo *blistered* foram dissecados em soro Ephrussi & Beadle (1936), para a retirada dos testículos e avaliação quanto a estrutura, aparência e presença/ausência de espermatozóides. A visualização foi feita em estereomicroscópio, com posterior captura de imagem.

### 3.5. Preparações citológicas

Os cromossomos politênicos de mutantes do tipo *white* da linhagem 17A2 de *D. willistoni* foram obtidos da linhagem estável mantida em câmara de 25°C ± 1°C, para comparação com os da linhagem de tipo selvagem da mesma

procedência na tentativa de detectar possíveis rearranjos que tivessem potencial de transportar o locus *white* para a proximidade de heterocromatina centromérica. As glândulas salivares de larvas de terceiro estágio foram dissecadas em soro Ephrussi & Beadle (1936) sob estereomicroscópio e transferidas para lâmina gelatinada, onde foram fixadas em ácido acético 45% por um minuto. Após, o material foi passado por um fixador –composto por três partes de ácido acético, duas partes de água, uma parte de ácido láctico - durante um minuto e o esmagamento com lamínula siliconizada foi feito em orceína acética para coloração dos cromossomos. Um total de 36 lâminas foi preparado e as melhores preparações foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss de contraste de fase em aumento de 100X.

As fotos foram reveladas, montadas e todos os cromossomos politênicos XL analisados, utilizando-se mapa de referência de Regner *et al.* (1996).

### **3.6. Extração de DNA**

Os DNAs genômicos das linhagens utilizados neste estudo foram preparados a partir de moscas adultas (aproximadamente 100 moscas), que foram maceradas em nitrogênio líquido dentro de um tubo de microcentrífuga de 1,5ml. Acrescentou-se à massa homogeneizada 700µl de tampão de lise para rompimento de tecidos e membranas, com a seguinte composição: Tris-HCl 0,1M, EDTA 0,1M, SDS 1% e NaCl 0,06M.

A amostra foi incubada por 1 hora a 65°C. A extração de proteínas e lipídios foi realizada com solventes orgânicos da seguinte forma: acrescentou-se um volume de fenol equilibrado pH 8,0 e agitou-se por 10 min, lentamente. Centrifugou-se por 10 min a 13000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo e repetiu-se o procedimento com um volume de fenol-clorofórmio (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico). A fase aquosa foi coletada e submetida a uma

nova etapa de purificação nas mesmas condições que a primeira, agora com clorofórmio (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico) apenas.

A precipitação do DNA foi realizada coletando-se a fase aquosa e acrescentando-se a ela 20% do volume inicial com NaCl 1M e 2 volumes de álcool etílico absoluto. Após permanecer à -20°C por, pelo menos, 12h, centrifugou-se a amostra por 10 min a 13000 rpm (8000 g) para precipitar o DNA. O líquido sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por 3 vezes com álcool etílico 70%. O DNA foi deixado secar em estufa à 37°C e acrescentaram-se 30µl de TE (10mM Tris-HCl - pH 8,0; 0,1mM EDTA) para a ressuspensão.

O DNA foi, então, submetido a um tratamento com RNase e testado com enzimas de restrição para avaliação de sua qualidade antes de ser utilizado no trabalho. A quantificação foi feita em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e como padrão de comparação foi utilizado DNA de fago λ previamente quantificado por espectrofotometria.

### **3.7. Extração de RNA**

Aproximadamente 50 moscas de cada amostra foram maceradas em Nitrogênio líquido. A extração seguiu o protocolo de Trizol® (Invitrogen), seguindo especificações do fabricante. As lavagens foram feitas com etanol 70% e a ressuspensão foi feita em 60µL de H<sub>2</sub>O estéril.

### **3.8. Preparação do cDNA (Sistema SMART™)**

Dez µL de RNA foram utilizados em uma reação de RT-PCR utilizando Transcriptase Reversa Invitrogen e "primers" para o sistema SMART™, seguindo as especificações do fabricante do "kit" SMART™ cDNA Synthesis® (Clontech).

### 3.9. Amplificação por PCR

Três pares de oligonucleotídeos iniciadores para o locus *white* foram utilizados para desenvolver esta análise. Os dois primeiros pares foram desenhados por Torres (2001) para *D. simulans*:

a. **WS** - 5' TTGGGGTGGTGATTGGTT 3'  
5' AGCAAGATACGCACGCAG 3'

O tamanho do amplificado esperado para *D. simulans* é de 721 pares de bases.

b. **WT** - 5' CGGTGAGTTTCTATTGCAA 3'  
5' CGGATTGTAGTTGGTGGGAC 3'

O tamanho do amplificado esperado para *D. simulans* é de 800 pares de bases.

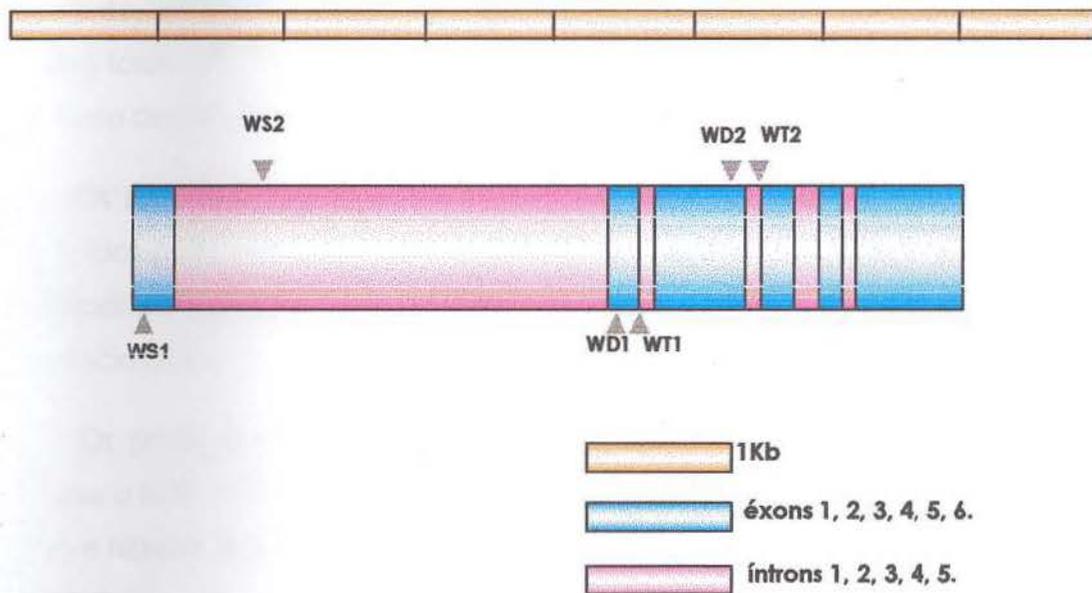
c. A seqüência direta de WS com a seqüência reversa de WT para tentar amplificar um fragmento maior do locus.

Posteriormente, utilizando o programa Oligo, foi desenhado outro par de oligonucleotídeos iniciadores degenerados a partir de regiões conservadas, baseadas no alinhamento de seqüências do locus *white* publicadas no Genbank (NCBI) de *D. simulans* (acesso: U64875) e de *D. melanogaster* (acesso: X02974) e de outros dois dípteros: *Ceratitis capitata* (acesso: AF315648) e *Bactrocera tryoni* (acesso: U97104).

d. **WD** - 5' CAAAAAYTAYGGCACRCTCY 3'  
5' AAGTCSACSGCTTCRCYGG 3'

Estas seqüências anelam em regiões do segundo e terceiro éxon do lócus, intercalados pelo segundo íntron, produzindo um fragmento esperado de mais ou menos 1000 nucleotídeos, para *D. melanogaster*.

A Figura 3 representa os respectivos locais de anelamento.



**Figura 3.** Representação esquemática do locus *white* de *D. simulans* com os locais de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores específicos. WS representa o primeiro par de oligonucleotídeos; WT representa o segundo par utilizado. WD representa o oligonucleotídeo degenerado construído para este trabalho(modificado de Torres 2001).

Para todos os pares de "primers", os componentes da reação foram: 25ng de DNA foram submetidos a uma reação final de 15µl contendo 1U Taq polimerase (Invitrogen), 1,5µl de tampão 10X fornecido pelo fabricante, 15µM de cada nucleotídeo, 20pmol de cada "primer" e 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>. As condições de amplificação para todas as reações foram: 94°C por 2 min seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 40 seg e 72°C por 1,5 min, seguidos por 72°C por 5 min para finalizar a reação.

### 3.10. Southern blot

Dez µg de DNA das linhagens utilizadas neste estudo foram clivados segundo as recomendações dos fornecedores com enzimas determinadas a partir da análise do mapa de restrição do locus *white* de *D. simulans* (Inoue e Yamamoto, 1987; Inoue *et al.*, 1988). As enzimas de restrição utilizadas neste trabalho foram: *EcoRI*, que cliva em sítios fora do locus, *BglII* e *SstI*, que clivam em sítios tanto dentro como fora do locus.

