



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
Campus São Gabriel

**Caracterização do retrotransposon 412
em espécies do gênero *Drosophila***

LEANDRO AMANCIO DOS SANTOS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CARACTERIZAÇÃO DO RETROTRANSPOSON 412 EM ESPÉCIES DO
GÊNERO *DROSOPHILA*

LEANDRO AMANCIO DOS SANTOS

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres

Rio Grande do Sul

Outubro de 2013

CARACTERIZAÇÃO DO RETROTRANSPOSON 412 EM ESPÉCIES DO GÊNERO
DROSOPHILA

LEANDRO AMANCIO DOS SANTOS

ORIENTADOR: FABIANO PIMENTEL TORRES

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres

Dra. Adriana Koslovski Sassi

Prof. Dr. Ricardo José Gunski

São Gabriel, outubro de 2013.

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, Leandro Amancio dos

Caracterização do retrotransposon *412* em espécies do gênero *Drosophila*/
Leandro Amancio dos santos. – Rio Grande do Sul: UNIPAMPA, *Campus* São
Gabriel, 2013.

XI, [40p] f.: il.; 30 cm.

Orientador: [Fabiano Pimentel Torres]

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – UNIPAMPA/ *Campus* São
Gabriel/ Trabalho de Conclusão de Curso, 2013.

Referências: f. 23 – 26.

1. Biologia Molecular. 2. Tipagem Molecular. 3. *Drosophila*. 4. Elementos
Transponíveis. 5. Retrotransposons. 6. Ciências Biológicas – Monografia I.
Torres, Fabiano Pimentel. II. Universidade Federal do Pampa, *Campus* São
Gabriel, Trabalho de Conclusão de Curso. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao professor/tutor/orientador Fabiano Torres, ou simplesmente Fabiano, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela confiança que tens em mim e na minha capacidade e por se dispor a dividir comigo seu conhecimento e suas experiências.

A toda minha família: Edilson e Elias (pai um e pai dois), meus irmãos Edvandro, Evandro e Juliana e especialmente minha mãe, Cristina, por ter feito todo o possível, sempre, para que nunca me faltasse nada, pelo carinho e até pelas inúmeras broncas que moldaram quem eu sou hoje. Nenhuma das minhas conquistas, daquelas já alcançadas àquelas que o futuro ainda me reserva, seria possível sem o apoio de vocês.

A Dione pela amizade, incentivo, confiança, companhia, cumplicidade, carinho, pelas inúmeras lições de vida e acadêmicas, por me fazer ganhar uns quilinhos nestes anos de convivência, por me fazer perder a paciência inúmeras vezes, mas principalmente por ter estado ao meu lado incondicionalmente.

Aos meus amigos de sempre da Bio, especialmente Débora, Otake (Chan), Gi e Amanda por todos os momentos inesquecíveis, pela companhia nas filas escaldantes do RU ouvindo música *sertanoja*, pelos cochilos atrás da oca e corredores, pelo campeonato de rolimã e identificação de *cabronídeos*, por tudo que ensinei e principalmente por tudo que aprendi ao lado de vocês.

A todos os meus colegas da unipampa, especialmente ao pessoal da turma 12, que desde a minha chegada nesta universidade me acolheu e me tratou como se eu sempre tivesse feito parte da turma. Obrigado por fazerem com que eu me sentisse em casa.

À Prof^a Analia, Prof. Ricardo, e todo pessoal do grupo de pesquisa em Diversidade Genética Animal pelo apoio e todo o suporte de materiais e reagentes e pelo ótimo ambiente de trabalho, seja no laboratório antigo como no recém-nascido laboratório de biologia molecular.

Aos técnicos de laboratório da UNIPAMPA Adri, Ruti e Adriano, pela disposição e pela ajuda em inúmeros momentos e Ronaldo da UFSM pelo sequenciamento das minhas “amostras de água”.

Ao pessoal do Laboratório de *Drosophila* da UFRGS, especialmente à Prof^a Vera e à Maríndia, pelos estoques de moscas, pelo suporte, pelo apoio, pelos incentivos e pelo muito que pude aprender com vocês mesmo tendo tido tão pouca convivência.

Ao Prof. Andrés e sua equipe pela disponibilidade nos momentos em que precisei de ajuda, por ter em estoque todo e qualquer material que eu precisasse e por deixá-lo à disposição sempre que necessário. Espero não ter abusado muito.

