

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**Estudo da variabilidade do
gene *mdr49* em duas espécies
crípticas do gênero *Drosophila***

Tatiana Pereira Gonzalez

**Orientação: Prof^a Dra. Marion Schiengold
Co-Orientação: Prof^o Dr. José Artur Bogo Chies**

**Trabalho apresentado como Conclusão de Curso para
obtenção do título de Bacharel na área Molecular, Celular e
Funcional do curso de Ciências Biológicas.**

Março 2003

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr^a Marion Schiengold, Marionzinha, pela acolhida, oportunidade, apoio, lições de vida e lições científicas: obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, Dr José Artur Bogo Chies, Zéca, pelo muito que me ensinou, pelo apoio, amizade e (grande) paciência, muito obrigada!

À Dr^a Nance Beyer Nardi, pelos conselhos e pelo apoio (e por manter toda a turma da Imunogenética “na linha” também), obrigada!

À Dr^a Vera Valente Gaiesky, a todos os seus orientados e a todo o pessoal do Laboratório de Drosophila da UFRGS, obrigada pela ajuda e pelo apoio!

À Dr^a Loreta Brandão de Freitas pelos empréstimos inestimáveis que possibilitaram a realização deste trabalho.

A Alessandra Selbach-Schnadelbach, André Schnorr, Chirlei Klein, Fabiano Torres, Nicole Scherer, Valesca Cardoso e Dr^a Carmen Saavedra: obrigada pela disposição, ensinamentos, conselhos técnicos e amizade!

Ao “imunopovo”: Ale, Aline, Andrei, Andrés, Cami, Claudiran, Daniel, Déia, D^a Dilma, Ed, Elvira, Flávinha, Ígor, Prof^a Kátia, Lindolfo, Luísa, Maísa, Mari, Mel, Pedro, Sharon, Tábita, Tiago e todos que já contribuíram para tornar o “nosso lab” um ótimo lugar para se trabalhar (apesar da superlotação!), obrigado por todo o apoio e pelos muitos conselhos técnicos!

Muito obrigada, também, aos meus colegas, amigos e professores por todas as discussões (“o objetivo da aula é esse!”) e pela amizade e apoio que foram indispensáveis para seguir em frente!

E, para finalizar, agradeço a meus pais, Marco e Aira, por toda a força e paciência de sempre; à minha família, pelo carinho; e, principalmente, obrigada, Rafa, por fazer de mim uma “criaturinha um pouquinho menos estressada” mas muito feliz por te ter ao meu lado.

SUMÁRIO

Introdução	4
Objetivos	12
Material e Métodos	13
Resultados	18
Discussão	20
Referências bibliográficas	24
Anexos	33

INTRODUÇÃO

Drosophila melanogaster sempre teve um papel central na pesquisa biológica, desde o início do desenvolvimento da pesquisa genética até o crescimento acelerado deste campo no século XX. O uso desta espécie em estudos evolutivos foi inicialmente limitado pela idéia de que não seria o material ideal, sendo uma espécie comensal humana e tendo, até então, apenas *Drosophila simulans* como parente próximo. O interesse recaiu sobre esta espécie quando foi documentada a existência de, pelo menos, outras seis espécies próximas (revisão em Lemeunier, David e Tsacas, 1986; Lachaise *et al*, 1988). Estas oito espécies foram então agrupadas no sub-grupo *melanogaster*, e hoje constituem-se num paradigma para estudos de especiação.

O grupo *melanogaster* de espécies de *Drosophila* compreende cerca de 150 espécies, sendo preponderantemente oriental em sua distribuição geográfica (Bock & Wheeler, 1972; Bock, 1980; Lemeunier *et al*, 1986; Ashburner, 1989). Muitos sub-grupos, entretanto, são característicos de outras regiões, em especial da região Afro-tropical. Dentro do grupo *melanogaster* ocorrem onze sub-grupos, cujos estudos filogenéticos foram historicamente baseados nos padrões de bandas dos cromossomos politênicos das glândulas salivares larvais (Lemeunier & Ashburner, 1984). São os sub-grupos *montium*, *ananassae*, *elegans*, *eugracilis*, *ficusphilia*, *suzukii*, *takahashi*, *nipponica*, *melanogaster*, *flavohirta* e *denticulata*. Estes dois últimos se distanciam dos demais pelo menos em estudos baseados em seus cromossomos.

O sub-grupo *melanogaster* inclui as espécies *D. yakuba*, *D. teisseri*, *D. erecta*, *D. orena*, *D. sechellia* e *D. mauritiana*, além das já citadas *D. melanogaster* e *D. simulans* - todas nativas do continente Africano, abaixo do deserto do Saara, e de ilhas além da costa leste da África (Caccone *et al*,

1996). O relacionamento destas oito espécies tem sido até agora proposto com base em estudos de inversões cromossômicas (Lemeunier e Ashburner, 1984), aloenzimas (Eisses, van Dijk e van Delden, 1979; Gonzalez *et al.*, 1982; Cariou, 1987), hidridização DNA-DNA (Caccone, Amato e Powell, 1988), e seqüências de DNA nuclear e mitocondrial (Satta & Takahata, 1990).

As espécies do chamado complexo *Drosophila melanogaster* (que inclui, além desta, *D. simulans*, *D. sechellia* e *D. mauritiana*) têm sido amplamente investigadas, pois as relações estreitas existentes entre elas constituem uma excelente oportunidade para estudos genéticos de eventos recentes de especiação (Kliman & Hey, 1993). As análises de seqüências de DNA de diversos genes revelaram pistas sobre a possível história evolutiva deste complexo: um primeiro evento de especiação teria ocorrido cerca de 3 milhões de anos atrás separando *D. melanogaster* e *D. simulans*; a partir de uma população continental de *D. simulans*, duas populações teriam se isolado em ilhas, dando origem a *D. sechellia* (cerca de 413 000 anos atrás) e a *D. mauritiana* (cerca de 263 000 anos atrás) (Kliman *et al.*, 2000; Caccone *et al.*, 1996).

Drosophila simulans é uma espécie críptica de *Drosophila melanogaster* e ambas são amplamente usadas em estudos evolutivos nos níveis fenotípico, genético e molecular (Hamblin e Veuille, 1999). Morfologicamente, são distinguíveis somente por algumas pequenas diferenças na genitália dos machos (Lemeunier e Ashburner, 1984). Embora esta seja a única característica diagnóstica confiável, Gallo (1973) e Thompson *et al.* (1975) observaram que características como largura da cabeça e pigmentação dos tergitos abdominais poderiam ser utilizadas para a distinção destas espécies.

D. melanogaster e *D. simulans* são muito similares quanto à sua estrutura cromossômica: quanto ao padrão de bandeamento de seus cromossomos politênicos e quanto aos seus mapas de ligação (Ashburner e Lemeunier, 1976). Estes mesmos autores estabeleceram que populações naturais de *D. simulans* são consideravelmente menos polimórficas para inversões paracêntricas do que as de *D. melanogaster*. Lemke *et al.* (1978) registraram que *D. simulans* é muito mais refratária à indução de aberrações cromossômicas pela ação de raios-X do que *D. melanogaster*. Também Inoue (1988) observou que a freqüência com que aberrações são induzidas em *D.*

simulans por trietilamina (TEM) e raios-X é bem menor do que em *D. melanogaster*.

Quanto à variabilidade genética e protéica, é observada uma discordância: enquanto estudos de variação protéica indicam menor variabilidade em *D. simulans*, análises de seqüência de DNA indicam o oposto (*D. melanogaster* seria a espécie menos variável). A variação em aloenzimas é um pouco maior em *D. melanogaster* e, segundo revisão de Lemeunier *et al.* (1986), estas apresentam menor diferenciação geográfica em *D. simulans*. No mesmo sentido, Ohnishi *et al.* (1982) também encontraram menor variabilidade em *D. simulans* quando analisaram proteínas separadas por eletroforese bidimensional. Análises de seqüências de DNA mitocondrial também confirmam uma menor variabilidade em *D. simulans* (Shah e Langley, 1979;).

Por outro lado, polimorfismos de seqüências de DNAs (que vêm sendo muito utilizados em estudos populacionais e evolutivos do gênero *Drosophila*, especialmente visando elucidar as relações existentes entre as espécies do complexo *Drosophila melanogaster*) demonstram que *D. melanogaster* apresenta menor variação de seqüência de DNA do que sua críptica *D. simulans* na maioria dos *loci* analisados - por exemplo, a região *rosy* (Aquadro *et al.*, 1988) e os *loci zeste* e *yolk protein 2* (Hey & Kliman, 1993). Em 1996, Moriyama e Powell analisaram todos os dados disponíveis sobre polimorfismos de seqüências de DNA nuclear em *D. melanogaster*, *D. simulans* e *D. pseudoobscura*, identificando um menor grau de polimorfismo de DNA em *D. melanogaster* quando comparada às outras duas espécies. Em contrapartida, Eanes *et al.* (1993) detectaram níveis similares de polimorfismo em sítios sinônimos entre *D. simulans* e *D. melanogaster* quando analisaram diversas cópias do gene *G6pd* nestas espécies; e Dowsett e Young (1982) encontraram uma proporção bem menor de DNA moderadamente repetitivo no genoma de *D. simulans* em relação a *D. melanogaster*.