Os fragmentos produzidos foram fracionados em gel de agarose a 0.8%, transferidos para uma membrana Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech) e hibridizados de acordo com o protocolo do "kit" Gene Images® da Amersham Pharmacia Biotech.

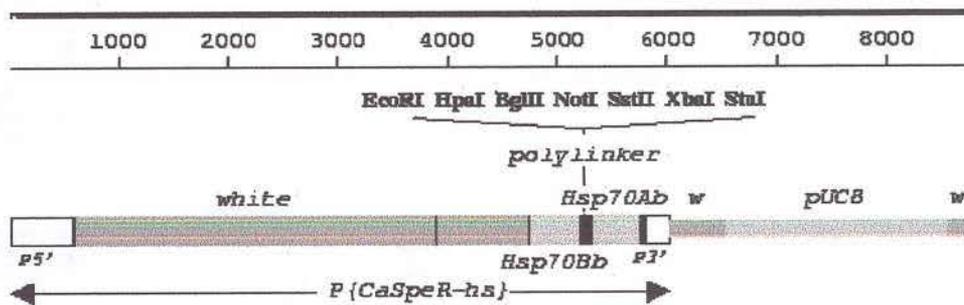
Os produtos de PCR obtidos foram igualmente fracionados em gel de agarose a 0.8%, como os DNAs genômicos, transferidos para uma membrana de náilon e hibridizados, da mesma forma, de acordo com o protocolo do "kit" Gene Images®.

As membranas foram hibridizadas com uma sonda marcada (através do método de "random prime") a 60°C em uma solução contendo 0.1% SDS, 5% dextran sulfato e líquido bloqueador diluído 20 vezes em 5xSSC. A membrana foi lavada duas vezes a 60° C, primeiramente com 1x SSC e 0.1% SDS e após com 0.5x SSC e 0,1% SDS. Em ambos os casos, agitando-se por 15 minutos. Para a detecção, foi utilizado o método do "kit" CPD-Star® (Amersham Pharmacia Biotech).

O tempo de exposição da membrana ao filme de raios-X foi de 15 minutos, 30 minutos e 16 horas. O tamanho molecular (em kb) dos fragmentos detectados foi determinado usando os fragmentos do marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder® (Invitrogen) como controle.

- Como sondas foram utilizadas:

a. O plasmídeo pCaSpeR-*hs* (Figura 4) que contém 8.784pb sendo que destes, 6.024pb são do locus *white* de *D. melanogaster*.



**Figura 4.** Mapa do plasmídeo P(CaSpeR-*hs*) que contém a maior parte do locus *white* de *D. melanogaster* (Fonte: flybase.bio.indiana.edu).

b. Produto da amplificação em *D. willistoni* dos pares de primers WS obtido por purificação de gel de agarose utilizando o "kit" GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification® (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo as recomendações do fabricante.

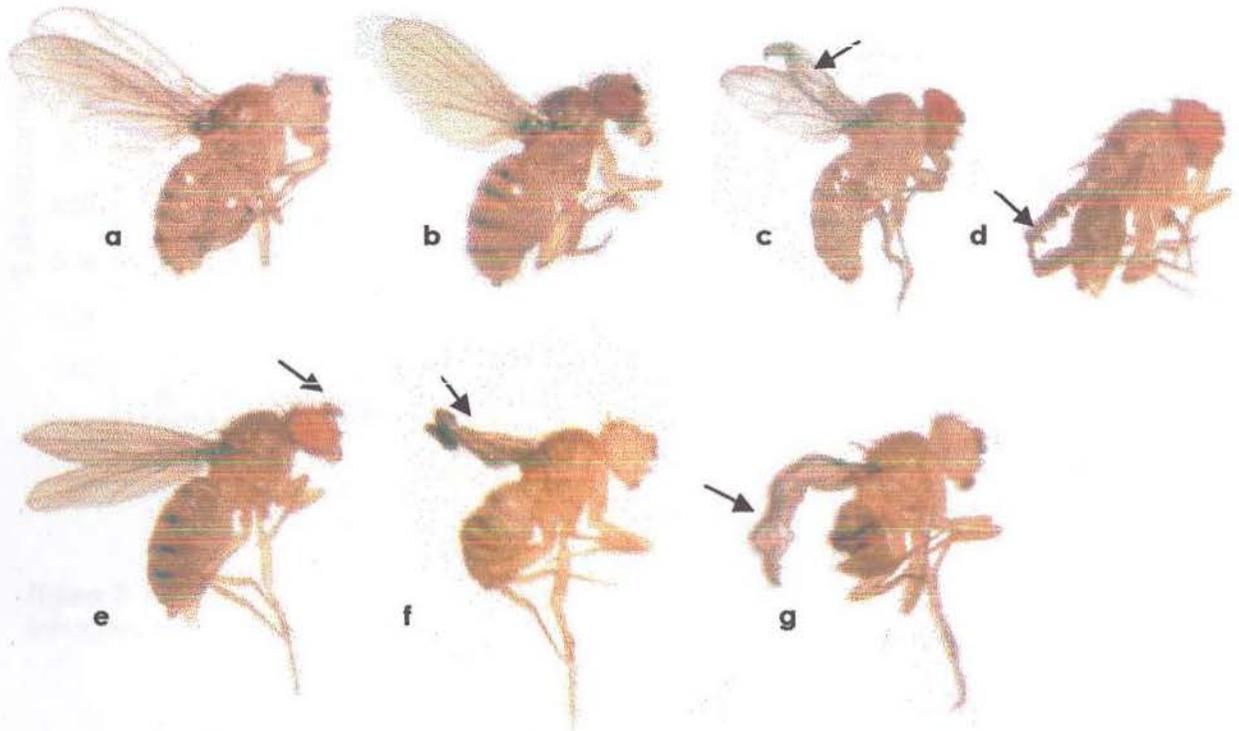
#### 4. Resultados e discussão

Depois de acompanhar durante onze gerações as isolinhagens estabelecidas a partir de isofêmeas da linhagem 17A2 observou-se o aparecimento de inúmeros indivíduos com alterações fenotípicas (Figura 5).

ISOLINHAGEM	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
1B	T:216 M:1	T:145 M:2	T:158 M:1	T:84 M:0	T:123 M:2	T:88 M:1	T:157 M:0	T:110 M:13	T:77 M:0	T:41 M:1
8	T:124 M:0	T:31 M:0								
20	T:66 M:0									
23	T:155 M:3	T:23 M:0	T:11 M:0							
26	T:8 M:0									
27	T:256 M:2	T:113 M:4	T:62 M:0							
28	T:26 M:0									
29	T:320 M:13	T:137 M:0	T:73 M:2							
30	T:16 M:0									
31	T:311 M:4	T:92 M:13	T:540 M:2	T:668 M:10	T:363 M:6	T:174 M:4	T:263 M:37			
33	T:42 M:0									
1A	T:112 M:0	T:238 M:1	T:32 M:0							
4	T:56 M:0	T:566 M:2	T:40 M:0	T:693 M:28						
6	T:47 M:0	T:472 M:2	T:199 M:0	T:122 M:1	T:114 M:2					
7	T:84 M:0	T:664 M:21	T:75 M:1	T:166 M:3						
9	T:72 M:0	T:1026 M:2	T:462 M:1	T:113 M:2	T:40 M:5					
10	T:67 M:0	T:605 M:3	T:146 M:10	T:133 M:4	T:88 M:0					
13	T:42 M:0	T:1145 M:12	T:250 M:9	T:154 M:2	T:50 M:8					