A todos aqueles que porventura não tenham sido citados e que tenham colaborado direta ou indiretamente com a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DO RETROELEMENTO *412* EM ESPÉCIES DO GÊNERO *DROSOPHILA*

Elementos Transponíveis (TEs) são sequências de DNA que possuem a capacidade de se mobilizar dentro do genoma hospedeiro ou horizontalmente entre genomas distintos. À dinâmica destes elementos nos genomas é atribuída grande importância evolutiva por atuarem como fontes de recombinações e de novidades genéticas. A compreensão das questões acerca da dinâmica, diversidade e evolução dos TEs tem sido intensamente estudada no genoma de espécies de *Drosophila*, por tratar-se de um eficiente modelo para estudos genéticos. O TE *412*, descrito originalmente em *Drosophila melanogaster*, pertence à superfamília Ty3 (retrotransposon) e já foi encontrado no genoma de várias espécies do gênero *Drosophila*, por técnicas de hibridização, apresentando considerado grau de polimorfismos em suas cópias. Investigar a natureza desta diversidade de cópias pode ser uma ferramenta útil para compreender melhor a história evolutiva deste TE nos genomas de *Drosophila*, bem como para colaborar com a construção da filogenia das próprias espécies do gênero. Com o objetivo de detectar a presença deste elemento em diferentes espécies do gênero *Drosophila*, caracterizar molecularmente as possíveis cópias encontradas e avaliar suas similaridades, foi realizada amplificação por PCR utilizando iniciadores para *412* de *D. melanogaster* em 11 espécies do subgênero *Drosophila*, nove espécies do subgênero *Sophophora* e uma espécie do subgênero *Dorsilopha*. Produtos da amplificação foram hibridizados por *Southern blot* utilizando como sonda o fragmento interno do elemento *412* de *D. melanogaster*. Fragmentos amplificados foram purificados e submetidos a sequenciamento. Dentre as 21 espécies estudadas, 14 apresentaram amplificação do elemento *412*, entretanto, apenas em *D. funebris*, *D. buzzatii*, *D. kikkawai* e *D. simulans*, além de *D. melanogaster*, sua presença foi confirmada pela hibridização, com evidente variação no padrão apresentado, o que sugere uma possível

diferença nas cópias encontradas nestas espécies, com divergência, inclusive, entre as espécies de um mesmo grupo. Apenas o fragmento isolado de *D. simulans* (White) resultou em uma sequência com qualidade para análise. Esta sequência foi analisada *in silico* através da ferramenta BLAST e demonstrou alta similaridade com o elemento canônico de *D. melanogaster* (89%) e com outras regiões do genoma de *D. melanogaster* e *D. sechelia*. Nossos dados reforçam as informações disponíveis na literatura acerca da ampla distribuição deste TE entre as espécies do gênero *Drosophila* sob uma abordagem molecular.

Palavras-chave: Elementos Transponíveis; Retrotransposon 412; *Drosophila*;

ABSTRACT

CARACTERIZATION OF *412* RETROELEMENT IN SPECIES OF *DROSOPHILA* GENUS

Transposable Elements (TEs) are DNA sequences with ability to mobilize itself either into the host genome or horizontally between different genomes. Because their dynamic in the host genomes to them is attributed great evolutionary importance by act as sources of genetic recombination and novelties. The understanding of the issues about the dynamics, diversity and evolution of TEs has been intensively studied in the genome of *Drosophila*, because it is an efficient model for genetic studies. The *412* TE, was originally characterized in the *Drosophila melanogaster* genome. It belongs to Ty3 superfamily (retrotransposon) and have been detected in several species of the Genus *Drosophila* (by hybridizations techniques), where it presents a high degree of polymorphic copies. Thus, to investigate the nature of this diversity can be an efficient way for a better understanding of the evolutionary history of this TE in *Drosophila*'s genome as well as to help the comprehension of the phylogeny of this genus itself. In order to detect the presence of this TE in different species of *Drosophila* Genus, to characterize its possible copies found and to compare their similarity, we performed a PCR amplification using primers for *412* from *D. melanogaster* in 11 species of the subgenus *Drosophila*, nine species of the subgenus *Sophophora* and one specie of the subgenus *Dorsilopha*. Products of this amplification were hybridized by *Southern blot* using as a probe the intern fragment of *412* TE from *D. melanogaster*. The amplified fragments were purified for subsequent sequencing and analysis. Among the 21 investigated species, 14 presented amplifications for *412* TE, however, just in *D. funebris*, *D. buzzatii*, *D. kikkawai* and *D. simulans*, besides *D. melanogaster*, their presence was confirmed by hybridization. We observed high variation on the detected patterns, which suggests differences between the copies amplified on these analyzed species and divergences even among species of a same

group. Further sequencing and analyses of the sequences will allow to evaluate the similarity between this TE copies in the analyzed genomes. Only the fragment isolated from *D. simulans* (White) resulted in a sequence with quality for analysis. This sequence was analyzed *in silico* by BLAST tool and showed high homology with the canonical element of *D. melanogaster* (89%) and other regions of the genome of *D. melanogaster* and *D. sechelia*. Our data reinforce the available knowledge about the wide distribution of TE among species of the genus *Drosophila*, now under a molecular approach.