Curiosamente, parece haver menor variabilidade quanto ao padrão de fragmentos de restrição de vários elementos de transposição no genoma de várias populações de *D. simulans* da América do Sul, quando comparadas com as do hemisfério norte (Loreto *et al.*, 1998a; Capy, 1987).

Uma possível explicação para tal discordância foi sugerida por Moriyama e Powell (1996): ainda que *D. simulans* apresente maior variação nucleotídica

do que *D. melanogaster*, esta última apresenta maior proporção de polimorfismos de substituição – e isso pode explicar a maior variabilidade proteica em *D. melanogaster*.

Tanto *D. simulans* quanto *D. melanogaster* são cosmopolitas e têm distribuições geográficas similares, mas ambas diferem ecologicamente, pois *D. simulans* não explora ambientes domésticos, associados com habitações humanas, como *D. melanogaster* (Dobzhansky & Pavan, 1950; Kawanishi & Watanabe, 1977; Roualt & David, 1982; Ashburner, 1989). Estudos em laboratório medindo a capacidade de sobrevivência e adaptação a estresses ambientais foram feitos exaustivamente pelo grupo de Parsons (revisões em McKenzie & Parsons, 1972; Parsons, 1975; 1979). Estes autores encontraram, de uma forma geral, que ambas as espécies diferem bastante em sua capacidade de ajuste a variações ambientais. *D. simulans*, apesar de menos resistente a condições como dissecação em laboratório (Parsons, 1979), é encontrada em um número muito maior de tipos de ambientes do que *D. melanogaster*, eminentemente coletada em latas de lixo.

Os genes de resistência a múltiplas drogas

Para se contrapor às toxinas presentes no ambiente, os organismos contam com vários mecanismos de defesa nos níveis celular e molecular. Um dos mais importantes mecanismos celulares é ocasionado pelo fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), caracterizado pela redução da concentração intracelular das toxinas.

O fenômeno da resistência a múltiplas drogas é conhecido desde a década de 60 e está fortemente relacionado a falhas em tratamentos quimioterápicos (Kessel *et al.*, 1965, 1968). A alteração mais fortemente observada em células que apresentam o fenótipo MDR é a expressão aumentada da glicoproteína P (Pgp) na membrana plasmática. A Pgp (P = permeabilidade) é uma proteína transmembrana de 170 kDa, pertencente a uma família de proteínas que transportam substratos naturais (tais como peptídeos, íons inorgânicos, esteróides e lipídios), que atua como uma bomba

de efluxo de drogas dependente de energia (Shustik *et al.*, 1995; Edincott & Ling, 1989).

O resultado da superexpressão desta proteína é o aumento de efluxo de drogas citotóxicas ou uma diminuição na taxa de influxo (Nilsen & Skovsgaard, 1992). O modelo mais aceito para o funcionamento deste mecanismo é o “aspirador hidrofóbico” de Gottesman & Pastan (1993), no qual a Pgp interage diretamente com o substrato na membrana plasmática bombeando-o para fora da célula.

A estrutura secundária desta proteína consiste em duas metades homólogas conectadas por uma seqüência (Figura 1). Cada metade é constituída por um domínio hidrofóbico que possui seis estruturas α -hélice transmembrana e um domínio citoplasmático com um sítio de ligação para ATP na porção C-terminal (Juliano & Ling, 1976). O fornecimento de energia para o funcionamento desta bomba de efluxo se dá pela hidrólise de ATP (Ambudkar *et al.*, 1992). São conhecidos pelo menos dois eventos pós-transcricionais para a Pgp, sendo estes glicosilação e fosforilação (Gottesmann *et al.*, 1995).

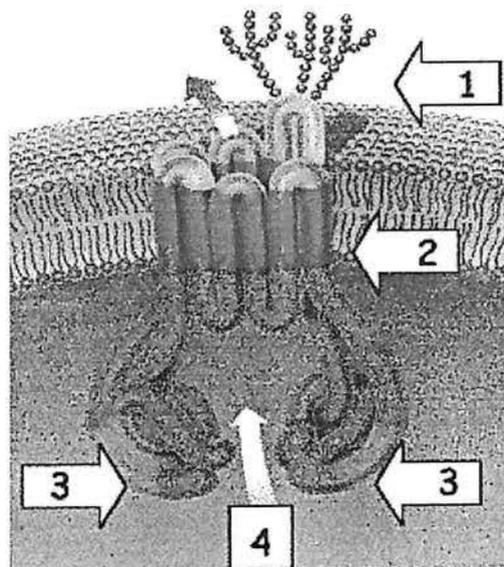


Figura 1. Modelo da estrutura secundária da glicoproteína P. Os números indicam: (1) glicosilação na face externa da membrana plasmática, (2) domínios transmembrana formando um canal, (3) sítios de ligação com ATP e (4) sítio de ligação com o substrato (segundo o modelo de “aspirador hidrofóbico”).

Os genes que codificam a glicoproteína P pertencem a uma família bastante conservada em humanos e roedores. Enquanto que em humanos

foram identificados dois membros (MDR1 e MDR2), três foram descritos em hamster (Pgp1, Pgp2 e Pgp3) e em camundongo (*mdr1*, *mdr2* e *mdr3*).

Comparando-se os genes humanos e murinos, observa-se que o *mdr3* de camundongo e o MDR1 humano apresentam 88% de semelhança, a despeito dos 50 milhões de anos de evolução. As regiões mais conservadas evolutivamente são aquelas relacionadas com os sítios de ligação de ATP (Gottesman & Pastan, 1993). Os genes de ambas as espécies consistem de 28 éxons, 27 dos quais contém seqüências codificadoras correlacionadas a domínios potenciais. Os íntrons são posicionados em sítios homólogos entre as regiões codificadoras (Lincke *et al.*, 1991).

Devido à importante função dos genes MDR, estes devem ter correspondentes nas mais diversas espécies (com efeito, uma busca por “*mdr*” no GenBank resulta em seqüências detectadas em bactérias, fungos, plantas, insetos, anfíbios, aves e mamíferos, entre outros organismos). Como *Drosophila melanogaster* é o organismo eucarioto paradigma para a genética, a detecção desta família gênica nesta espécie foi uma das primeiras buscas realizadas.

Em 1991, Wu *et al.* identificaram três genes homólogos a MDR em *D. melanogaster*. Os dois primeiros, localizados na região 49 EF do cromossomo 2 e na região 65A do cromossomo 3, foram caracterizados a partir de sondas de *mdr1* de camundongo. O alinhamento das seqüências de DNA indica que tanto o *mdr49* quanto o *mdr65* (dois homólogos de MDR de *D. melanogaster*) têm de 50 a 52% de similaridade com a região codificadora dos dois cDNAs correspondentes de humanos, sendo que os dois homólogos de *Drosophila* têm 53% de identidade entre si. Isto é bastante diferente da situação encontrada para esta família em humanos, cujos homólogos compartilham 76% de sua seqüência de ácidos nucléicos (Gottesman & Pastan, 1993). Com relação à seqüência de aminoácidos, estes dois homólogos de *Drosophila* são idênticos em 46% das posições. Os membros da família MDR humana compartilham 77% dos seus aminoácidos.

Estes dois homólogos *mdr* de *Drosophila* (*mdr49* e *mdr65*) estão localizados em cromossomos diferentes, ao contrário do que é observado em mamíferos, onde genes MDR agrupam-se em um único par de cromossomos tanto em humanos, quanto em camundongos e hamsters. Isto pode explicar,

em parte, a divergência entre os dois homólogos em *Drosophila*, os quais são evolutivamente tão distantes um do outro quanto o são dos genes de mamíferos. O gene *mdr49* claramente não é essencial para a viabilidade. Não se sabe ainda, entretanto, se isto se deve ao fato de realizar uma função não essencial ou se outros membros de sua família multigênica são capazes de compensar sua perda, já que a similaridade de função entre genes relacionados de *Drosophila* é um evento comum para muitos *loci* (Maroni *et al.*, 1987; Mokdad *et al.*, 1987). Interessantemente, Borst *et al.* (1993) observaram que camundongos homozigotos para inativação de *mdr1* ou *mdr3* eram aparentemente normais. Em 1997, Schinkel *et al.* observaram o mesmo efeito quando criaram camundongos com deficiência para os genes *mdr1* e *mdr3* combinados. Estes resultados sugerem que não existem funções restritas (ou que estas podem ser compensadas por outros fatores) às principais isoformas *mdr* tanto em insetos quanto em mamíferos. Apesar dos intensos esforços em identificar os mecanismos moleculares associados com a função da Pgp, os substratos endógenos destas moléculas de transporte continuam desconhecidos (Bosch *et al.*, 1996). Com relação à função destes genes, sabe-se unicamente que o *mdr49* confere resistência a colchicina (Wu *et al.*, 1991).

O terceiro gene homólogo a *mdr* encontrado em *Drosophila* está também situado no cromossomo 2, tendo sido denominado *mdr50*. A proteína codificada por este gene possui dois domínios transmembrana e dois sítios de ligação com ATP, apresentando alto grau de similaridade com genes *mdr* de mamíferos (Gerrard *et al.*, 1993).