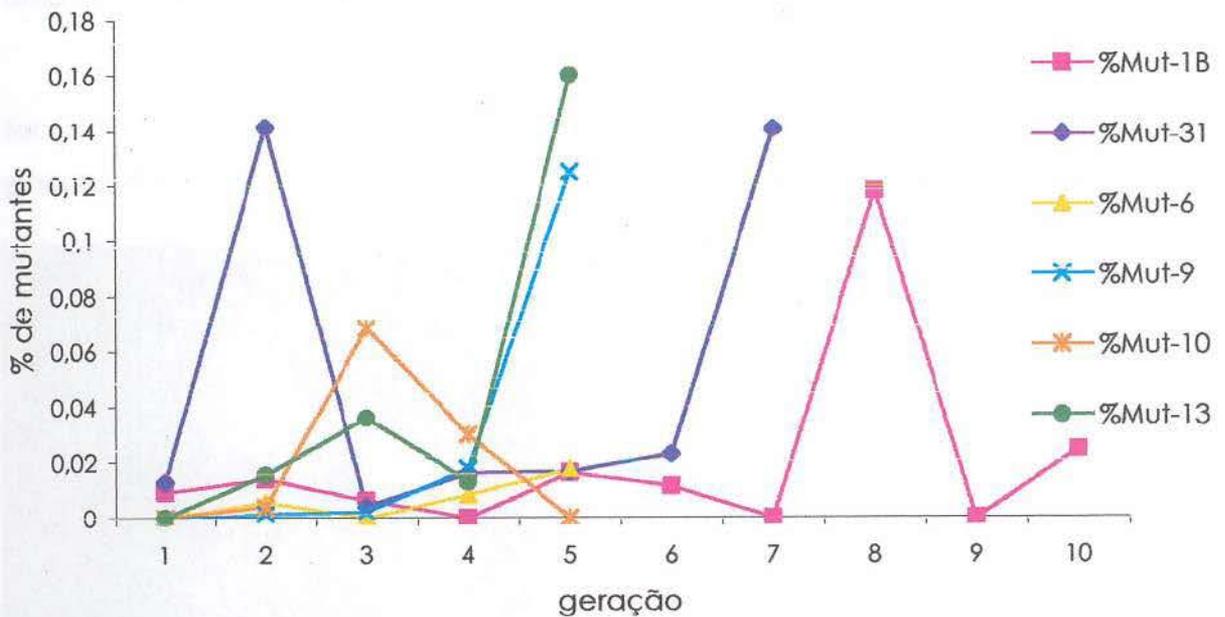
**Figura 5.** Frequência total de indivíduos ao longo das gerações (F2 a F11). T= número total de indivíduos e M= número de indivíduos com alterações morfológicas.

As alterações encontradas lembram alguns mutantes de *D. melanogaster*: *white*, *sepia*, *blistered* e *Curly*. Ao longo do experimento também surgiram indivíduos com fenótipo duplo-mutante: um do tipo *white/Curly* e outro do tipo *white/blistered*, além de uma alteração com aparente fusão nas antenas (Figura 6).



**Figura 6:** Indivíduos da linhagem 17A2 de *Drosophila willistoni* com morfologia alterada que foram obtidos a partir das isolinhagens submetidas a estresse de temperatura. Em **a** mutantes do tipo *white*; **b**. do tipo *sepia*; **c**. do tipo *blistered*, onde a flecha indica a presença de bolhas nas asas; **d**. do tipo *Curly*; **e**. Indivíduos com antenas aparentemente fusionadas; **f**. indivíduo com alteração do tipo *white* e *Curly*, onde as flechas indicam curvatura nas asas; **g**. indivíduo com alteração do tipo *white* e *blistered*.

Embora a cada geração os mutantes fossem retirados das isolinhagens após a contagem, os fenótipos com alterações continuavam aparecendo (Figura 7). Este dado sugere que há algum fator intrínseco no genoma dos indivíduos, o qual ocasiona o surgimento das alterações. Tendo em vista que em *Drosophila* a maioria das mutações é atribuída a mobilização de elementos de transposição (Finnegan 1990), estes parecem ser uma explicação pertinente ao fenômeno observado.



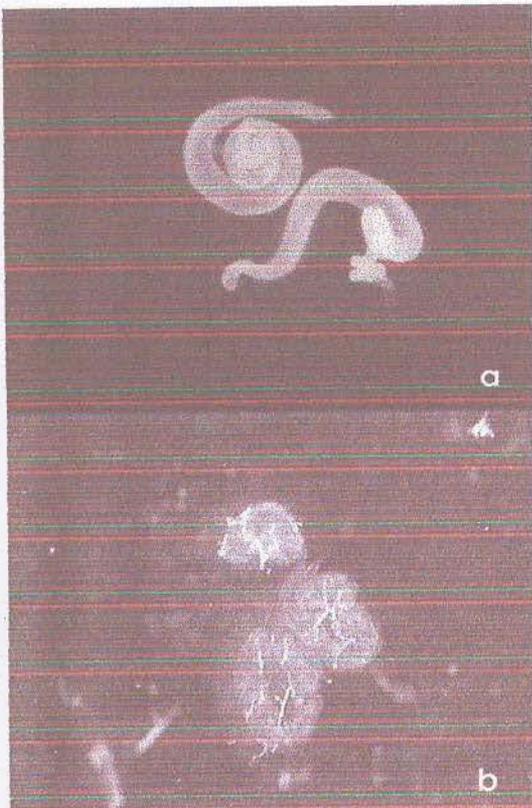
**Figura 7.** Frequência de indivíduos ao longo das gerações. Foram utilizadas somente as linhagens que permaneceram por mais tempo no experimento.

Dos cruzamentos direcionados realizados com os diferentes fenótipos mutantes para obtenção de linhagens estáveis, somente uma linhagem foi estabelecida a partir de um macho mutante do tipo *blistered*. Este foi cruzado com uma fêmea de tipo selvagem. A prole desse cruzamento foi selecionada e mantida em estoque na câmara de cultura a 25°C em laboratório por aproximadamente oito meses.

Entretanto, após este período, e ao longo das gerações o número de indivíduos foi sendo reduzido gradativamente, até a perda total da linhagem. Alguns indivíduos foram dissecados, a fim de verificar se as estruturas reprodutoras apresentavam algum tipo de alteração, pois altas temperaturas podem provocar mobilização de elementos transponíveis pelo aumento da produção de transposase (Engels 1989) e, conseqüentemente, o fenômeno de disgenesia

gonadal (Petersen & Young 1991). Verificou-se, entretanto, que a morfologia dos testículos se encontrava normal, porém com ausência de espermatozóides (Figuras 14 e 15). Isto pode ser um indicativo de depressão por endocruzamento, uma vez que a linhagem foi gerada a partir de um único casal.

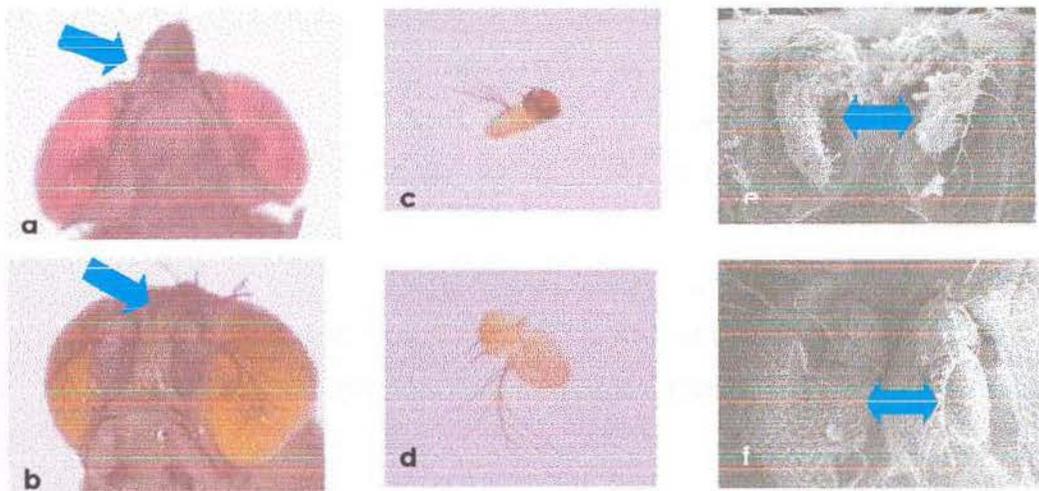
O fenômeno de depressão por endogamia é bastante conhecido; a fecundidade e viabilidade declinam drasticamente na medida em que a população se torna mais e mais endogâmica no laboratório (Futuyma 1992).



**Figura 8:** **a.** Visualização em estereomicroscópio de testículos normais de um macho selvagem da linhagem 17A2 (aumento: 16x). **b.** Imagem dos testículos de um macho com fenótipo do tipo *blistered* obtido a partir da linhagem 17A2, nos quais não foram visualizados espermatozóides, mas a estrutura é normal (aumento: 16x).

Pela análise comparativa das estruturas de antenas entre indivíduos de tipo selvagem e portadores de alteração fenotípica, verificou-se que as antenas dos indivíduos com fenótipo alterado não diferem do padrão encontrado em indivíduos de tipo selvagem quanto ao número de segmentos e cerdas da arista. Entretanto, tais estruturas apresentam-se sempre menores que as daqueles indivíduos. O que se pôde observar preliminarmente é que as antenas implantam-se na cabeça muito próximas umas às outras, dando o aspecto de serem uma única estrutura, em menor aumento.

A aparente fusão das antenas observada em alguns indivíduos foi submetida à análise, realizada em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As diferenças quanto ao tamanho das estruturas foram confirmadas e observou-se ainda que as aristas tornam-se unidas, dando a impressão de que constituem uma só estrutura, devido à proximidade de implantação e pelas malformações que os indivíduos alterados apresentam (Figura 9).