Key-words: Transposable Elements; 412 Retrotransposon; *Drosophila*.

SUMÁRIO

Resumo	VI
Abstract	VIII
Sumário	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Elementos transponíveis	1
1.2. Estrutura e Classificação de Elementos Transponíveis	2
1.3. Ciclo de vida e Transferência Horizontal de TEs	4
1.4. O elemento <i>412</i>	5
1.5. O gênero <i>Drosophila</i>	6
1.6. TEs em <i>Drosophila</i>	8
1.7. O elemento <i>412</i> em <i>Drosophila</i>	9
2. OBJETIVO	10
3. METODOLOGIA	12
3.1. Manutenção dos estoques de moscas	12
3.2. Obtenção do DNA	12
3.3. Amplificação por PCR	12
3.4. Hibridização por <i>Southern blot</i>	13
3.5. Sequenciamento de DNA	13
3.6. Análise <i>in silico</i>	14
4. RESULTADOS	16
4.1. Amplificação por PCR	16
4.2. Hibridização por <i>Southern blot</i>	17
4.3. Sequenciamento e análise <i>in silico</i>	17
5. DISCUSSÃO	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
8. ANEXOS	27

Depois que cumprimos nossa função, somos
descartados.

Mas os genes são para sempre

Richard Dawkins

1. INTRODUÇÃO

1.1. Elementos transponíveis

Elementos Transponíveis (TEs) são sequências de DNA que possuem a habilidade de se mobilizar dentro de um genoma ou horizontalmente entre genomas distintos (CAPY, 1998; SILVA *et al.*, 2004). Estes elementos partilham entre si características que os distinguem de outras sequências de DNA repetitivo: I) são amplamente dispersos nos genomas, onde seu número de repetições pode variar de poucas a milhares de cópias de acordo com a família do elemento e do genoma hospedeiro; II) geram, como resultado da transposição, duplicação do sítio alvo de inserção; III) apresentam polimorfismos de sítios de inserção (CAPY, 1998).

A hipótese revolucionária de que os genomas pudessem possuir sequências móveis foi proposta inicialmente na década de 1940 por Bárbara McClintock que, estudando o fenótipo de milho (*Zea mays* L.), observou mudanças no padrão de coloração dos grãos e associou estas diferenças à presença de algum “elemento controlador” da expressão gênica, capaz de se mover enquanto as células se dividiam e provocando mutações isoladas em determinados genes e em apenas algumas células. Eventualmente este “elemento controlador” atuava sobre os genes que conferem pigmentação aos grãos, resultando na diversidade fenotípica que despertou seu interesse. Tais “elementos controladores” propostos por McClintock tratavam-se do hoje bem conhecido sistema *Ac-Ds* de elementos transponíveis (McCLINTOCK, 1956; JONES, 2005; BIÉMONT & VIEIRA, 2006).

Apesar de inovadora, a hipótese de McClintock não foi bem recebida pela comunidade científica contemporânea, que a tratou como bizarra e misteriosa (JONES, 2005), principalmente por não parecer aplicável a outros organismos (KASS & CHOMET, 2009), tendo sido ignorada por mais de duas décadas até a descoberta, na década de 1970, da existência de transposons em leveduras através de clonagem molecular (JONES, 2005).

A confirmação de que não apenas milho e leveduras, mas também moscas da fruta (*Drosophila*) e bactérias possuíam sequências de DNA dotadas de mobilidade levaram a inúmeros experimentos que revelaram a ubiquidade dos elementos transponíveis nos genomas (BIÉMONT & VIEIRA, 2006).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e do sequenciamento de larga escala, tornou-se possível revelar a presença destes elementos em virtualmente todos os organismos vivos, sobretudo em eucariotos (GALUN, 2003), constituindo a maior parte do DNA repetitivo nestes genomas (CAPY, 1998).

Atualmente a influência dos TEs na dinâmica e evolução dos genomas é inquestionável, uma vez que atuam, quando se mobilizam, como fontes de mutações espontâneas, promovendo importantes rearranjos cromossômicos, como deleções, inversões e translocações (CAPY, 1998). Porém, esta importância não foi reconhecida desde o início, tendo sido os TEs considerados como parasitas e chamados de “DNA lixo” ou de “genes egoístas”, sobretudo pela observação dos efeitos aparentemente deletérios da mobilização dos elementos *P* e *I* em linhagens específicas de *Drosophila melanogaster*, que causa, entre outros efeitos, esterilidade, em um fenômeno chamado “disgenesia do híbrido” (DOOLITTLE & SAPINZA, 1980; CAPY, 1998; BIÉMONT, 2010). Atualmente esta denominação vem sendo substituída por outras hipóteses, como a de que os elementos transponíveis seriam importantes endosimbiontes genômicos (ALMEIDA & CARARETO, 2005).