Além destes, os genes *white* e *brown* de *Drosophila* também estão relacionados com os genes *mdr*. Os produtos destes genes transportam precursores de pigmento, funcionando de uma maneira similar aos demais genes *mdr* (Dressen *et al.*, 1988). Em 1997, Croop *et al.* verificaram que o gene *white* é o responsável pelo transporte de guanina e triptofano. A clonagem e o seqüenciamento dos homólogos deste gene em humanos e camundongos demonstraram que há uma similaridade de 55 a 58% de aminoácidos.

Atualmente, estudos de polimorfismos em genes MDR têm sido bastante explorados, quer seja como candidatos à ferramenta para análise de expressão em células cancerosas (Mickley *et al.*, 1998), quer seja em avaliação de polimorfismos populacionais (Hoffmeyer *et al.*, 2000), ou ainda em estudos

populacionais. Neste último caso, Kin *et al.* (2001) identificaram uma série de polimorfismos no gene MDR1 humano com diferentes níveis de ocorrência entre americanos de origem europeia ou africana.

Em 2000, Mascali analisou parte do gene *mdr49* de *Drosophila simulans* e, comparando-o com a críptica *D. melanogaster*, observou a existência de um íntron idêntico (em posição e seqüência) em ambas as espécies. Naquele trabalho, foi também analisado o uso preferencial de códons, resultando em dados semelhantes aos encontrados para o gene *Adh* (Akashi, 1994). Os resultados obtidos por Mascali em 2000 foram promissores, sugerindo que o uso do sistema *mdr* poderia ser interessante para estudos filogenéticos. Durante a continuação desta investigação, foi detectada a possibilidade de existência de variabilidade intra-específica, o que motivou a realização do presente trabalho.

OBJETIVOS

1. Caracterizar, do ponto de vista molecular, o gene *mdr49* em diferentes linhagens de *Drosophila simulans*, identificando polimorfismos intra-específicos.
2. Caracterizar, do ponto de vista molecular, o gene *mdr49* em uma linhagem de *Drosophila melanogaster*, identificando polimorfismos intra-específicos em comparação com a seqüência disponível para esta espécie no GenBank.
3. Estudar as diferenças intra e inter-específicas entre *Drosophila melanogaster* e *Drosophila simulans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Drosophila melanogaster e *Drosophila simulans*

Diferentes linhagens de *Drosophila simulans* provenientes de populações naturais de diferentes localidades (Figura 2, Tabela 1) foram utilizadas. Para a amostra de *Drosophila melanogaster* foi utilizada uma única linhagem.

Tabela 1. Proveniências das linhagens de *D. simulans* utilizadas.

Linhagem	Proveniência
ELD	Eldorado do Sul, RS, Brasil
ITA	Itapuã, RS, Brasil
CAM	Ilha do Campeche, SC, Brasil

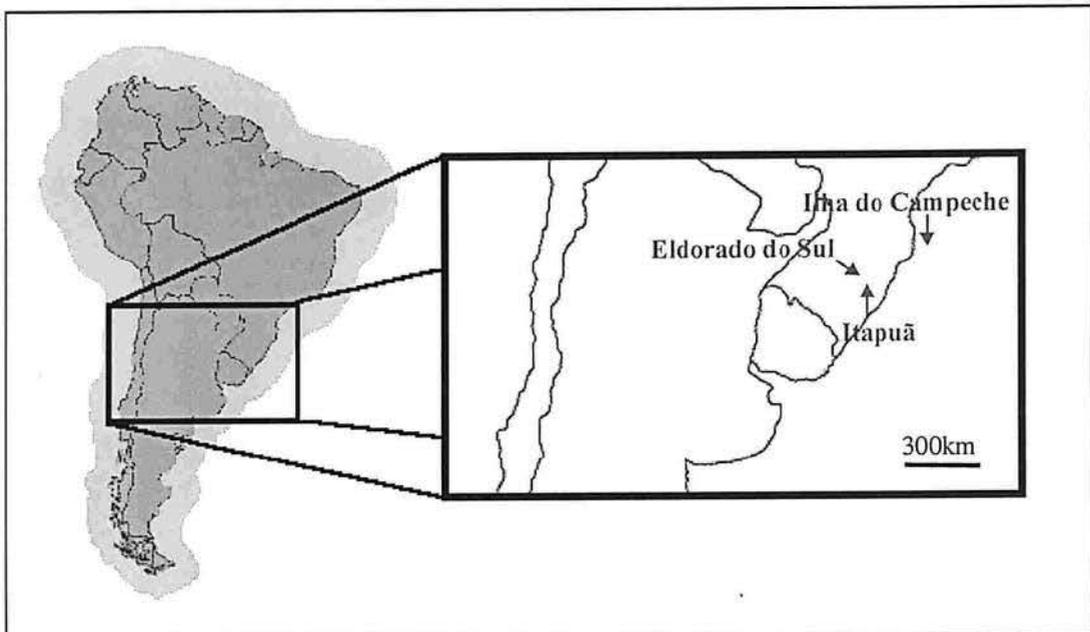


Figura 2. Localização das populações de *Drosophila simulans* utilizadas.

Os estoques de moscas são mantidos por cruzamento massal em câmara de temperatura constante (25°C) e em meio de cultura padrão (Marques *et al.*, 1966) no Laboratório de *Drosophila* do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Extração de DNA e RNA

Tanto o DNA quanto o RNA foram isolados a partir de obtidas por maceração de moscas em nitrogênio líquido – para tanto, foram utilizadas amostras que continham em torno de 0,30g de moscas (cerca de cem indivíduos). Para evitar a contaminação por material genético de ácaros (que geralmente infestam os estoques de moscas), cada amostra passou por uma triagem em microscópio óptico, na qual foram eliminados os parasitas ou as moscas que os apresentavam.

A seqüência de *Drosophila melanogaster* é geralmente obtida em bancos de dados da Internet. Neste caso, porém, foi necessária a extração de DNA desta espécie para a análise de ocorrência e seqüência de íntrons, uma vez que a seqüência padrão obtida nos bancos de dados é referente ao cDNA e não permite este tipo de análise.

As extrações de DNA foram feitas utilizando a técnica de fenol/clorofórmio e precipitação em etanol. A técnica de extração de RNA foi realizada através do “Quick Prep Total RNA Extraction Kit” da Amersham Pharmacia.

Amplificação de fragmentos do gene *mdr49*

Para a amplificação de diferentes fragmentos dos genes *mdr*, o material obtido na extração foi submetido a técnicas de amplificação via PCR e RT-PCR. Estas amplificações foram feitas com *primers* específicos desenhados para *D. melanogaster* (Tabela 2).

Tabela 2. *Primers* desenhados a partir de seqüências do gene *mdr49* de *D. melanogaster*.

<i>mdr49up</i>	5'	TCCTGTTGGTAGTCAGTCTGCTG	3'
<i>mdr49a</i>	5'	ATCATCTACCTGTGCATGGC	3'
<i>mdr49sonda</i>	5'	GCTGGACACATTTCGTTTCGA	3'
<i>mdr49reverse</i>	5'	CTTCCGTATCGGATATTCTCG	3'
<i>mdr49again</i>	5'	TCAGACAGGTTCTGCGACTT	3'

A PCR foi realizada em reações com volume total de 25 µl, contendo:

- 17,3 µl de água tratada,
- 2,5 µl de tampão para PCR 10X,
- 0,7 µl de MgCl₂,
- 0,5 µl de DNTP,
- 1 µl de Taq Polimerase,
- 1 µl de *primer foward*,
- 1 µl de *primer reverse* e
- 1 µl de DNA.

As condições de amplificação via PCR consistiram em um ciclo inicial de três minutos de desnaturação a 94°C seguido de 40 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 60°C (para anelamento dos *primers*) e um minuto a 72°C (para polimerização do fragmento de interesse), finalizando com um ciclo de extensão de 10 minutos a 72°C.

Para a amplificação a partir de RNA, foi utilizada um kit que permite a conversão em cDNA e a amplificação de fragmentos específicos ao mesmo tempo através de RT-PCR. A realização desta reação foi feita de acordo com o protocolo do kit utilizado, "*Ready-to-GoTM RT-PCR Beads*" (Amershan Pharmacia). As condições foram as seguintes: 25 minutos a 42°C, 5 minutos a 94°C (desnaturação), 40 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto a 60°C (anelamento dos *primers*) e um minuto a 72°C (polimerização), finalizando com 10 minutos a 72°C (extensão).

Análise de fragmentos do gene *mdr49*

Para confirmar a amplificação dos fragmentos, foi feita a visualização dos produtos de PCR e de RT-PCR através da eletroforese em gel de agarose. Neste caso foi utilizado gel de agarose 1% com brometo de etídio em TBE e um marcador de peso molecular de 100 pares de base ("*100 Base-Pair Ladder*", Amershan Pharmacia). Também foi realizada a quantificação da concentração das amplificações através desta mesma técnica, utilizando, desta vez, gel de agarose 1,4% e um marcador de concentração molecular ("*Low DNA Mass Ladder*", GIBCO).