**Figuras 9.** Em **a**: Aspecto das antenas como uma única estrutura em *D. willistoni*, visualizadas em estereoscópio (16x); **b**: Aspecto geral das estruturas das antenas de um indivíduo selvagem; **c**: Antena com fenótipo alterado preparada em lâmina para microscopia óptica (100x); **d**: Imagem de microscopia óptica de uma antena normal (100x); **e**: Análise das estruturas que compõem as antenas em MEV, com evidente malformação e separação dos segmentos (setas) (400x); **f**: Eletromicrografia em MEV de antenas normais (400x).

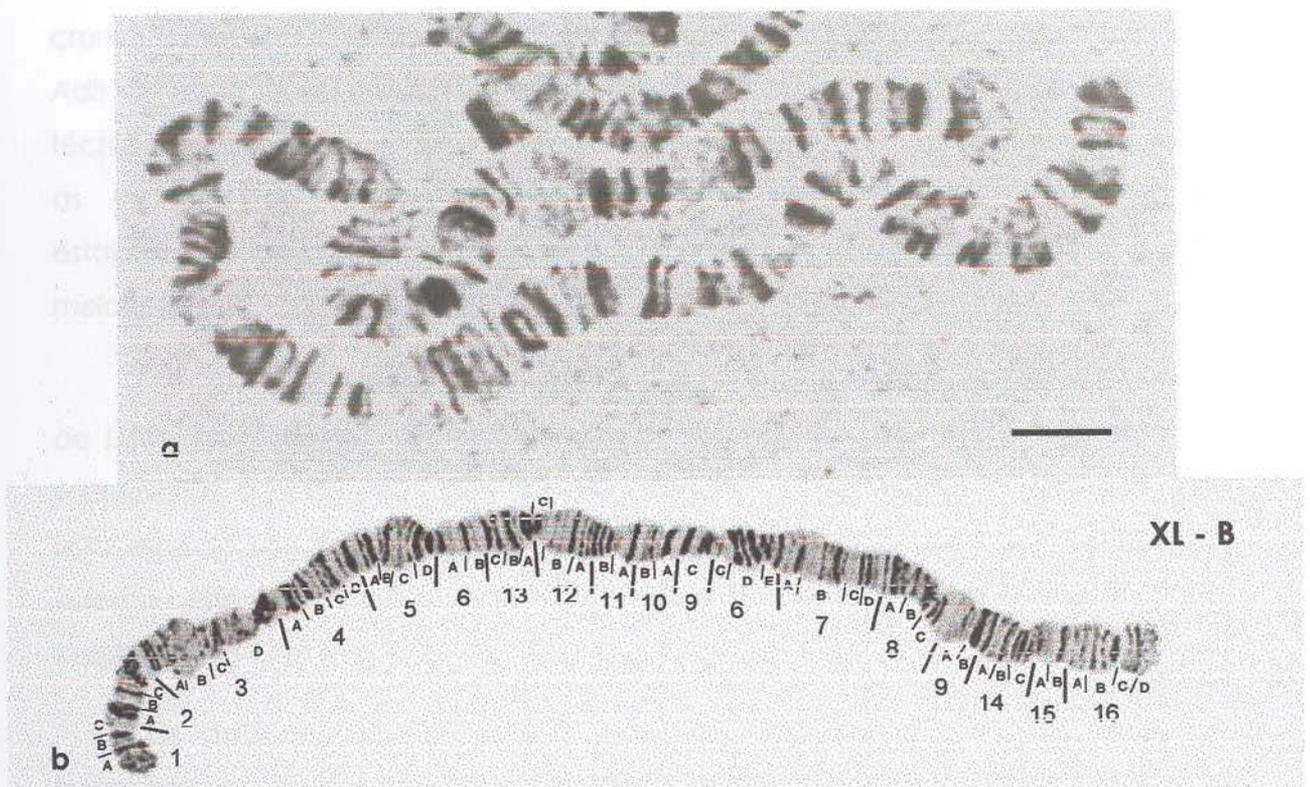
Ao serem realizados cruzamentos, entre os indivíduos portadores de alterações com indivíduos selvagens (a 25°C), a prole não apresentou a alteração dos progenitores. Apesar disso, as gerações da mesma isolinhagem que foram mantidas a 29°C, continuaram a apresentar tais malformações. Sendo assim, não foi possível estabelecer uma linhagem estável a partir destes indivíduos. São sugeridas duas hipóteses para tentar explicar estes eventos:

1. A alta temperatura estaria interferindo na rota de regulação dos genes de desenvolvimento embrionário, o que poderia estar ocasionando a formação errônea destas estruturas no adulto. Por exemplo, a conformação dos fatores de transcrição críticos neste processo poderia ter sido alterada e as proteínas de choque térmico (*Hsps*), as quais atuam como "protetoras" dos complexos protéicos necessários para a expressão gênica não estariam dando conta da demanda. Choques de temperatura durante o desenvolvimento induzem defeitos morfológicos em vertebrados e invertebrados (Petersen & Young 1991). Recentemente, Rutherford & Lindquist (1998) demonstraram o papel importante das proteínas de estresse da família das *Hsp90* e *83* no tamponamento da variação morfológica críptica em *D. melanogaster*. A submissão das isolinhagens do presente trabalho por várias gerações à temperatura estressante de 29°C pode ter interferido com a eficiência das *Hsp83* em desempenhar o seu papel protetor.
2. Os indivíduos com esta alteração foram gerados a partir de uma isofêmea, portanto, havia na prole um alto grau de endocruzamento. Loeschcke *et al.* (1997) consideram que o endocruzamento afeta a resistência a estresses. Logo, pode ter ocorrido uma seleção prévia de um genótipo, já portador de uma mutação, que predispõe o surgimento das malformações nas antenas, apenas sob estresse de temperatura.

A confirmação destas hipóteses necessita de investigações mais detalhadas. Porém, um fato relevante é que a isolinhagem 31 apresentou uma maior frequência de indivíduos com esta alteração nas antenas, e isto vem ao encontro da segunda alternativa sugerida.

A fim de verificar se o fenótipo de olhos brancos que ocorre na linhagem 17A2 não era o resultado de um rearranjo cromossômico, foi realizada a análise do braço esquerdo do cromossomo politênico X (XL) que, conforme Muller (1940), é o braço cromossômico correspondente ao X de *D. melanogaster*. A possibilidade de ocorrer uma inversão envolvendo um segmento grande do cromossomo poderia carregar lócus o *white* de *D. willistoni* para junto de regiões heterocromáticas (como cromocentro, por exemplo), fazendo com que o fenótipo observado fosse o resultado de um silenciamento da expressão gênica e não uma mutação.

Em todas as lâminas analisadas não foi identificado nenhum arranjo diferente além do descrito nesta linhagem. Todas apresentaram o arranjo XL-B, descrito para as populações do Sul do Brasil (Figuras 10).



**Figura 10:** **a.** Cromossomo politênico XL de fêmea do mutante do tipo *white* da linhagem 17A2 de *D. willistoni*. Barra = 10  $\mu$ m. **b.** Fotomapa do cromossomo XL de *D. willistoni* mostrando o arranjo XL-B comum para as populações do sul do Brasil (Rohde, 2000).

Não existem ainda trabalhos que tenham mapeado definitivamente o locus *white* em *D. willistoni*, mas acredita-se que a localização deste é no cromossomo correspondente ao de *D. melanogaster*, tendo como pressuposto trabalhos realizados por Muller (1940) e Lakovaara & Saura (1972) em ambas as espécies que estabelecem a homologia entre os cromossomos.

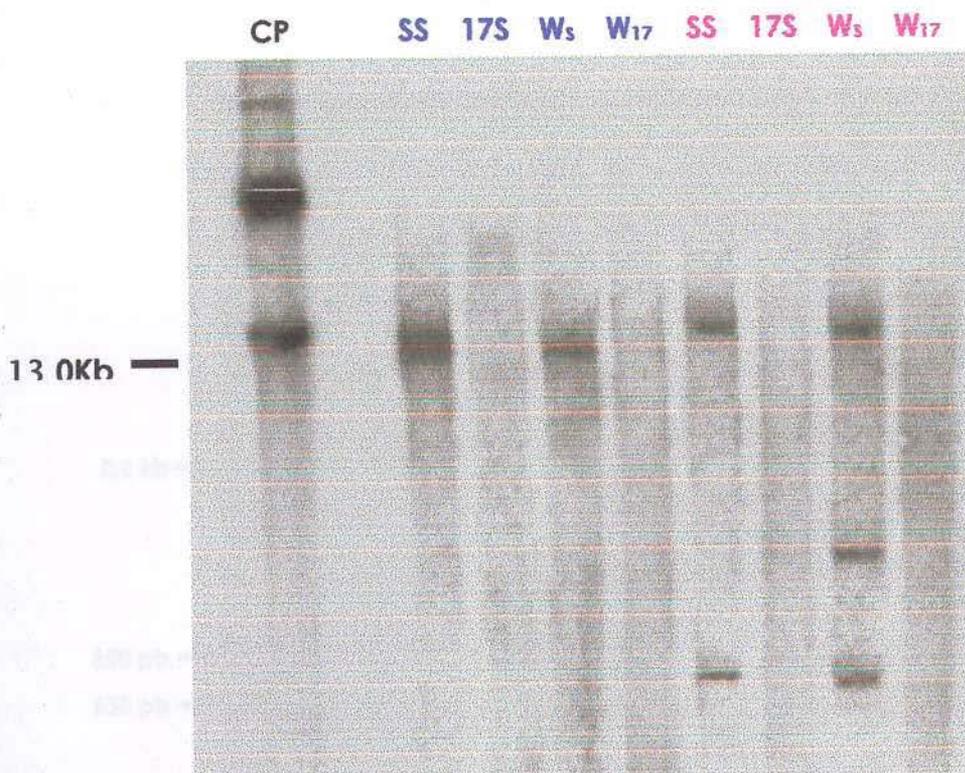
Bonorino et al. (1993) fazendo uma análise comparativa de resposta de choque de temperatura e anoxia nos cromossomos politênicos de sete espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*, verificaram que os "puffs" induzidos no grupo *willistoni* concentravam-se nos cromossomos III e XR, que são homólogos, respectivamente, dos cromossomos 3R e 3L de *D. melanogaster*, os quais concentram a maioria dos "puffs" induzidos para estes tratamentos nesta espécie.