1.2. Estrutura e Classificação dos Elementos Transponíveis

Dois tipos de elementos podem coexistir em um mesmo genoma: a) as cópias completas ou autônomas, que codificam todas as enzimas necessárias para sua transposição; e b) as cópias não completas ou não autônomas, que não codificam as enzimas necessárias para a transposição e dependem das enzimas produzidas por outros elementos para se mobilizarem (KIDWELL & LISCH, 2001).

O primeiro sistema de classificação de elementos transponíveis foi proposto por Finnegan (1989), e discriminava duas classes de elementos levando em consideração, além da organização estrutural, seus intermediários de transposição.

Os elementos de Classe I (retrotransposons) se mobilizam através de um intermediário de mRNA (do elemento) produzido pela maquinaria da célula hospedeira. O elemento codifica as enzimas Transcriptase Reversa (TR) e Integrase (IN) que, sucessivamente, converte o mRNA em DNA e reinsere esta nova cópia do elemento em outra região do genoma. Assim, cada ciclo de replicação resulta em um aumento no número de cópias do elemento, num sistema também chamado “copia e cola”.

Já os elementos de Classe II (transposons) se mobilizam tanto por um sistema de “copia e cola” quanto pelo sistema “corta e cola”, através de um intermediário de DNA, empregando uma única enzima chamada Transposase, que, ou remove o elemento do seu sítio de inserção e o reinsere em outra região do genoma, ou o replica em uma cópia de DNA e a insere em outra região (ALMEIDA & CARARETO, 2005; CAPY, 1998).

Além das classes, os TEs são organizados em níveis hierárquicos de acordo com sua estrutura, a saber: Subclasse, Superfamília, Família e Subfamília (FINNEGAN, 1989; CAPY, 1998). Desta forma, os TEs de classe I são divididos entre Subclasse I por apresentarem a assinatura DDE (D – ácido aspártico; E = ácido glutâmico) no sítio da integrase e Longas Repetições Terminais (LTR) e Subclasse II – retroposons – por não possuírem a assinatura DDE nem LTR. Já os elementos de Classe II (transposons) subdividem-se em Subclasse I e Subclasse II, respectivamente, pela presença ou ausência da assinatura DDE no sítio da transposase.

As superfamílias se caracterizam pela existência de domínios e assinaturas similares ou pela organização de suas ORFs (Open Reading Frames), enquanto famílias são definidas quando os elementos se apresentam similares em, no mínimo, 30% a 50% de seus motivos e sequências de aminoácidos. As superfamílias de elementos de Classe II são *mariner-Tc1*, *ISa*, *ISb*, *hAT*, *P*, *MuDR*, *CACTA* e *Tx*, que agregam famílias como *hobo*, *Ac*, *Tam3*, *mariner* e *P*.

Os retrotransposons sem LTR podem ser divididos nas superfamílias *LINE* (Long Interspersed Nucleotide Elements) e *SINE* (Short Interspersed Nucleotide Elements), enquanto os retrotransposons com LTR se dividem nas superfamílias *gypsy-like*, *Ty3*, *Tf1* e *Ty1-copia*, que agregam famílias de elementos como *gypsy*, *Ty3*, *Ty1*, *Copia*, *412*, *Jockey* e *Alu*.

A classificação em subfamília requer a existência de similaridade em sequências de aminoácidos entre, no mínimo, 50% e 70%.

Existe ainda uma terceira classe que agrega elementos cujos mecanismos de transposição permanecem desconhecidos e que possuem características intermediárias a ambas as outras classes, como os *MITE* (Miniature Inverted Transposable Elements) e *Foldback* (FINNEGAN, 1989; CAPY, 1998).

Como consequência do sequenciamento de genomas, novos elementos com novas características têm sido frequentemente encontrados, tornando necessária uma revisão e padronização de um sistema de classificação e nomenclatura de TEs. Para suprir tal necessidade e, na tentativa de facilitar a anotação de novos elementos e a comparação destes em táxons distintos, Wicker *et al.* (2007) propuseram um novo sistema que, mantendo as duas classes propostas por Finnegan (1989), e levando em consideração critérios como similaridade de sequências e relações estruturais enzimáticas, reorganiza hierarquicamente os elementos em níveis taxonômicos de: Subclasse, Ordem, Superfamília, Família e Subfamília.

a) Subclasse: distingue os elementos de Classe II que fazem cópias de si mesmos para uma nova inserção, cortando uma única fita de DNA, daqueles que são totalmente removidos

do sítio onde estavam inseridos, para se inserirem em outro local do genoma, cortando as duas fitas do DNA.

b) Ordem: baseia-se nas diferenças do mecanismo de inserção e organização geral e enzimologia dos TEs para distinguir seus grupos.

c) Superfamília: distinguem-se umas das outras por características generalizadas como estrutura das proteínas, domínios não codificantes, presença e tamanho dos sítios de duplicação (TSD) no local de inserção do elemento.

d) Família: é definida pela conservação da sequência de DNA, uma vez que similaridades em nível de proteínas são maiores entre famílias de uma mesma superfamília, enquanto a conservação de sequências de DNA é muito pequena e restrita a partes da região codificante.

e) Subfamília: distinguem-se com base em análises filogenéticas, podendo até distinguir populações homogêneas de elementos autônomos e não autônomos.