Seqüenciamento

O seqüenciamento dos fragmentos amplificados foi feito através do método de Sanger, utilizando-se o kit para seqüenciamento automático para ABI PRISM 310 "*BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*" (Applied Biosystems) ou o kit para seqüenciamento manual "*Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit*" (Amershan Pharmacia). Em ambos os casos, a primeira etapa consiste em um "pré-tratamento" com Exonuclease (*Exonuclease I*, USB) e Fosfatase Alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, USB) para a degradação de DNA fita simples e fosforilação de nucleotídios livres, respectivamente – como os reagentes utilizados na PCR ainda estão presentes, estas enzimas impedirão que as concentrações exigidas *primers* e nucleotídeos livres na reação de seqüenciamento sejam alteradas.

Seqüenciamento automático

A reação de seqüenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do kit, na condição de 25 ciclos de vinte segundos a 96°C e quatro minutos a 60°C. A partir daí, o material deve ser mantido no escuro, para que as propriedades fluorescentes não sejam alteradas. Na etapa final, é feita uma

purificação com acetado de sódio e etanol, uma ressuspensão com “*Template Suppression Reagent*”, fornecido pelo kit, e uma desnaturação a 95°C por cinco minutos. O material tratado desta forma foi colocado no seqüenciador automático.

Seqüenciamento manual

A reação de seqüenciamento foi realizada na condição de 35 ciclos de trinta segundos a 95°C, trinta segundos a 55°C e um minuto a 72°C, seguidos de dez minutos a 72°C. Ao fim do processo, é acrescentado “*Stop Solution*” (fornecido pelo kit) para inativar a enzima *Thermo Sequenase*. O material foi analisado em gel de poliacrilamida 0,8% e a leitura foi feita por autoradiografia.

Análise das seqüências

As seqüências foram analisadas com os programas Chromas, ClustalX e GeneDoc, que possibilitam a comparação entre diferentes seqüências de DNA, inferência da proteína, identificação do quadro de leitura e localização dos códons de iniciação e terminação. As diferentes seqüências, tanto de DNA, como de cDNA, obtidas de ambas as espécies foram comparadas com informações estocadas em bancos de dados específicos, tais como o *Genbank*.

RESULTADOS

Foram seqüenciados dois diferentes fragmentos codificadores (denominados A e B neste trabalho) de diferentes linhagens de *D. simulans* (Tabela 3). O primeiro fragmento está localizado entre as posições 391pb e 577pb do cDNA de *D. melanogaster* disponível no GenBank, totalizando 186pb (62 aminoácidos), e foi analisado na linhagem ELD de *D. simulans*. O segundo localiza-se entre as posições 1092pb e 1671pb, compreendendo 579pb (173 aminoácidos), tendo sido analisado nas linhagens ELD, ITA, CAM de *D. simulans*. As seqüências destes fragmentos encontram-se no Anexo 1.

Tabela 3. Fragmentos seqüenciados (posição no cDNA de *D. melanogaster* disponível no GenBank) para cada linhagem de *D. simulans*.

	Tamanho (em pb)	Posição
Fragmento 1 (total)	186	391-577
ELD	186	391-577
Fragmento 2 (total)	579	1092-1671
ELD	579	1092-1671
ITA	140	1420-1560
CAM	59	1237-1296
	164	1420-1584

Para *D. melanogaster*, foram seqüenciados dois fragmentos codificadores (denominados B e C neste trabalho). O primeiro (B) contém 456pb, codificando 152 aminoácidos, e está localizado entre as posições 1132pb e 1587. O segundo (C) contém 240pb, codificando 80 aminoácidos, e está localizado entre as posições 1867pb e 2115pb. As seqüências destes fragmentos encontram-se no Anexo 2.

Análise intra-específica

Na análise realizada entre as linhagens de *D. simulans* não foi detectada variação (Anexo 1). Já na comparação entre a seqüência de *D. melanogaster* disponível no GenBank com a obtida neste trabalho para a mesma espécie (Anexo 2), detectou-se variação de nucleotídeos. Em quase 700pb comparados, cinco mutações foram encontradas, sendo três transições e duas transversões, todas sinônimas. Destas, três localizam-se no fragmento B (1239 T→C; 1389 A→C; 1548 T→C) e duas, no fragmento C (1948 A→G; 2092 G→C).

Análise inter-específica

Na comparação entre *D. melanogaster* e *D. simulans*, foram detectadas duas mutações pontuais, ambas sinônimas. Estas mutações encontram-se em fragmentos seqüenciados apenas para a linhagem ELD. A primeira mutação localiza-se na posição 427 do fragmento A, constituindo-se uma transverção (A → C) e a segunda, na posição 1638 do fragmento B, constituindo uma transição (C → T).

DISCUSSÃO

Neste trabalho foram seqüenciados fragmentos do gene *mdr49* de três linhagens de *D. simulans* e de uma linhagem de *D. melanogaster*. Além disto, foi utilizada uma seqüência de *mdr49* depositada no GenBank relativa ao cDNA de *D. melanogaster*.

O primeiro fragmento (A – Anexo 1) obtido para *D. simulans* tem 186pb, localizando-se entre as posições 391 e 577 no cDNA de *D. melanogaster*, e o segundo (B – Anexo 1), tem 579pb, entre as posições 1092 e 1671. Para *D. melanogaster*, o primeiro fragmento obtido (B – Anexo 2) tem 456pb e está localizado entre as posições 1132pb e 1587, enquanto o segundo (C – Anexo 2) tem 240pb e está localizado entre as posições 1867pb e 2115pb.

Como referido anteriormente, os genes da família MDR apresentam um alto grau de conservação quando representantes de organismos distintos são comparados – a exemplo de 88% de semelhança encontrada entre os homólogos de camundongos e humanos. Entre organismos tão próximos como as crípticas *D. melanogaster* e *D. simulans*, portanto, é esperado um grau de homologia ainda maior. De fato, a análise das seqüências de *D. simulans* e *D. melanogaster* aponta para mais de 99% de identidade de seqüência nucleotídica e de aminoácidos. No mesmo sentido, há a existência de um íntron em ambas as espécies, entre os códons 159 e 160, com 58pb.

A não detecção de polimorfismos intra-específicos em *D. simulans* é surpreendente, considerando-se o encontrado para *D. melanogaster* neste trabalho e na literatura. Para cada espécie, foram seqüenciados cerca de 700pb. Cinco diferenças nucleotídicas foram encontradas na seqüência de *D. melanogaster* em relação aos dados disponíveis para esta espécie no

GenBank – sendo três no fragmento B e duas, no C. Neste trabalho foi utilizada apenas uma linhagem de *D. melanogaster* e a seqüência depositada no GenBank.

A descrição da estrutura terciária da Pgp em camundongos (Di Pietro *et al.*, 1999) sugere que a região correspondente ao fragmento B estaria relacionada ao trecho da proteína que contém o sítio de ligação com ATP. Uma vez que é sugerido que sítios de ligação com ATP devam sofrer maior pressão seletiva, a uniformidade das seqüências analisadas na linhagem de *D. simulans* neste fragmento poderia ser explicada pelo seu provável posicionamento na estrutura da proteína.

A variabilidade encontrada para estas espécies nestes fragmentos provavelmente não é representativa da realidade. Comparando-se os dados obtidos neste trabalho para *D. simulans* com os obtidos por Mascali (2000), pode-se observar que, no fragmento A, um evento de adição/deleção não foi encontrado e que, na posição 544, há discordância de nucleotídeo (transversão) sem conseqüente troca de aminoácido (Quadro 1). Talvez a não detecção de variação para o fragmento A possa ser explicada pela análise de apenas uma linhagem neste trabalho, enquanto Mascali não especifica a(s) linhagem(s) utilizada(s). Em relação ao fragmento B, as linhagens aqui analisadas apresentaram diferenças em quatro posições quando comparadas com o obtido por Mascali: transversão na posição 1182 e transições nas posições 1239, 1248 e 1512. No entanto, todas estas variações são sinônimas. Um dos sítios de variação intra-específica detectados (posição 1239) apresenta a mesma possibilidade de nucleotídios em ambas as espécies (C/T).

Na comparação entre os dados aqui obtidos para *D. melanogaster* e *D. simulans*, detectou-se duas alterações, ambas sinônimas. A primeira encontra-se no fragmento A (427A→C) e a segunda, no fragmento B (1628 C→T). Acrescentando-se os dados obtidos por Mascali em 2000 aos aqui descritos, tem-se as alterações listadas no Quadro 1.

		Posição	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. simulans</i>
Fragmento	A	427	A	C
		515-527	–	adição/deleção / –
		544	A	T / A
	B	1182	G	G / T
		1248	A	A / G
		1389	A / C	A
		1512	A	A / G
		1548	C / T	C
		1638	C	T

Quadro 1. Alterações entre *D. melanogaster* e *D. simulans* nos fragmentos A e B do gene *mdr49*. Sinais de / indicam variação intra-específica.

Analisando-se os dados do Quadro 1, observa-se que, na grande maioria dos casos, uma espécie apresenta duas possibilidades de nucleotídeos em uma determinada posição, enquanto a outra espécie apresenta uma destas apenas. Em todos estes casos, as variações são sinônimas. Em um dos casos onde ocorre diferença com alteração de aminoácido(s) – o evento de adição/deleção – a mesma situação é observada. Em *D. simulans* este evento é linhagem-dependente.