Rohde et al (1995) também reforçam a questão da homologia entre os cromossomos de *D. willistoni* e *D. melanogaster* através do mapeamento do locus *Adh* em espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*. O gene *Adh* foi mapeado pela técnica de hibridação *in situ* no braço direito do segundo cromossomo de todas as espécies do grupo *willistoni* estudados, reforçando a homologia já estabelecida do cromossomo IIR destas espécies com o cromossomo 2L de *D. melanogaster*.

A dificuldade de estabelecer e de manter estoques balanceadores de *D. willistoni*, devido ao extensivo polimorfismo para inversões paracêntricas sobrepostas, é razão pela qual estudos clássicos de mapeamento genético com esta espécie são praticamente restritos às linhagens com que foram feitos. Um esforço neste sentido está sendo feito atualmente por Goñi (Goñi et al., 2002) em colaboração com membros do nosso grupo de pesquisa.

Os dados citogenéticos são, portanto, importantes para confirmar as indicações de que a ausência na pigmentação do olho observada é o resultado de uma alteração em nível molecular.

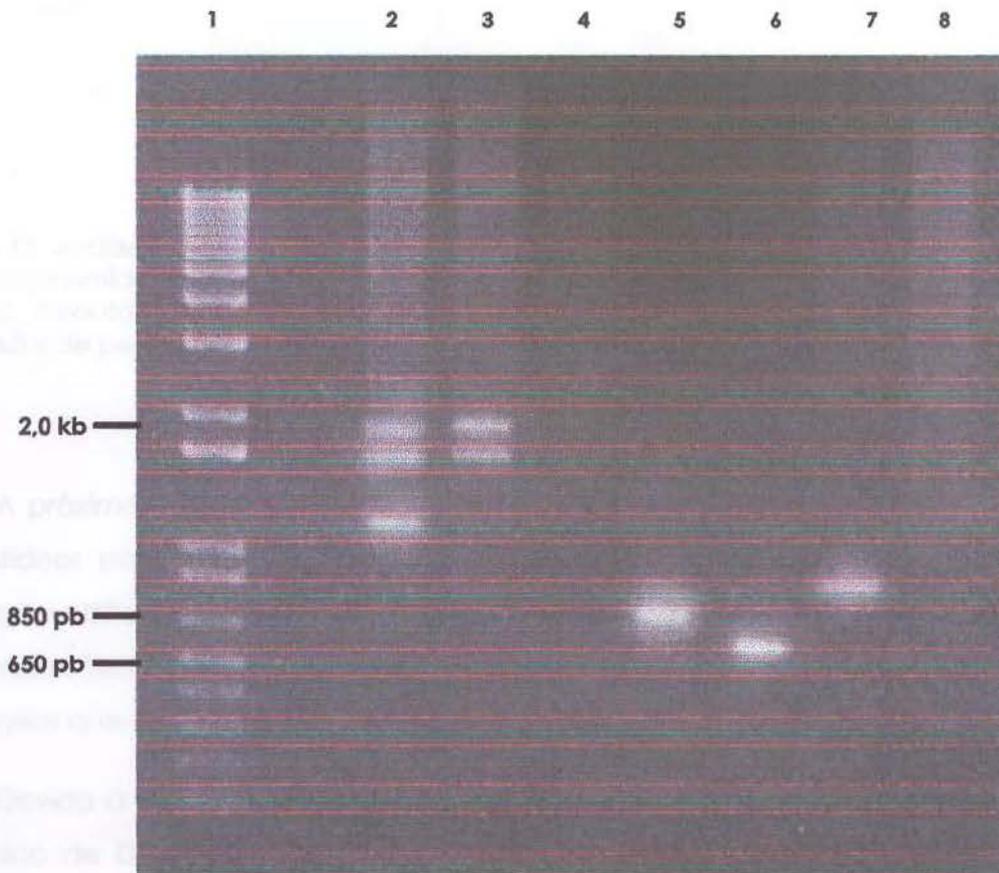
Em estudos preliminares, na tentativa de caracterizar o locus *white* de *D. willistoni*, o uso do plasmídeo p-CaSpeR-hs mostrou-se ineficiente. Este plasmídeo contém, além de seqüências do gene *white* de *D. melanogaster*, outras seqüências conservadas: as do promotor de *hsp70* e fragmentos do elemento P. Os resultados indicaram que ou a homologia entre as seqüências da sonda e do DNA genômico é baixa (Figura 11), ou os fragmentos obtidos foram resultado de hibridação com seqüências do elemento P, que estão presentes no genoma de *D. willistoni*.



**Figura 11.** Southern blot com DNA genômico de *D. simulans* e *D. willistoni* hibridizados com o plasmídeo p-CaSpeR-hs (CP); SS corresponde ao DNA genômico de indivíduos da linhagem selvagem ELD de *D. simulans* e 17S da linhagem 17A2 de *D. willistoni*. Ws representa o DNA genômico de mutantes *white* de *D. simulans* e W17 de mutantes do tipo *white* de *D. willistoni*. Em azul, DNAs digeridos com a enzima EcoRI; em rosa, DNAs clivados com SstI. O marcador de peso molecular utilizado é 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

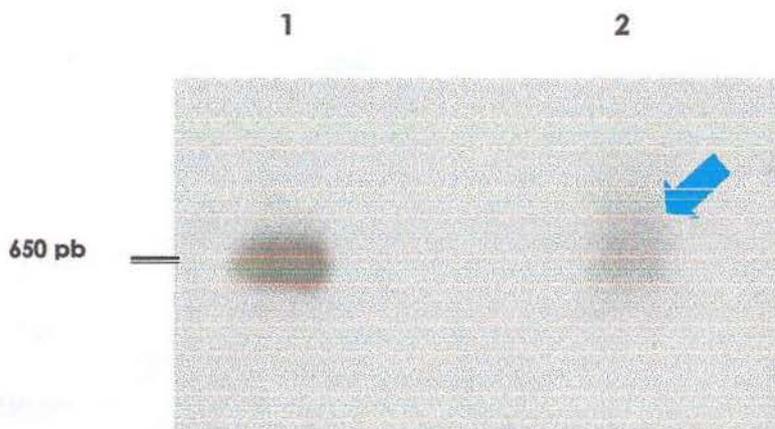
A partir da obtenção destes dados, houve uma concentração de esforços no sentido de buscar uma sonda específica para *D. willistoni*.

Para tal, utilizamos dois pares de iniciadores específicos (WS e WT) para *D. simulans*, que já vêm sendo utilizados por Torres (2001). Pela análise por PCR obtivemos amplificação somente com o primeiro par de iniciadores específicos (WS) do locus *white* de *D. simulans* em *D. willistoni*. Entretanto, o produto de amplificação tem cerca de 650 nucleotídeos e é menor do que o esperado para *D. simulans*, que é de 721 nucleotídeos (Figura 12).



**Figura 12.** Análise de produtos de PCR. Em 2 e 3 produto obtido utilizando como iniciadoras a seqüência direta do primeiro par de oligonucleotídeos específicos (WS), e reversa do segundo par (WT) amplificado no DNA de *D. simulans* (indivíduos selvagens da linhagem ELD); 4. Controle negativo; 5 e 6. Produtos amplificados com WS em *D. simulans* (indivíduos selvagens da linhagem ELD) e *D. willistoni* (selvagens da linhagem 17A2), respectivamente. A seta indica o fragmento de 650pb em *D. willistoni*. 7. Produto amplificado com WT em *D. simulans* (indivíduos selvagens da linhagem ELD). 8. Observar que não houve amplificação em *D. willistoni*. O marcador de peso molecular é o 1 kb

O produto amplificado de PCR foi então utilizado para hibridação por *Southern Blot*, utilizando novamente como sonda o plasmídeo pCaSper-hs, específico para o locus *white* de *D. melanogaster*. O resultado sugere que este fragmento corresponde à seqüência de locus *white*, parecendo haver, porém, uma menor homologia (Figuras 13).