1.3. Ciclo de vida e Transferência Horizontal de TEs

Dois mecanismos são apontados como formas de entrada de um TE em um genoma: a) o elemento estava presente no genoma de um ancestral e foi herdado verticalmente; ou b) o elemento pode ser herdado de uma espécie não aparentada através de transferência horizontal (CAPY, 1998). É relatada também a possibilidade de um elemento surgir *de novo* em um genoma através de mutações e recombinações de resquícios de sequências já presentes no genoma (FINNEGAN, 1985; CAPY, 1998; ALMEIDA & CARARETO, 2005).

Após invasão de um novo genoma, o TE tende a aumentar a sua replicação, o que leva a uma diversificação de sítios de inserção. A relação de interação que se estabelece em seguida entre o TE invasor e o genoma invadido determinará a sobrevivência de ambos. A mobilização de muitos TEs pode produzir muitos efeitos deletérios para o genoma, entretanto, a própria sobrevivência do TE depende de um ambiente genômico estável. Desta forma, a tendência é que se estabeleça uma relação de vantagens mútuas, em um complexo regulatório exercido pelo próprio TE, pelo genoma hospedeiro e por fatores ambientais. (CAPY, 1998; ALMEIDA & CARARETO, 2005).

O passo seguinte na história de vida do elemento é caracterizado pelo acúmulo de cópias defectivas e o desenvolvimento, pelo hospedeiro, de mecanismos epigenéticos de silenciamento, que provocam uma grande redução em sua mobilidade. Por fim, o TE entra em

um período de senescência, que leva à perda estocástica do elemento por inativação das sequências autônomas e acúmulo de mutações e divergências nas sequências não autônomas.

Este período pode durar milhões de anos e diferentes estratégias são elencadas como alternativa para que o elemento escape da extinção. Dentre eles, destacam-se a domesticação do elemento pelo genoma hospedeiro, como no caso bem documentado dos genes *rag1* e *rag2*, envolvidos na recombinação V(D)J em células imunológicas de mamíferos, originados da transposase do elemento *Transib* ou dos elementos *TART*, *TAHRE* e *Het-A*, que atuam na manutenção de telômeros em *Drosophila* (Revisão em ALZOHAIKY *et al.*, 2013) e a invasão de novos genomas através de transferência horizontal (PINSKER *et al.*, 2001; BROOKFIELD, 2005).

De acordo com a revisão de Silva *et al.* (2004), quando um TE é transmitido verticalmente, sua filogenia deve acompanhar a filogenia do hospedeiro, e quando isso não ocorre, é possível que o elemento tenha sido adquirido de forma horizontal. Três tipos de distorções filogenéticas são apontadas por estes autores para evidenciar casos de transferência horizontal. A mais clara delas está ligada à detecção de elementos com elevado grau de similaridade em táxons divergentes, sendo o ramo filogenético do TE muito mais curto que o esperado, já que as divergências entre as sequências do TE sejam muito menores que as divergências entre os genes nucleares (não móveis) dos hospedeiros.

A segunda distorção apontada está relacionada às diferenças topológicas entre a árvore filogenética do TE e seu hospedeiro. A terceira refere-se à distribuição descontínua de TEs entre espécies proximamente aparentadas, ou seja, o TE está presente em determinada linhagem e ausente em uma linhagem irmã, sugerindo que a aquisição do elemento se deu de maneira independente apenas em sua linhagem. Esta evidência pode não ser muito confiável por haver a possibilidade de o TE ter sido perdido pela linhagem irmã (SILVA *et al.*, 2004).