Comparações entre a variabilidade destas duas espécies são encontradas na literatura. Aquadro *et al.* (1988) encontraram seis vezes mais variação na seqüência de DNA da região *rosy* em *D. simulans* do que em *D. melanogaster*. Em 1993, Hey e Kliman analisaram parte do *locus zeste* e parte do *locus yolk protein 2*, encontrando também maior nível de polimorfismo em *D. simulans* do que em *D. melanogaster* e em *D. sechellia*. Também, no *locus* da *Pgd*, Begun e Aquadro (1994) detectaram maior proporção de polimorfismos em *D. simulans* do que em *D. melanogaster*. E, em 1996, Moriyama e Powell analisaram todas as seqüências de DNA nuclear disponíveis para três espécies de *Drosophila* (*D. melanogaster*, *D. simulans* e *D. pseudoobscura*), encontrando menor grau de polimorfismo em *D. melanogaster* do que nas outras duas espécies. Por outro lado, Martin-Campos *et al.* (1992) detectaram menor variação nucleotídica na região *y-ac-sc* em *D. simulans* do que em *D. melanogaster*. No presente trabalho, a magnitude de variação de nucleotídeos nas duas espécies parece ser semelhante.

Pôde-se, então, verificar que tanto em *D. simulans* como em *D. melanogaster* ocorrem variações intra-específicas. Não existe polimorfismo de nucleotídeos espécie-específico. A variação em nucleotídeos observada em uma espécie contém a opção utilizada pela outra espécie. A magnitude de variação em nucleotídeos nas duas espécies parece ser semelhante. Sendo assim, os dados obtidos neste trabalho sugerem que os genes da família MDR são interessantes para estudos de polimorfismos moleculares intra e inter-específicos. Um estudo de polimorfismos em *MDR1* humano já demonstrou este potencial, pois alguns dos alelos encontrados apresentaram freqüências populacionais distintas (Kim *et al.*, 2001). A ampliação da amostra do gene estudado, assim como a análise de um maior número de linhagens em cada espécie permitiria conclusões sobre o uso preferencial de códon. Seria interessante também incluir o estudo de alguma espécie filogeneticamente mais distante, o que traria uma contribuição maior para o entendimento do significado das variações encontradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKASHI, H. 1994. Sinonimous codon usage in *Drosophila melanogaster*: natural selection and translational accuracy. **Genetics** 136:927-935.
- AMBUDKAR, S. V.; LELONG, I. H. & ZHANG, J. 1992. Partial purification and reconstitution of the human multidrug resistance pump: characterization of the drug stimuable ATP hydrolisis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 89:8472-8476.
- AQUADRO, C. F.; LADO, K. M. & NOON, W. A. 1988. The *rosy* region of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. I. Contrasting levels of naturally occurring DNA restriction map variation and divergence. **Genetics** 119:875-888.
- ASHBURNER, M. 1989. *Drosophila: A Laboratory Handobook*. CHS Press. N. York. pp. 1167 - 1188.
- ASHBURNER, M. & LEMEUNIER, F. 1976. Relationships within the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). I. Inversion polymorphism in *D. melanogaster* and *D. simulans*. **Proceedings of the Royal Society of London** 193B:137-157.
- BEGUN, D. J. & AQUADRO, C. F. 1994. Evolutionary inferences from DNA variation at the 6-phosphogluconate dehydrogenase locus in natural populations of *Drosophila*: selection and geographic differentiation. **Genetics** 136:155-171.

- BOCK, I. R. 1980. Current status of the *Drosophila melanogaster* species - group (Diptera). **Systematic Entomology** 5:341-356.
- BOCK, I. R. & WHEELER, M R. 1972. The *Drosophila melanogaster* species group. **University of Texas Publishing** 7213:1-102.
- BORST, P.; SCHINKEL, A. H.; SMIT, J. J. M.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMTER, L.; SMITH, A. J.; EIJDENS, E. W. H. M.; BASS, F. & ZAMAN, G. J. R. 1993 Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoprotein in mammals. **Pharmacology & Therapeutics** 60:289-299.
- BOSH, I; JACKSON, G. R.; CROOP, J. M. I. *et al.* 1996. Expression of *Drosophila melanogaster* P-glycoproteins is associated with channel activity. **American Journal of Physiology** 271(5 Pt 1):C1527-C1538.
- CACCONI, A., AMATO, G. D., POWELL, J. R. 1988 Rates and patterns of scnDNA and mtDNA divergence within the *Drosophila melanogaster* subgroup. **Genetics** 118:671-683.
- CACCONI, A.; MORIYAMA, E. N.; GLEASON, J. M.; NIGRO, L. & POWELL, J. R. 1996. A molecular phylogeny for the *Drosophila melanogaster* subgroup and the problem of polymorphism data. **Molecular Biology and Evolution** 13(9):1224-1232.
- CAPY, P. 1987. Variabilité génétique des populations naturelles de *Drosophila melanogaster* et de *Drosophila simulans*. **Thèse Université Paris XI**, 217 pp.
- CARIOU, M. L. 1987. Biochemical phylogeny of the eight species in the *Drosophila melanogaster* sub-group, including *D. sechellia* and *D. orena*. **Genetic Research** 50:181-185.

- CROOP, J. M.; TILLER, G. E.; FLETCHER, J. A. LUX, M. L.; RAAB, E.; GOLDENSON, D.; SON, D.; ARCINIEGAS, S. & WU, R. L. 1997. Isolation and characterization of homolog mammalian of the *Drosophila white* gene. **Gene** 187:77-85.
- DI PIETRO, A.; DAYAN, G.; CONSEIL, G.; STEINFELS, E.; KRELL, T.; TROMPIERD; BAUBICHON-CORTAY, H. & JAULT, M. 1999. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research** 32(8):925-939.
- DRESSEN, T. D.; JOHNSON, D. H. ; HENIKOFF. S. 1988. The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and to components of active transport complexes. **Molecular and Cellular Biology** 5206 - 5215.
- DOBZHANSKY, T. & PAVAN, C. 1950. Local seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. **Journal of Animal Ecology** 19:1-14.
- DOWSETT, A. P. & YOUNG, M. W. 1982 Differing levels of dispersed repetitive DNA among closely related species of *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 79:4570-4574.
- EANES, W. F.; KIRCHNER, M. & YOON, J. 1993. Evidence for adaptative evolution of the *G6pd* gene in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 90:7475-7479.
- EISSES, K. T., van DIJK, H., van DELDEN, W. 1979. Genetic differentiation within *melanogaster* species group of the genus *Drosophila* (*Sofhodhora*). **Evolution** 33:1063-1068.

- ENDICOTT, J.A. & LING, V. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. **Annual Review of Biochemistry** 58:137-171.
- GALLO, A. 1973 Morphological distinction between female *Drosophila melanogaster* and female *Drosophila simulans*. **Ciência e Cultura** 25: 341-345.
- GERRARD, B; STEWART, C. & DEAN, M. 1993. Analysis of *Mdr50*: a *Drosophila* P-glycoprotein multidrug resistance gene homolog. **Genomics** 17:83-88.
- GONZALEZ, A. M., CABRERA, V. M., LARRUGA, J. M., GULLON, A. 1982. Genetic distance in the sibling species *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, and *Drosophila mauritiana*. **Evolution** 36:804-822.
- GOTTESMAN, M. M. & PASTAN, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by multidrug transporter. **Annual Review of Biochemistry** 62:386-427.
- GOTTESMAN, M. M.; HRYCYNIA, C. A.; SCHOENLEIN, P. V.; GERMANN, U. A. & PASTAN, I. 1995. Genetic analysis of the multidrug transporter. **Annual Review of Genetic** 29:607-649.
- HAMBLIN, M. T. & VEUILLE, M. 1999. Population structure among African and derived populations of *Drosophila simulans*: evidence for ancient subdivision and recent admixture. **Genetics** 153:305-317.
- HEY, J. & KLIMAN, R. 1993. Population genetics and phylogenetics of DNA sequence variation at multiple loci within the *Drosophila melanogaster* species complex. **Molecular Biological and Evolution** 10(4):804-822.

- HOFFMEYER, S.; BURK, O.; von RICHTER, O.; ARNOLD, H. P.; BROCKMÖLLER, J.; JOHNE, A.; CASCORBI, I.; GERLOFF, T.; ROOTS, I.; EICHELBAUN, M. & BRINKMANN, U. 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. . **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 97(7):3473-3478.
- INOUE, Y. 1988. Chromosomal mutation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Mutation Research** 197:85-02.
- JULIANO, R. L. & LING, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cells mutants, **Biochem Biophys Acta** 455:152-162.
- KAWANISHI, M. & WATANABE, T. K. 1997. Ecological factors controlling the coexistence of the sibling species. *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*. **Japanese Journal of Ecology** 27:279-283.
- KESSEL, D.; HALL, T. C.; ROBERTS, D. *et al.* 1965. Uptake as a determinant of the methotrexate response in mouse leukemia. **Science** 150:752-754.
- KESSEL, D.; BOTTERILL, V.; WODINSKI, I. 1968. Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. **Cancer Research** 28:938-941.
- KIN, R. B.; LEAKE, B. F.; CHOO, E. F.; DRESSER, G. K.; KUBBA, S. V.; SCHWARTZ, U. I.; TAYLOR, A. XIE, H.; MCKINSEY, J.; ZHOU, S.; LAN, L.; SCHUETZ, J. D.; SCHUETZ, E. G. & WILKINSON, G. R. 2001. Identification of functionally variant *MDR1* alleles among European Americans and African Americans. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 70(2):189-199.