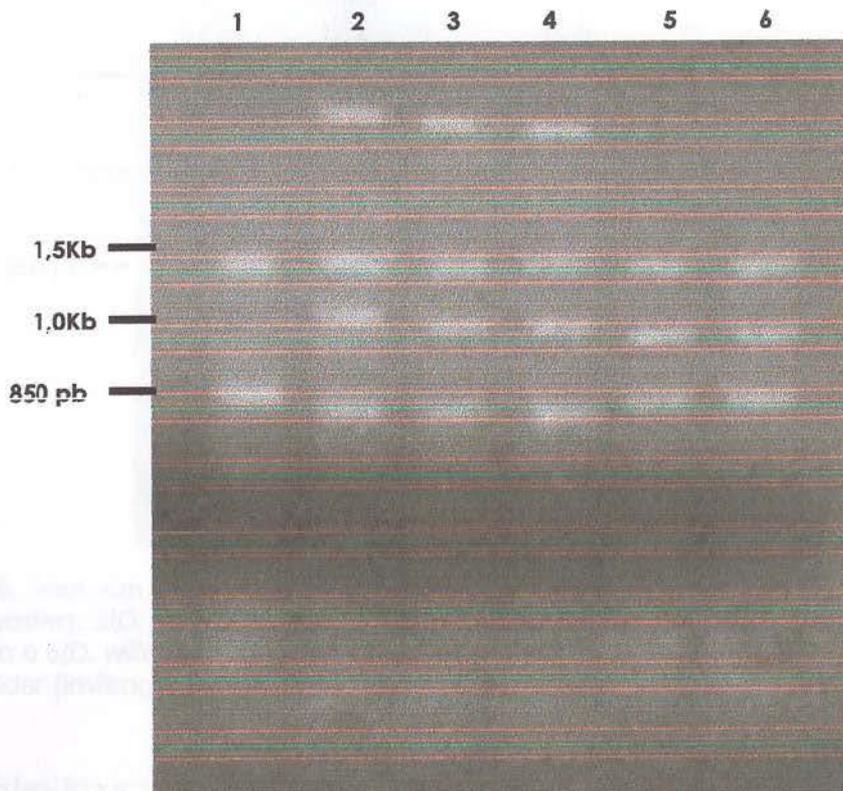


**Figura 13.** Análise por *Southern Blot* dos produtos de PCR obtidos com WS utilizando com sonda o plasmídeo pCaSper-hs. Em 1. Controle positivo (produto de PCR de *D. simulans* - ELD); 2. Produto de PCR de *D. willistoni* (indivíduos selvagens da linhagem 17A2). O marcador de peso molecular é o 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

A próxima etapa da investigação foi a purificação do fragmento de 650 nucleotídeos para utilizá-lo como sonda no DNA genômico de *D. willistoni*. A marcação obtida, após o tempo de exposição ao filme de raios X, indicou uma baixa especificidade da sonda. Nenhum padrão de bandas ficou evidente, o que sugere que a sonda tenha se ligado a regiões inespecíficas do DNA total.

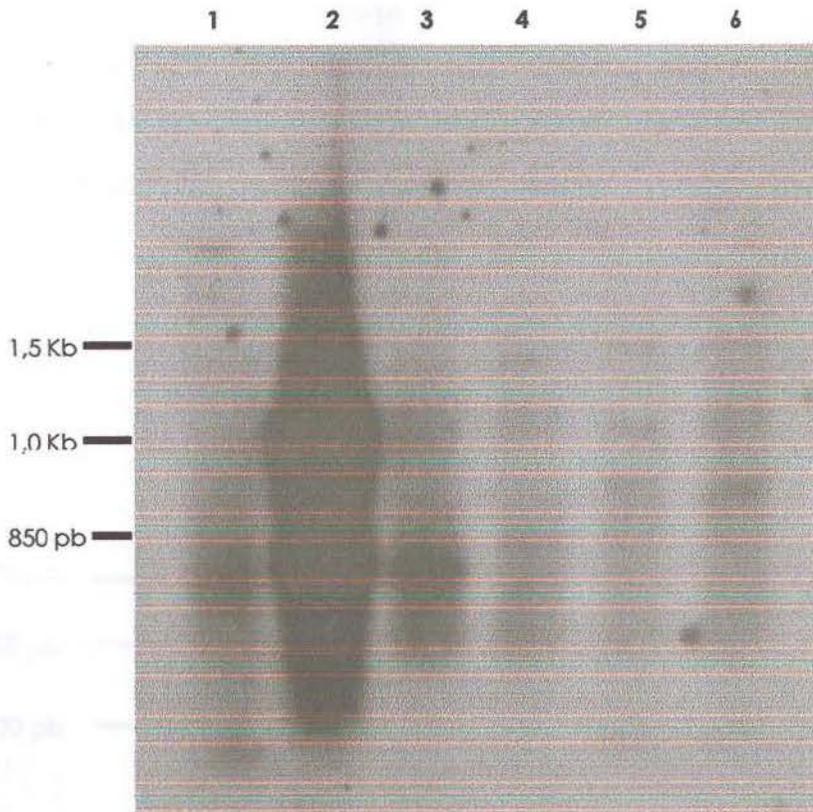
Devido à baixa homologia apresentada entre as sondas testadas e o DNA genômico de *D. willistoni*, houve a necessidade da obtenção de uma sonda melhor, que permitisse encontrar o locus *white* no genoma de *D. willistoni*. Para tal, foram desenhados, a partir de outras espécies de dípteros, os iniciadores degenerados. Estes foram utilizados em análises por PCR, com DNA genômico de *D. willistoni*, *D. simulans* e *D. melanogaster*, além de uma espécie de outro gênero, a *Zaprionus indianus* para testar a eficiência dos "primers".

O esperado para cada espécie seria a obtenção de um único fragmento com tamanho em torno de 1000 nucleotídeos, o que corresponderia à parte do segundo éxon, segundo íntron e quase todo o terceiro éxon. Para as espécies estudadas, entretanto, foram obtidos três fragmentos com aproximadamente 850, 1000 e 1500 nucleotídeos (Figura 14).



**Figura 14.** PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores degenerados(WD) com os DNAs de 1(*Zaprionus indianus*), 2 (*D. melanogaster*), 3(*D. simulans* - linhagem ELD), 4(*D. simulans* - white), 5(*D. willistoni* - 17A2 selvagem e 6(*D. willistoni* - mutantes do tipo white). Marcador de peso molecular: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Tais fragmentos foram, então analisados por *Southern Blot* utilizando novamente como sonda p-Ca $\beta$ sper-hs. O resultado sugere que os três fragmentos têm homologia com a sonda, porém o amplificado de *D. willistoni* mostrou-se menos homólogo, quando comparado com as demais espécies (Figura 25).

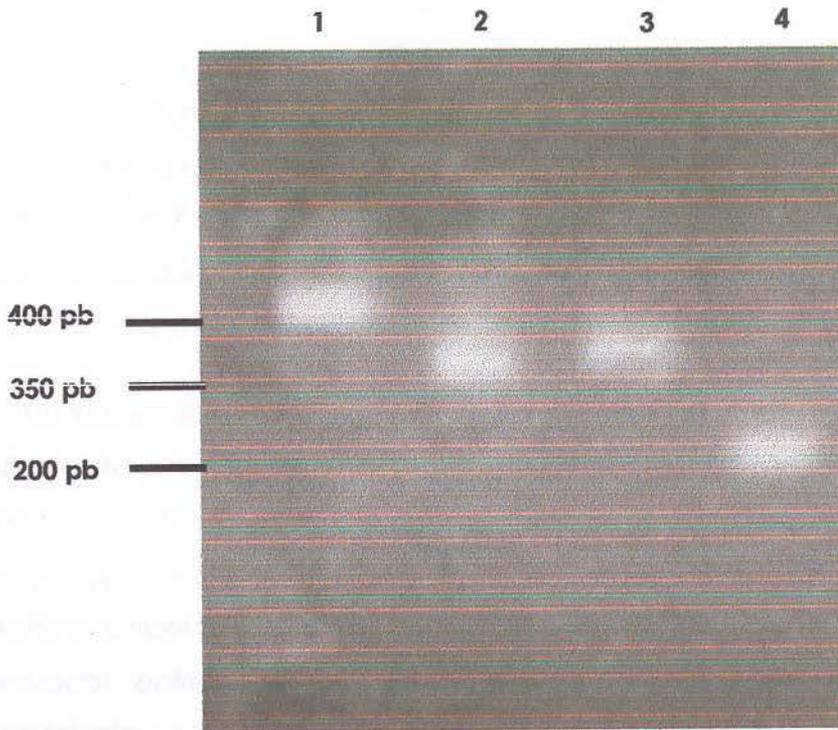


**Figura 15.** Southern blot do produto de PCR com WD. Em 1 (*Zaprionus indianus*), 2 (*D. melanogaster*), 3 (*D. simulans* - linhagem ELD), 4 (*D. simulans* - *white*), 5 (*D. willistoni* - 17A2 selvagem e 6 (*D. willistoni* - mutantes do tipo *white*). Marcador de peso molecular: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Estes fragmentos foram então purificados a partir de gel de agarose, e o fragmento de 1500 nucleotídeos foi utilizado como sonda no DNA genômico de *D. willistoni*. Novamente o resultado não foi satisfatório para nos fornecer qualquer informação sobre o locus A ineficiência desta sonda foi confirmada através de seqüenciamento do fragmento de 1000 nucleotídeos, realizada no *Labdros*, da UFSM, sob a coordenação do Dr. Elgion L. S. Loreto. A seqüência obtida com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores degenerados, em uma linhagem de mutantes do tipo *white* de *D. willistoni*, proveniente do Uruguai, após análise no sistema *BLAST* do *MedLine*, indicou não ter homologia com as seqüências de *white* disponíveis no banco de dados.