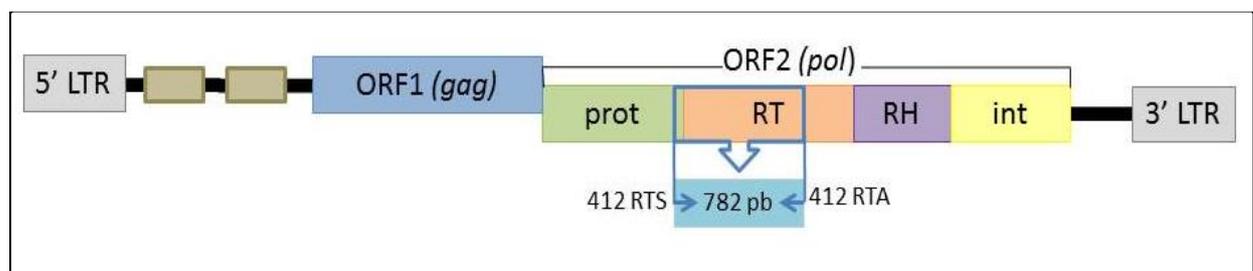
1.4. O elemento 412

A Classe I de elementos transponíveis se divide em duas subclasses pela presença ou ausência da assinatura DDE no sítio da integrase. A subclasse I (com assinatura DDE e LTR) é composta pelos grupos *Ty1-copia* e *Ty3-Gypsy* (CAPY *et al.*, 1996), que se diferenciam pela posição do sítio da integrase no domínio da polimerase. No primeiro grupo, a integrase está inserida *a montante* do sítio da transcriptase reversa, enquanto em *Ty3*, localiza-se *a jusante* do sítio da RNase. Desta forma, a organização do gene da polimerase em *Ty1-copia* é 5'-PR-

IN-RT-RH-3' enquanto em *Ty3-Gypsy* o gene se organiza em 5'-PR-RT-RH-IN-3'. A presença do gene *env* (semelhante a retrovírus) diferencia *Gypsy* de *Ty3* (CAPY, 1998).

O TE *412*, originalmente identificado como um gene repetitivo em células de *D. melanogaster* (RUBIN *et al.*, 1977; FINNEGAN *et al.*, 1978), é um retrotransposon da família *Ty3* e composto por uma região central de DNA com cerca de 6.477 pares de bases (pb), organizadas em duas longas ORFs (ORF1 e ORF2) que correspondem respectivamente aos genes *gag* e *pol* e duas ORFs pequenas (YUKI *et al.*, 1986b), flanqueadas por longas repetições terminais (LTRs) que variam entre 481 a 571 pares de bases (WILL *et al.*, 1981) (Fig. 1).

Figura 1. Esquema gráfico do retroelemento *412* de *Drosophila melanogaster*, com indicação da região amplificada e dos locais de anelamento dos primers *412RTS* e *412RTA* utilizados neste trabalho.



FONTE: Adaptado de BORIE *et al.*, 2002 e BLAUTH, 2005.

1.5. O gênero *Drosophila*

A ordem Diptera é composta por mais de 150 famílias, sendo Drosophilidae uma das mais diversas e amplamente distribuídas (YEATES & WIEGMANN, 2005), divididas entre as subfamílias Steganinae e Drosophilinae, que abrigam 76 gêneros formados por mais de 3.900 espécies (TODA, 2007; BÄCHLI, 2008). Dados fósseis e biogeográficos sugerem que a família tenha se originado há cerca de 50 milhões de anos atrás (Eoceno) nas regiões tropicais do Velho Mundo (THROCKMORTON, 1975).

De maneira geral, os drosofilídeos são moscas especializadas em se reproduzirem em plantas e materiais em decomposição por fungos. A maior parte da sua nutrição deriva de leveduras e bactérias que decompõem este material. Sua distribuição é quase cosmopolita, com representantes nas regiões tropicais, temperadas e desérticas, sendo desconhecida a presença de espécies nas regiões polares. Devido a sua grande diversidade e quantidade de

representantes, os drosofilistas tradicionalmente agregam à taxonomia tradicional zoológica (que inclui família, gênero e espécie) as categorias não oficiais de “grupo”, “subgrupo” e complexo de espécies (POWELL, 1997).