- KLIMAN, R. M. & HEY, J. 1993. DNA sequence variation at the *period* locus within and among species of the *Drosophila melanogaster* complex. **Genetics** 133:375-387.
- KLIMAN, R. M.; ADOLFATTO, P.; COYNE, P. A.; DEPAULIS, F.; KREITMAN, M.; BERRY, A. J.; McCARTER, J.; WAKELEY, J. & HEY, J. 2000. The population genetics of the origin and divergence of the *Drosophila simulans* complex species. **Genetics** 156:1913-1931.
- LACHAISE, D.; CARIOU, M.; DAVID, J. R.; LEMEUNIER, F.; ASHBURNER, M. 1988 Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. **Evolutionary Biology** 22:159-227.
- LEMEUNIER, F.; ASHBURNER, M. 1984. Relationships in the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). IV. The chromosomes of two new species. **Chromosoma** 89:343-351.
- LEMEUNIER, F.; DAVID, J. R.; TSACAS, L. 1986. The *melanogaster* species group. Pp. 148-256 in ASHBURNER, M., CARSON, H. L., THOMPSON, J. N., eds. Genetics and biology of *Drosophila*. Vol. 3e. Academic Press, New York.
- LEMEUNIER, F.; DAVID, J. R.; TSACAS, L.; ASHBUERNER, M. 1996 The *melanogaster* species subgroup. In: Ashburner, M.; Carnon, H. L.; Thompson, Jr. J. N. (eds) The genetics and biology of *Drosophila*, vol 3e. Academic Press, London, pp 148-239.
- LEMKE, D. E.; TONZETICH, J. & SHUMEYKO, M. V. 1978. Resistance to radiation induced chromosomal rearrangements in *Drosophila simulans*. **Drosophila Information Service** 53:159-161.
- LINCKE, C. R.; SMIT, J. J. M.; VAN DER VELDE-KOERTS, T. *et al.* 1991. Structure of the human *Mdr3* gene and physical mapping of the

human MDR Locus. **Journal of Biological Chemistry** 226(8):5303-5310.

LORETO, E. L.; ZAHA, A. & VALENTE, V. L. S. 1998. Transposable elements in South American populations of *Drosophila simulans*. **Genetics, Selection, and Evolution** 30:173-182.

MARTIN-CAMPOS, J. M.; COMERÓN, J. M.; MIYASHITA, N & AGUADE, M. 1992. Intraspecific and interspecific variation at the *y-ac-sc* region of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 130:805-816.

MARONI, G.; WISE, J.; YOUNG, J. E. *et al.* 1987. Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster* **Genetics** 117:739-744.

MARQUES, E. K.; NAPP, M.; WINGE, H. & CORDEIRO, A. R. 1966. A corn meal soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. **Drosophila Information Service** 41:187.

MASCALI, A. M. M. R. 2000. Caracterização molecular de um gene de resistência a múltiplas drogas em *Drosophila simulans*. Relatório submetido ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – ênfase molecular, celular e funcional. **UFRGS**, Porto Alegre, RS.

MCKENZIE, J. A. & PARSONS, P. A. 1972. Alcohol tolerance: an ecological parameter in the relative success of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Oecologia** 10:373-388.

MICKLEY, L. A.; LEE, J.; WENG, Z.; ZHAN, Z.; ALVAREZ, M.; WILSON, W.; BATES, S. & FOJO, T. 1998. Genetic polymorphism in *MDR-1*: a tool for

examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. **Blood** 91(5):1749-1756.

MOKDAD, R.; DEBEC, A.; WEGNEZ, M. 1987. Metallothionein in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 84:2658-2662.

MORIYAMA, E. N. & POWELL, J. R. 1996. Intraspecific nuclear DNA variation in *Drosophila*. **Molecular Biological and Evolution** 13(1):261-277.

NILSEN, D & SKOVSGAARD, T. 1992. P-glycoprotein as multidrug transporter – a critical review of current multidrug resistance cell lines. **Biochem Biophys Acta** 1139(3):169-183.

OHNISHI, S.; BROWN, A. J. L.; VOELKER, R. A.; LANGLY, C. H. 1982 Estimation of genetic variability in natural populations of *D. simulans* by two-dimensional and satsch gel eletrophoresis. **Genetics** 100:127-136.

PARSONS, P. A. 1975. The comparative evolutionary biology of the sibling species, *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Quarterly Reviews of Biology** 50:151-169.

PARSONS, P. A. 1979. Resistance of the sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* to thigh temperatures in relation to humidity: evolutionary implications. **Evolution**. 33(1):131-136.

ROUALT, J. & DAVID, J. R. 1982. Evolutionary biology of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: a behavioural divergence in microhabitat selection. **Acta Oecologica – Oecologia Generalis** 3:331-338.

- SATTA, Y. & TAKAHATA, N. 1990. Evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA and the history of the *melanogaster* subgroup. . **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 87:9558-9562.
- SHINKEL, A. H.; MAYER, U.; WAGENAAR, E.; MOL, C. A. A. M.; VAN DEEMTER, L.; SMIT, J. J. M.; VAN DERVALK, M. A.; VOORDOUW, A. C.; SPITS, H.; VAN TELLINGEN, O. ZIJLMANS, J. M.; FIBBE, W. E. & BORST, P. 1997. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug transporting) P-glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 94:4028-4033.
- SHAH, D. M. & LANGLEY, C. H. 1979 Intern and intraespecific variation in restriction maps of *Drosophila* mitochondrial DNAs. **Nature** 281: 696-699.
- SHUSTIK, C., DALTON, W. & GROS, P. 1995. P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells – biochemistry, clinical relevance and modulation. **Molecular Aspects of Medicine** 16:1-18.
- THOMPSON, J. N., JR.; HISEY, B. N. & WOODRUFF, R. C. 1975. Morphological differences between the females of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **SouthWest Naturalist** 24:204-205.
- WU, C. T.; BUDDING, M.; GRIFINN, M. S. *et al.* 1991. Isolation and characterization of *Drosophila* multidrug resistance gene homologs. **Molecular and Cellular Biology** 11(8):3940-3948.

ANEXOS

ANEXO 1
Fragmento A
Fragmento B

Fragmento A

Seqüência de 62 aminoácidos (186pb) detectada para a linhagem ELD (Eldorado do Sul, RS) de *D. simulans* comparada com a seqüência de cDNA de *D. melanogaster* disponível no GenBank. A única mutação detectada está assinalada na caixa cinza. O símbolo][indica a posição do íntron encontrada por Mascali (2000). Os números à direita indicam a posição do último aminoácido e da última base (assim como os números acima) na seqüência de cDNA de *D. melanogaster*.

	411	431	451	
<i>D. simulans</i> ELD	ValAspArgThrValGlyValGlyThrSerSerProAlaPheAlaLeuProMetPheGlyGly			
<i>D. melanogaster</i>	ValAspArgThrValGlyValGlyThrSerSerProAlaPheAlaLeuProMetPheGlyGly			151
<i>D. melanogaster</i>	GTGGACCGAACAGTCGGCGTGGGCACATCCTCGCCAGCCTTTGCTCTGCCCATGTTTGGTGGC			454
<i>D. simulans</i> ELD	GTGGACCGAACAGTCGGCGTGGGCACATCCTCGCCCGCCTTTGCTCTGCCCATGTTTGGTGGC			

	471	491	511	
<i>D. simulans</i> ELD	GlyGlnGlnLeu][ThrAsnAlaSerLysGluGlyAsnAsnGlnAlaIleIleAspAspAla			
<i>D. melanogaster</i>	GlyGlnGlnLeu][ThrAsnAlaSerLysGluGlyAsnAsnGlnAlaIleIleAspAspAla			171
<i>D. melanogaster</i>	GGTCAGCAATTG][ACAAATGCCAGCAAAGAGGAGAACAACCAGGCGATCATTGATGATGCG			514
<i>D. simulans</i> ELD	GGTCAGCAATTG][ACAAATGCCAGCAAAGAGGAGAACAACCAGGCGATCATTGATGATGCG			

	531	551	571	
<i>D. simulans</i> ELD	ThrAlaPheGlyIleGlySerLeuValGlySerValAlaMetPheLeuLeuIleThrLeuAla			
<i>D. melanogaster</i>	ThrAlaPheGlyIleGlySerLeuValGlySerValAlaMetPheLeuLeuIleThrLeuAla			192
<i>D. melanogaster</i>	ACTGCCTTTGGCATTGGCAGTCTGGTGGGATCTGTGGCCATGTTCTGCTCATCACACTGGCC			577
<i>D. simulans</i> ELD	ACTGCCTTTGGCATTGGCAGTCTGGTGGGATCTGTGGCCATGTTCTGCTCATCACACTGGCC			

Fragmento B

Seqüência de 173 aminoácidos (579pb) detectada para a linhagem ELD (Eldorado do Sul, RS) de *D. simulans* comparada com a seqüência de cDNA de *D. melanogaster* disponível no GenBank e com as seqüências de fragmentos das linhagens ITA (Itapuã, RS) e CAM (Ilha do Campeche, SC). As mutações detectadas estão assinaladas em caixas cinza. Os pontos nas linhagens CAM e ITA indicam regiões não seqüenciadas para este fragmento. Os números à direita indicam a posição do último aminoácido e última base (assim como os números acima) na seqüência de cDNA de *D. melanogaster*.