Na tentativa de obter melhores resultados com o "primer" degenerado (WD) e restringir o anelamento destes às regiões exclusivas de éxons, partiu-se

para uma abordagem utilizando-se o cDNA de *D. willistoni*. A figura 16 mostra a amplificação por PCR com os três pares de iniciadores (WS, WT e WD), além de um iniciador para  $\beta$ -Actina, gentilmente cedido por Klein (2002) para ser utilizado como controle positivo.



**Figura 16.** PCR com cDNA de *D. willistoni*, utilizando os iniciadores  $\beta$ -actina(1), WS(2), WT(3) e WD(4). Marcador de peso molecular: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Como os pares de iniciadores WS e WT anelam em regiões de íntrons no locus *white* de *D. simulans*, não se esperaria que amplificassem com o cDNA de *D. willistoni*. No entanto ocorreu amplificação e os fragmentos foram de aproximadamente 350 nucleotídeos para ambos os "primers". O par WD gerou um produto com tamanho de cerca de 200 nucleotídeos, também diferente do esperado, já que para os éxons 2 e 3 o tamanho esperado seria próximo a 1kb.

Através de análise por *Southern blot*, verificou-se que estes fragmentos parecem não ter homologia com a sonda p-CaSpeR-hs. Estes dados, associados com o fato de que WT não amplifica nenhum produto no DNA genômico de *D. willistoni* (Figura 22), sugerem que os fragmentos não correspondam efetivamente

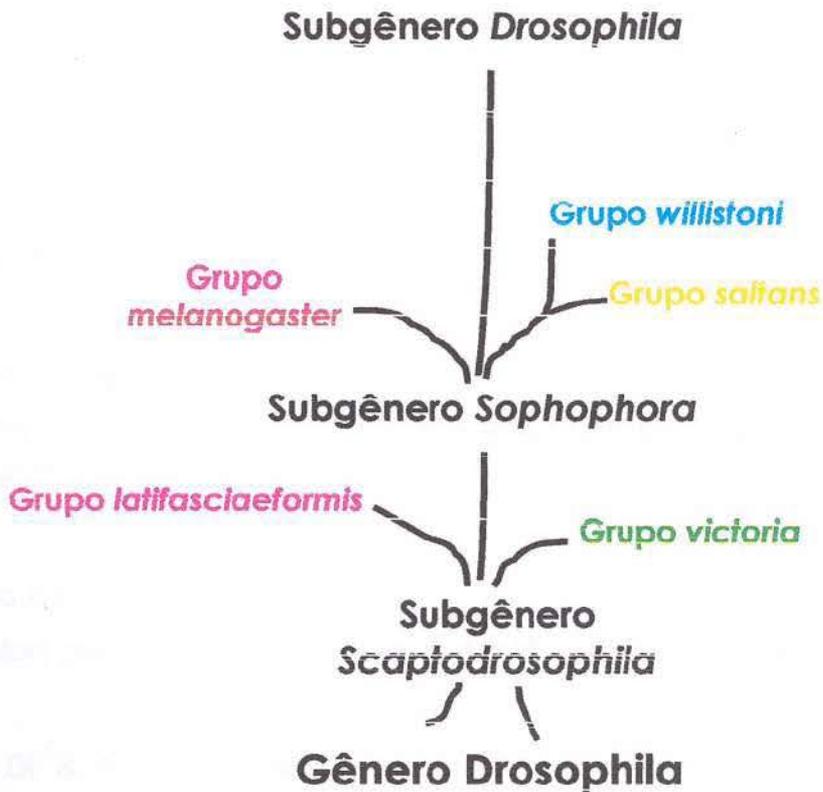
ao locus *white*. Poderiam indicar, por exemplo, a amplificação de produtos inespecíficos com a criação de novos sítios de anelamento do 'primer' no mRNA processado. Para interpretar melhor o significado destes resultados, serão preparadas novas amostras para seqüenciamento.

Uma explicação possível para a baixa homologia encontrada entre *D. melanogaster* e *D. simulans* (espécies utilizadas como controles neste estudo) e *D. willistoni* é o tempo de divergência entre o grupo *willistoni* e o grupo *melanogaster*. A divergência entre estes dois grupos é mostrada na Figura 27. Segundo Powell & DeSalle (1995) e Russo *et al.* (1995), que estimaram tempos de divergência a partir de vários tipos de dados, estas estimativas entre o grupo *willistoni* e o grupo *melanogaster* é de 36-53 milhões de anos.

Outra possibilidade é que o locus *white* não estaria sujeito a uma grande pressão seletiva, o que permitiria alterações em sua seqüência mesmo em regiões de éxons, sem afetar a viabilidade dos indivíduos mutantes. O locus *Adh*, por exemplo, que é crítico para a sobrevivência da mosca em substratos fermentados, ricos em álcool, deveria estar sujeito a fortes pressões seletivas e ser conservado entre as espécies de *Drosophila*. Porém, apresenta uma surpreendente variação na estrutura e organização, já que existem, pelo menos, três diferentes organizações deste locus identificadas dentro do gênero *Drosophila* (Anderson *et al.* 1993).

Logo, os resultados do presente estudo estariam indicando a probabilidade de o locus *white* de *D. willistoni* já apresentar uma seqüência tão divergente do locus de *D. melanogaster*, que os métodos adotados neste trabalho, mostraram-se ineficientes para a sua caracterização em *D. willistoni*.

Fica, portanto, como perspectiva futura para continuidade deste trabalho, identificar uma metodologia adequada para estabelecer qual(is) o(s) provável(is) causador(es) da hipermutabilidade na linhagem 17A2 de *D. willistoni*.



**Figura 17.** Esquema das relações de parentesco entre os grupos das espécies do gênero *Drosophila* (Baseado na filogenia de Throckmorton 1975 e na filogenia consenso de Kwiatowski e Ayala 1999; adaptado de Herédia 2002).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Anderson CL, Carew EA, Powell JR 1993. Evolution of the *Adh* locus in the *Drosophila willistoni* group: the loss of an intron, and shift in codon usage. *Mol Biol Evol*, 10(3): 605-618.
- Ashburner M & Lemeunier F 1976. Relationship within the genus *Drosophila* (Sophophora). In: *Inversion polymorphism in Drosophila melanogaster and Drosophila simulans*. *Proc R Soc Lond B*, 193: 137-157.
- Besansky NJ, Bedell JA, Benedict MQ, Mukabayire O, Hilfiker D & Collins FH 1995. Cloning and characterization of the *white* gene from *Anopheles gambiae*. *Ins Mol Biol*, 4(4): 217-231.
- Bonorino CBC, Silva TC, Abdelhay E, Valente VLS 1993. Heat shock genes in the *willistoni* group of *Drosophila*: induced puffs and proteins. *Cytobios*, 73: 49-64.
- Brower DL & Jaffe SM 1989. Requirement for integrins during *Drosophila* wing development. *Nature*, 342: 285-287.
- Cordeiro AR & Winge H 1995. Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species. In: *Genetics of natural populations. The continuing importance of Theodosius Dobzhansky*. Levine L (ed). Columbia Univ Press, New York. pp. 262-280.
- Da Cunha AB & Dobzhansky Th 1954. A further study of chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* in its relation to environment. *Evolution*, 8: 119-134.