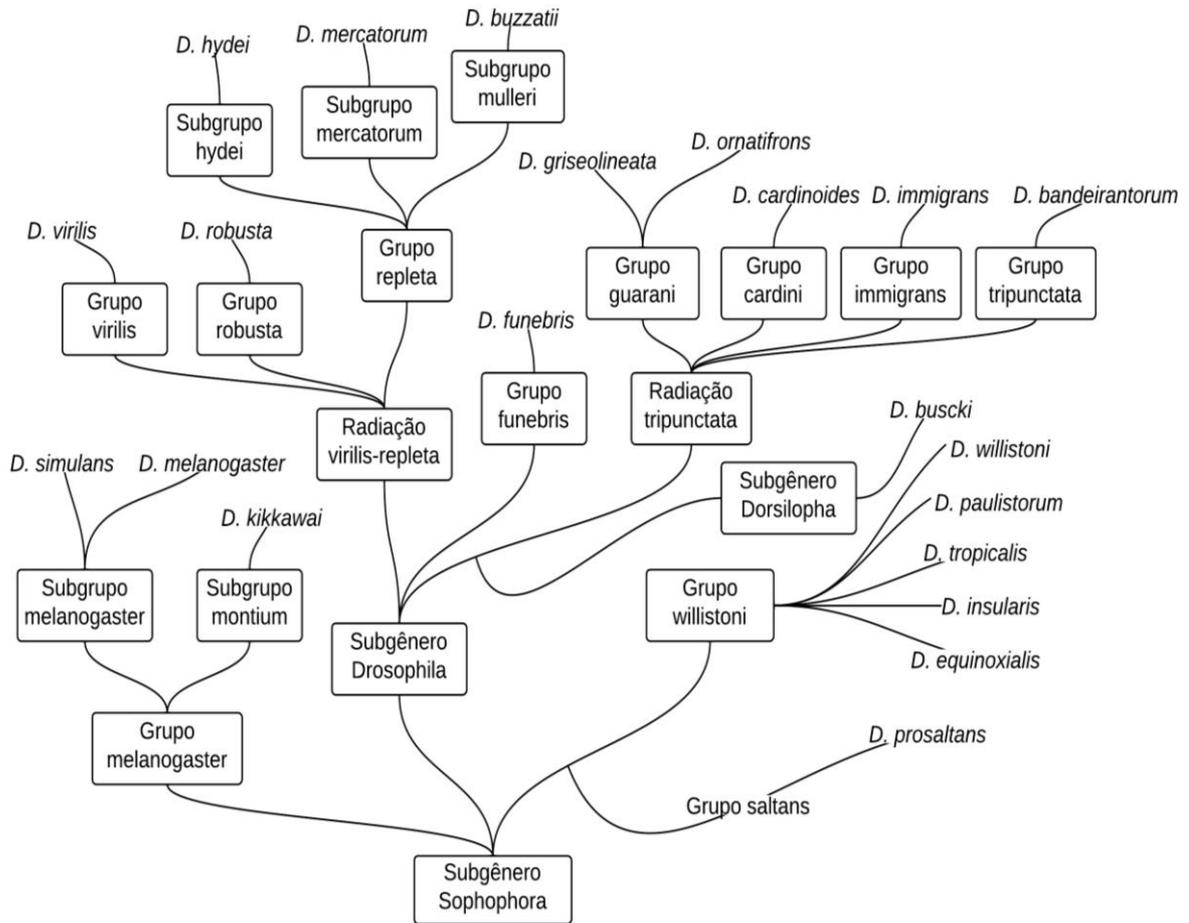
Dentre os integrantes da família Drosophilidae, o gênero *Drosophila* se destaca por sua grande diversidade de espécies. De acordo com Bächli (2008), o gênero é composto por 1.149 espécies divididas entre oito subgêneros, sendo os mais representativos os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora*.

O Subgênero *Sophophora* subdivide-se em oito grupos (*dentissima*, *dispar*, *fima*, *melanogaster*, *obscura*, *populi*, *saltans* e *willistoni*) que abrigam 332 espécies, enquanto o subgênero *Drosophila* divide-se em 43 grupos, compostos por 721 espécies (BÄCHLI, 2008).

Apesar de extensamente estudadas, algumas questões a respeito da filogenia do gênero permanecem em aberto. Entretanto, os dados mais relevantes sugerem uma provável posição basal de *Sophophora*, a partir do qual se derivam, entre outras, as linhagens que dão origem aos grupos *melanogaster* e *willistoni*, e ao subgênero *Drosophila* (revisão em ROBE, 2008).

Uma ilustração das relações de parentesco entre as espécies investigadas no presente trabalho é apresentada na Figura 2.

Figura 2. Esquema das relações de parentesco entre as espécies investigadas no presente trabalho.



FONTE: Baseado na filogenia de THROCKMOORTON, 1975.

1.6. TEs em *Drosophila*

A maior parte do conhecimento acumulado sobre elementos transponíveis em drosofilídeos se refere a estudos em *D. melanogaster* e fornecem informações sobre a dinâmica dos TEs e as forças que os mantêm nos genomas e nas populações (POWELL, 1997).

Em seu trabalho, Bergman *et al.* (2006) observaram que o genoma de *D. melanogaster* é constituído por 6,51 Mb (5,5%) de sequências derivadas de elementos de transposição, sendo a maior parte (3,29%) das sequências de TEs classificadas como retrotransposons com LTRs, seguidos pelos retrotransposons sem LTR (1,27%) e pelos transposons de DNA (0,47%). A estimativa de Kaminker *et al.* (2002) é de que 96 famílias de elementos transponíveis estejam presentes na região eucromática do genoma de *D. melanogaster*, com destaque para *roo* (146 cópias), *1360* (105 cópias) e *jockey* (69 cópias).