	1112	1132	1152	
<i>D. simulans</i> CAM			
<i>D. simulans</i> ITA			
<i>D. simulans</i> ELD	IleIleTyrLeuCysMetAlaLeuAlaIleTrpTyrGlyValThrLeuIleLeuAspGlu			
<i>D. melanogaster</i>	IleIleTyrLeuCysMetAlaLeuAlaIleTrpTyrGlyValThrLeuIleLeuAspGlu			384
<i>D. melanogaster</i>	ATCATCTACCTGTGCATGGCCCTTGCCATCTGGTATGGTGTGACGCTCATTCTGGACGAG			1152
<i>D. simulans</i> ELD	ATCATCTACCTGTGCATGGCCCTTGCCATCTGGTATGGTGTGACGCTCATTCTGGACGAG			
<i>D. simulans</i> ITA			
<i>D. simulans</i> CAM			
	1172	1192	1212	
<i>D. simulans</i> CAM			
<i>D. simulans</i> ITA			
<i>D. simulans</i> ELD	ArgAspLeuProAspArgValTyrThrProAlaValLeuValIleValLeuPheAlaVal			
<i>D. melanogaster</i>	ArgAspLeuProAspArgValTyrThrProAlaValLeuValIleValLeuPheAlaVal			404
<i>D. melanogaster</i>	CGTGATCTTCCCGATCGCGTTTATACTCCGCGCGTTCTGGTCATTGTCCTGTTCCGCCGTG			1212
<i>D. simulans</i> ELD	CGTGATCTTCCCGATCGCGTTTATACTCCGCGCGTTCTGGTCATTGTCCTGTTCCGCCGTG			
<i>D. simulans</i> ITA			
<i>D. simulans</i> CAM			

	1232	1252	1272	
<i>D. simulans</i> CAM	PheAlaSerProHisValGluAlaIleAlaValAla		
<i>D. simulans</i> ITA		
<i>D. simulans</i> ELD		IleMetGlyAlaGlnAsnLeuGlyPheAlaSerProHisValGluAlaIleAlaValAla		
<i>D. melanogaster</i>		IleMetGlyAlaGlnAsnLeuGlyPheAlaSerProHisValGluAlaIleAlaValAla	424	
<i>D. melanogaster</i>		ATCATGGGTGCCCAGAATCTCGGTTTTCGCTCTCCACACGTGGAAGCCATTGCTGTGGCC	1272	
<i>D. simulans</i> ELD		ATCATGGGTGCCCAGAATCTCGGTTTTCGCTCTCCACACGTGGAAGCCATTGCTGTGGCC		
<i>D. simulans</i> ITA		
<i>D. simulans</i> CAM	TTTGCCTCTCCACACGTGGAAGCCATTGCTGTGGCC		

	1292	1312	1332	
<i>D. simulans</i> CAM		ThrAlaAlaGlyGlnThrLeuPhe.....		
<i>D. simulans</i> ITA		
<i>D. simulans</i> ELD		ThrAlaAlaGlyGlnThrLeuPheAsnIleIleAspArgProSerGlnValAspProMet		
<i>D. melanogaster</i>		ThrAlaAlaGlyGlnThrLeuPheAsnIleIleAspArgProSerGlnValAspProMet	444	
<i>D. melanogaster</i>		ACGGCAGCTGGCCAGACCCTGTTCAACATCATCGATCGTCCGTCGCAGGTGGATCCAATG	1332	
<i>D. simulans</i> ELD		ACGGCAGCTGGCCAGACCCTGTTCAACATCATCGATCGTCCGTCGCAGGTGGATCCAATG		
<i>D. simulans</i> ITA		
<i>D. simulans</i> CAM		ACGGCAGCTGGCCAGACCCTGTTTC.....		

	1352	1372	1392	
<i>D. simulans</i> CAM	
<i>D. simulans</i> ITA	
<i>D. simulans</i> ELD	AspGluLysGlyAsnArgProGluAsnThrAlaGlyHisIleArgPheGluGlyIleArg			
<i>D. melanogaster</i>	AspGluLysGlyAsnArgProGluAsnThrAlaGlyHisIleArgPheGluGlyIleArg			464
<i>D. melanogaster</i>	GACGAGAAGGGAAACAGGCCGGAGAATACCGCTGGACACATTCGTTTCGAGGGCATAACGC			1392
<i>D. simulans</i> ELD	GACGAGAAGGGAAACAGGCCGGAGAATACCGCTGGACACATTCGTTTCGAGGGCATAACGC			
<i>D. simulans</i> ITA	
<i>D. simulans</i> CAM	

	1412	1432	1452	
<i>D. simulans</i> CAM	
<i>D. simulans</i> ITA	
<i>D. simulans</i> ELD	PheArgTyrProAlaArgProAspValGluIleLeuLysGlyLeuThrValAspValLeu			
<i>D. melanogaster</i>	PheArgTyrProAlaArgProAspValGluIleLeuLysGlyLeuThrValAspValLeu			484
<i>D. melanogaster</i>	TTCCGTTACCCCGCCCGTCCGGATGTGGAGATCCTCAAGGGTCTGACCGTCGATGTGCTT			1452
<i>D. simulans</i> ELD	TTCCGTTACCCCGCCCGTCCGGATGTGGAGATCCTCAAGGGTCTGACCGTCGATGTGCTT			
<i>D. simulans</i> ITA	
<i>D. simulans</i> CAM	

	1472	1492	1512	
<i>D. simulans</i> CAM	ProGlyGlnThrValAlaPheValGlyAlaSerGlyCysGlyLysSerThrLeuIleGln			
<i>D. simulans</i> ITA	ProGlyGlnThrValAlaPheValGlyAlaSerGlyCysGlyLysSerThrLeuIleGln			
<i>D. simulans</i> ELD	ProGlyGlnThrValAlaPheValGlyAlaSerGlyCysGlyLysSerThrLeuIleGln			
<i>D. melanogaster</i>	ProGlyGlnThrValAlaPheValGlyAlaSerGlyCysGlyLysSerThrLeuIleGln			504
<i>D. melanogaster</i>	CCGGGTCAGACGGTGGCCTTCGTGGGCGCATCTGGGTGTGGCAAGAGCACCCTCATCCAA			1512
<i>D. simulans</i> ELD	CCGGGTCAGACGGTGGCCTTCGTGGGCGCATCTGGGTGTGGCAAGAGCACCCTCATCCAA			
<i>D. simulans</i> ITA	CCGGGTCAGACGGTGGCCTTCGTGGGCGCATCTGGGTGTGGCAAGAGCACCCTCATCCAA			
<i>D. simulans</i> CAM	CCGGGTCAGACGGTGGCCTTCGTGGGCGCATCTGGGTGTGGCAAGAGCACCCTCATCCAA			

	1532	1552	1572	
<i>D. simulans</i> CAM	LeuMetGlnArgPheTyrAspProGluAlaGlySerValLysLeuAspGlyArgAspLeu			
<i>D. simulans</i> ITA	LeuMetGlnArgPheTyrAspProGluAlaGlySerValLysLeuAsp.....			
<i>D. simulans</i> ELD	LeuMetGlnArgPheTyrAspProGluAlaGlySerValLysLeuAspGlyArgAspLeu			
<i>D. melanogaster</i>	LeuMetGlnArgPheTyrAspProGluAlaGlySerValLysLeuAspGlyArgAspLeu			524
<i>D. melanogaster</i>	CTGATGCAGCGGTTCTACGACCCCGAAGCGGGCAGCGTCAAACCTGGATGGACGGGATCTT			1572
<i>D. simulans</i> ELD	CTGATGCAGCGGTTCTACGACCCCGAAGCGGGCAGCGTCAAACCTGGATGGACGGGATCTT			
<i>D. simulans</i> ITA	CTGATGCAGCGGTTCTACGACCCCGAAGCGGGCAGCGTCAAACCTGGAT.....			
<i>D. simulans</i> CAM	CTGATGCAGCGGTTCTACGACCCCGAAGCGGGCAGCGTCAAACCTGGATGGACGGGATCTT			

	1592	1612	1632	
<i>D. simulans</i> CAM	ArgThrLeuAsn.....			
<i>D. simulans</i> ITA			
<i>D. simulans</i> ELD	ArgThrLeuAsnValGlyTrpLeuArgSerGlnIleGlyValValGlyGlnGluProVal			
<i>D. melanogaster</i>	ArgThrLeuAsnValGlyTrpLeuArgSerGlnIleGlyValValGlyGlnGluProVal			544
<i>D. melanogaster</i>	CGAACACTGAATGTGGGCTGGTTGCGTTCGCAGATCGGAGTGGTGGGCCAGGAACCGGTT			1632
<i>D. simulans</i> ELD	CGAACACTGAATGTGGGCTGGTTGCGTTCGCAGATCGGAGTGGTGGGCCAGGAACCGGTT			
<i>D. simulans</i> ITA			
<i>D. simulans</i> CAM	CGAACACTGAAT.....			