- Da Cunha AB 1956. Differential viability favoring inversion heterozigotes in *Drosophila willistoni*. *Evolution*, 10: 231-234.
- Da Cunha AB, Burla H & Dobzhansky Th 1950. Adaptative chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution*, 4: 212-235.
- Da Cunha AB, Dobzhansky Th, Pavlovsky O & Spassky B 1959. Genetics of natural populations XXXVIII. Supplementary data on the chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* in its relation to the environment. *Evolution*, 13: 389-404.
- Daniels SB & Strausbaugh LD 1986. The distribution of P element sequences in *Drosophila*: the *willistoni* and *saltans* species groups. *Journal of Molecular Evolution*, 23: 128-148.
- Daniels SB, Peterson KR Strausbaugh LD, Kidwell, MG & Chovnick A 1990. Evidence of horizontal transmission of the P transposabe element between *Drosophila* species. *Genetics*, 124: 339-355.
- Dobzhansky Th 1957. Genetics of natural populations. XXVI Chromosomal variability in island and continental populations of *Drosophila willistoni* from Central America and the West Indies. *Evolution*, 11: 280-293.
- Dobzhansky Th & Powell JR 1975. The *willistoni* group of *Drosophila*. In: *Handbook of Genetics*. King RC (ed), vol 3. Plenum Press, New York, pp. 587-622.
- Dressen TD, Johnson DH & Henikoff FS 1988. The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and components of active transport complexes. *Mol Cell Biol*, 8: 5206-5215.

- Ehrmann L & JR Powell 1982. The *Drosophila willistoni* species group. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr. JN (eds). Academic Press, New York, vol 3b. pp. 193-225.
- Engels W 1989. P Elements in *Drosophila melanogaster*. In: *Mobile DNA*. Berg DE & Howe MM(eds). American Society for Microbiology. pp . 437-484.
- Ephrussi B & Beadle GW 1936. A technique of transplantation for *Drosophila melanogaster*. *Amer Natur*, 70: 218-225.
- Finnegan DJ 1990. Transposable elements. *Dros Inf Serv*, 68: 371-381
- Fonte LFM, Torres FP, Loreto ELS, Valente VLS 2002. Mutação espontânea em *Drosophila simulans* causada por um elemento transponível. : XIV Salão de Iniciação Científica e XI Feira de Iniciação Científica – Propeq/UFRGS- Porto Alegre-RS.
- Fristrom D, Gotwals P, Eaton S, Komberg TB, Stutervant M, Bier E & Fristrom JW 1994. *Blistered*: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development*, 120: 2661-2671.
- Fristrom D, Wilcox M & Fristrom JW 1993. The distribution of *PS integrins*, *Laminin A* and *F-actin* during key stages in *Drosophila* wing development. *Development*, 117: 509-523.
- Futuyma DJ 1992, Estrutura Populacional e Deriva Genética. In: *Biologia Evolutiva*, Ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. pp. 126-157.

- Garcia RL, Perkins HD & Howells AJ, 1996. The structure, sequence and developmental pattern of expression of the *white* gene in the blowfly *Lucilia cuprina*. *Ins Mol Biol*, 5(4): 251-260.
- Gomulski LM, Pitts RJ, Costa S, Saccone G, Torti C, Polito LC, Gasperi G, Malacrida AR, Kafatos FC & Zwiebel LJ 2001. Genomic organization and characterization of the *white* locus of the Mediterranean fruitfly, *Ceratitis capitata*. *Genetics*, 157: 1245-1255.
- Goñi B, Parada C, Rohde, C & Valente VLS 2002. Genetic characterization of spontaneous mutations in *Drosophila willistoni*. I. Exchange and non-disjunction of the X chromosome. *Dros Inf Serv*, 84: 80-84.
- Hazlerigg T 1987. The *Drosophila white* gene: a molecular update. *Trends Genet*, 3: 43-47.
- Herédia FO 2002. Evolução do retroelemento *gypsy* em espécies de *Drosophila* e *Zaprionus indianus*: uma abordagem filogenética. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre – RS.
- Inoue YH & Yamamoto M 1987. Insertional DNA and spontaneous mutation at *white* locus in *Drosophila simulans*. *Mol Gen Genet*, 209: 94-100.
- Inoue YH, Taira T & Yamamoto M 1988. Genetics of an unstable mutant of *Drosophila simulans*: reversion, suppression and somatic instability. *Genetics*, 119: 903-912.
- Judd BH 1987. The *white* locus of *Drosophila melanogaster*. In: *Results and Problems of the Cell Differentiation – Structure and Function of Eukaryotic Chromosomes*. Hennig W (ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 81-94.

Klein CC 2002. Estudo de fenômenos possivelmente relacionados com a mobilização de elementos transponíveis e à presença de endoparasitas em populações de *Drosophila willistoni*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre - RS.

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

LabDros – Laboratório de Biologia Molecular - Depto. de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). [on-line] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.ufsm.br/labdros/>. Arquivo capturado em 03 de novembro de 2002.

Lakovaara S & Saura A 1972. Location of enzyme loci in chromosomes of *Drosophila willistoni*. *Experientia*, 28: 355-356.

Lansman RA, Stacey SN, Grigliatti TA & Brock HW 1985. Sequences homologous to the P mobile element of *Drosophila melanogaster* are widely distributed in the subgenus *Sophophora*. *Nature*, 318: 561-563.

Lindsley DL & Zimm GG 1992. *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press: San Diego. pp. 85; 138; 626-627; 759-774.

Loeschcke V, Krebs RA, Dahlgraard J & Michalak P 1997. High-temperature stress and the evolution of thermal resistance in *Drosophila*. in: *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*. Bijlsma R & Loeschcke V (eds). Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, pp. 175-190.

Loreto ELS & Valente VLS 2002. A parte inquieta dos genomas. *Ciência Hoje*, 181(31): 68-71.

- Loreto ELS, Zaha A & Valente VLS 1998. Characterization of a hypermutable strain of *Drosophila simulans*. *Cell Mol Life Sci*, 54: 1283-1290.
- 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.
- Moore JA 1986. Science as a Way of Knowing. *Genetics Amer Zool*, 26: pp. 583-747.
- Muller HJ 1940. Bearings of the *Drosophila* work on systematics. In: *The New Systematics*. Huxley J (ed). Clarendon Press, Oxford.
- Petersen NS & Young P, 1991. Effects of heat shock on development and Actin mRNA stability in *Drosophila*. In: *Heat Shock*. Maresca D & Lindquist S (eds). Springer – Verlag Berlin Heidelberg, pp. 155-161.
- Powell JR & DeSalle R, 1995. *Drosophila* molecular phylogenies and their uses. *Evol Biol*, 28: 87-138.
- Regner LP Pereira MSO, Alonso CEV, Abdelhay E & Valente VLS 1996. Genomic distribution of P elements in *Drosophila willistoni* and search for their relationship with chromosomal inversions. *J Hered*, 87(2): 190-211.
- Regner LP, Abdelhay E, Rohde C, Rodrigues JJS & Valente, VLS 1999. Temperature-dependent gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila willistoni*. *Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto*, 22: 205-211.
- Regner LP, Zaha A, Abdelhay E & Valente VLS 1998. P element in natural population of *Drosophila willistoni* from different geographical origins. *Dros Inf Serv* 81: 156-160.

Rhode C, Abdelhay E, Pinto H Jr, Schrank A, Valente VLS 1995. Analysis and *in situ* mapping of the *Adh* locus in species of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Cytobios*, 81: 37-47.

Rohde C 2000. Polimorfismo cromossômico e elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre – RS.

Russo CAM, Takezaki N & Nei M 1995. Molecular phylogeny and divergence times of *Drosophilid* species. *Mol Biol Evol*, 12: 391-404.

Rutherford SL & Lindquist S 1998. *Hsp90* as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396: 336-342.

Santos-Colares MC 2003. Estudo do comportamento meiótico de espécies do grupo *willistoni* de *Drosophila*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, UFRGS, Porto Alegre - RS.

Sassi AK, Rohde C, Herédia FO & Valente VLS 2000. Estimativa do número de cópias e variação molecular dos elementos transponíveis *P* e *gypsy* em populações de *Drosophila willistoni*. 45º Congresso Nacional de Genética - SBG - Gramado/RS.

Sturtevant AH & Novitski E 1941. The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics*, 58: 113-124.

Sullivan & Sullivan 1975. Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet*, 13: 603-613.

Tearle RG, Belote JM, McKeown M, Baker BS & Howells AJ 1989. Cloning and characterization of scarlet gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 122: 595-606.

Throckmorton L 1975. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: *Handbook of genetics*. R. C. KING(ed.), Plenum, New York. Vol. 3, pp. 421-469.

Torres FP 2001. Caracterização molecular de loco *white* em um mutante espontâneo de *Drosophila simulans*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre - RS.

Weiler KS, Wakimoto BT 1995. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet*, 29: 577-605.

Wilcox M, DiAntonio A & Leptin M 1989. The function of PS integrins in *Drosophila* wing morphogenesis. *Development*, 107: 891-897.

Zusman S, Patel-King RS, French-constant C & Hynes RO 1990. Requirements for integrins during *Drosophila* development. *Development*, 108: 391-402.