	1652			
<i>D. simulans</i> CAM			
<i>D. simulans</i> ITA			
<i>D. simulans</i> ELD	LeuPheAlaThrThrIleGlyGluAsnIleArgTyrGly			
<i>D. melanogaster</i>	Leu Phe AlaThrThrIleGlyGluAsnIleArgTyrGly			557
<i>D. melanogaster</i>	CTCTTCGCCACCACCATTGGCGAGAATATCCGATACGGA			1671
<i>D. simulans</i> ELD	CTCTTTGCCACCACCATTGGCGAGAATATCCGATACGGA			
<i>D. simulans</i> ITA			
<i>D. simulans</i> CAM			

ANEXO 2
Fragmento B
Fragmento C

Fragmento B

Seqüência de 152 aminoácidos (456pb) detectada para a *D. melanogaster* comparada com a seqüência de cDNA de *D. melanogaster* disponível no GenBank. As mutações detectadas estão assinaladas em caixas cinza. Os números no fim de cada linha indicam a posição do último aminoácido e base (assim como os números da primeira linha) na seqüência do GenBank.

	1152		
<i>D. melanogaster</i>	ValThrLeuIleLeuAspGlu		
GenBank	ValThrLeuIleLeuAspGlu		384
GenBank	GTGACGCTCATTCTGGACGAG		1152
<i>D. melanogaster</i>	GTGACGCTCATTCTGGACGAG		
	1172	1192	1212
<i>D. melanogaster</i>	ArgAspLeuProAspArgValTyrThrProAlaValLeuValIleValLeuPheAlaVal		
GenBank	ArgAspLeuProAspArgValTyrThrProAlaValLeuValIleValLeuPheAlaVal		404
GenBank	CGTGATCTTCCCGATCGCGTTTATACTCCGGCCGTTCTGGTCATTGTCCTGTTCGCCGTG		1212
<i>D. melanogaster</i>	CGTGATCTTCCCGATCGCGTTTATACTCCGGCCGTTCTGGTCATTGTCCTGTTCGCCGTG		
	1232	1252	1272
<i>D. melanogaster</i>	IleMetGlyAlaGlnAsnLeuGlyPheAlaSerProHisValGluAlaIleAlaValAla		
GenBank	IleMetGlyAlaGlnAsnLeuGlyPheAlaSerProHisValGluAlaIleAlaValAla		424
GenBank	ATCATGGGTGCCCGAATCTCGGTTTTCGCCTCTCCACACGTGGAAGCCATTGCTGTGGCC		1272
<i>D. melanogaster</i>	ATCATGGGTGCCCGAATCTCGGTTTTCGCCTCTCCACACGTGGAAGCCATTGCTGTGGCC		

	1292	1312	1332	
<i>D. melanogaster</i>	ThrAlaAlaGlyGlnThrLeuPheAsnIleIleAspArgProSerGlnValAspProMet			
GenBank	ThrAlaAlaGlyGlnThrLeuPheAsnIleIleAspArgProSerGlnValAspProMet			444
GenBank	ACGGCAGCTGGCCAGACCCTGTTCAACATCATCGATCGTCCGTCGCAGGTGGATCCAATG			1332
<i>D. melanogaster</i>	ACGGCAGCTGGCCAGACCCTGTTCAACATCATCGATCGTCCGTCGCAGGTGGATCCATTG			
	1352	1372	1392	
<i>D. melanogaster</i>	AspGluLysGlyAsnArgProGluAsnThrAlaGlyHisIleArgPheGluGlyIleArg			
GenBank	AspGluLysGlyAsnArgProGluAsnThrAlaGlyHisIleArgPheGluGlyIleArg			464
GenBank	GACGAGAAGGGAAACAGGCCGGAGAATACCGCTGGACACATTCGTTTCGAGGGCATACGC			1392
<i>D. melanogaster</i>	GACGAGAAGGGAAACAGGCCGGAGAATACCGCTGGACACATTCGTTTCGAGGGCATCCGC			
	1412	1432	1452	
<i>D. melanogaster</i>	PheArgTyrProAlaArgProAspValGluIleLeuLysGlyLeuThrValAspValLeu			
GenBank	PheArgTyrProAlaArgProAspValGluIleLeuLysGlyLeuThrValAspValLeu			484
GenBank	TTCCGTTACCCCGCCCCTCCGGATGTGGAGATCCTCAAGGGTCTGACCGTCGATGTGCTT			1452
<i>D. melanogaster</i>	TTCCGTTACCCCGCCCCTCCGGATGTGGAGATCCTCAAGGGTCTGACCGTCGATGTGCTT			
	1472	1492	1512	
<i>D. melanogaster</i>	ProGlyGlnThrValAlaPheValGlyAlaSerGlyCysGlyLysSerThrLeuIleGln			
GenBank	ProGlyGlnThrValAlaPheValGlyAlaSerGlyCysGlyLysSerThrLeuIleGln			504
GenBank	CCGGGTCAGACGGTGGCCTTCGTGGGCGCATCTGGGTGTGGCAAGAGCACCCTCATCAA			1512
<i>D. melanogaster</i>	CCGGGTCAGACGGTGGCCTTCGTGGGCGCATCTGGGTGTGGCAAGAGCACCCTCATCAA			

		1532		1552		1572	
<i>D. melanogaster</i>	LeuMetGlnArgPheTyrAspProGluAlaGlySerValLysLeuAspGlyArgAspLeu						
GenBank	LeuMetGlnArgPheTyrAspProGluAlaGlySerValLysLeuAspGlyArgAspLeu						524
GenBank	CTGATGCAGCGGTTCTACGACCCCGAAGCGGGCAGTGTCAAACCTGGATGGACGGGATCTT						1572
<i>D. melanogaster</i>	CTGATGCAGCGGTTCTACGACCCCGAAGCGGGCAGCGTCAAACCTGGATGGACGGGATCTT						
<i>D. melanogaster</i>	ArgThrLeuAsnVal						
GenBank	ArgThrLeuAsnVal						529
GenBank	CGAACACTGAATGTG						1587
<i>D. melanogaster</i>	CGAACACTGAATGTG						

Fragmento C

Seqüência de 80 aminoácidos (240pb) detectada para a *D. melanogaster* comparada com a seqüência de cDNA de *D. melanogaster* disponível no GenBank. As mutações detectadas estão assinaladas em caixas cinza. Os números no fim de cada linha indicam a posição do último aminoácido e base (assim como os números da primeira linha) na seqüência do GenBank.

	1887	1907	1927	
<i>D. melanogaster</i>	AlaThrSerAlaLeuAspProThrSerGluLysArgValGlnSerAlaLeuGluLeuAla			
GenBank	AlaThrSerAlaLeuAspProThrSerGluLysArgValGlnSerAlaLeuGluLeuAla			642
GenBank	GCCACCTCTGCCCTGGATCCCACCTCTGAGAAGCGGGTGCAAAGTGCCCTAGAACTGGCC			1927
<i>D. melanogaster</i>	GCCACCTCTGCCCTGGATCCCACCTCTGAGAAGCGGGTGCAAAGTGCCCTAGAACTGGCC			
	1947	1967	1987	
<i>D. melanogaster</i>	SerGlnGlyProThrThrLeuValValAlaHisArgLeuSerThrIleThrAsnAlaAsp			
GenBank	SerGlnGlyProThrThrLeuValValAlaHisArgLeuSerThrIleThrAsnAlaAsp			662
GenBank	AGCCAGGGACCAACCACTCTAGTTGTGGCCCACCGACTGTCCACCATCACCAATGCCGAC			1987
<i>D. melanogaster</i>	AGCCAGGGACCAACCACTCTGGTTGTGGCCCACCGACTGTCCACCATCACCAATGCCGAC			
	2007	2027	2047	
<i>D. melanogaster</i>	LysIleValPheLeuLysAspGlyValValAlaGluGlnGlyThrHisGluGluLeuMet			
GenBank	LysIleValPheLeuLysAspGlyValValAlaGluGlnGlyThrHisGluGluLeuMet			682
GenBank	AAGATTGTCTTCCTCAAGGACGGTGTAGTGGCGGAGCAGGGTACGCACGAGGAGCTCATG			2047
<i>D. melanogaster</i>	AAGATTGTCTTCCTCAAGGACGGTGTAGTGGCGGAGCAGGGTACGCACGAAGAGCTCATG			
	2067	2087	2107	
<i>D. melanogaster</i>	GluArgArgGlyLeuTyrCysGluLeuValSerIleThrGlnArgLysGluAlaThrGlu			
GenBank	GluArgArgGlyLeuTyrCysGluLeuValSerIleThrGlnArgLysGluAlaThrGlu			702
GenBank	GAGCGACGTGGTCTCTACTGCGAACTGGTGAGCATCACCCAGCGGAAGGAGGCCACGGAG			2107
<i>D. melanogaster</i>	GAGCGACGTGGTCTCTACTGCGAACTGGTGAGCATCACCCAGCGCAAGGAGGCCACGGAG			