1.7. O elemento 412 em *Drosophila*

Desde a identificação da família de elementos 412 no genoma de *D. melanogaster*, muito se tem trabalhado para buscar caracterizar este elemento, seja buscando compreender melhor sua estrutura (RUBIN *et al.*, 1977; FINNEGAN *et al.*, 1978; WILL *et al.*, 1981; YUKI *et al.*, 1986a; YUKI *et al.*, 1986b), como sua dinâmica e padrão de expressão (POTTER *et al.*, 1979; BROOKMAN *et al.*, 1992; AULARD *et al.*, 1995; HOOGLAND *et al.*, 1997; VIEIRA & BIÉMONT, 1997; VIEIRA *et al.*, 1998; CIZERON & BIÉMONT, 1999; BORIE *et al.*, 2000; BORIE *et al.*, 2002; MUGNIER *et al.*, 2005; BLAUTH *et al.*, 2011). As análises (comentadas a seguir) realizadas na tentativa de detectar a presença deste elemento em espécies de *Drosophila* têm se baseado em uma única técnica (hibridização) e evidenciado diferenças no padrão de cópias amplamente distribuídas entre os genomas, mas nada feito para mostrar que diferenças são essas de fato e como elas se relacionam.

Em 1983, Martin *et al.*, realizaram o primeiro *screening* por *Southern blot* em diferentes espécies de *Drosophila* buscando sequências homólogas ao elemento 412 de *D. melanogaster*. Seus resultados mostraram o elemento 412 amplamente distribuído na família Drosophilidae, estando presente em representantes de todas as grandes radiações de *Drosophila*, inclusive em espécies muito distantemente relacionadas à *D. melanogaster*, o que sugere que este elemento possa ter surgido no início da história evolutiva de Drosophilidae. Além disso, sinais de hibridização com a sonda de 412 puderam ser detectados em *Sarcophaga sp.* (Sarcophagidae – distantemente relacionada à Drosophilidae), mas não em *Ephydra cineria* (Ephyddidae) e *Musca domestica* (Muscidae), proximamente aparentadas a Drosophilidae sob condições de baixa estrigência, permitindo inferir que sequências relacionadas a 412 possam ter surgido ainda antes do surgimento de um drosofilídeo ancestral.

De Frutos *et al.* (1992) realizaram um *screening* por *Southern blot* utilizando sondas de diferentes elementos de *D. melanogaster*, dentre eles 412, em 15 espécies do grupo *obscura*. Seus resultados mostraram a ampla dispersão do elemento entre as espécies do grupo, com sinal de hibridização mais intenso entre as espécies do subgrupo *pseudoobscura*. Seus dados concordam com a hipótese de Martin *et al.* (1983), que sugerem que sequências homólogas a 412 são amplamente distribuídas em espécies dos subgêneros *Sophophora* e *Drosophila* e suportam a hipótese de que sequências ancestrais destes elementos podem ter estado presentes nos ancestrais de *Drosophila*, antes da primeira radiação do grupo.

Cizeron *et al.* (1998), através de técnicas de hibridização *in situ* e *Southern blot*, realizaram a mais extensa busca por evidências do TE 412 em diferentes espécies do gênero *Drosophila*, distribuídas entre os grupos *melanogaster* (33 espécies), *obscura* (nove espécies), *repleta* (quatro espécies), *willistoni*, *saltans* e *virilis* (três espécies cada), *immigrans* (duas espécies), *fima* e *funebri* (uma espécie cada), além de uma espécie do subgênero *Scaptodrosophila* e duas espécies do gênero *Zaprionus*. Quase todas as espécies estudadas apresentaram sequências similares ao elemento 412, porém com grande diversidade de tamanhos de fragmentos e intensidades de sinal, sugerindo haver divergência na sequência do elemento em diferentes espécies. Sua hipótese mais provável é de que o elemento tenha estado presente em um ancestral Drosophilidae, tendo divergido em algumas espécies e eliminado em outras, mas também não descarta a possibilidade de algumas espécies terem sido recentemente invadidas pelo elemento.

Dados mais completos sobre a ocorrência e características moleculares deste elemento são necessários para compreender sua história evolutiva (DE FRUTOS *et al.*, 1992).

Apesar da bem documentada e ampla distribuição do elemento 412 em diferentes espécies do gênero *Drosophila* e da evidenciada ocorrência de sequências polimórficas relacionadas a este elemento nestes genomas, não existem estudos mais precisos que visem identificar estas divergências em nível de sequência de DNA. Desta forma, torna-se necessário investigar a composição molecular destas sequências divergentes na tentativa de compará-las e entender como esse elemento tem se comportado ao longo da história evolutiva do gênero *Drosophila*, que tem sido uma grande fonte de hospedeiros.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos:

- 1- Investigar a presença do elemento retrotransponível *412* em diferentes linhagens de espécies do gênero *Drosophila*;
- 2- Caracterizar molecularmente as possíveis cópias encontradas nestas linhagens;
- 3- Avaliar o grau de similaridade entre as possíveis cópias encontradas.

3. METODOLOGIA

3.1. Manutenção dos estoques de moscas

Os estoques de moscas utilizados neste trabalho foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de *Drosophila* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos em câmaras de temperatura constante (17°C ou 25°C) em vidros com meio de cultura a base de farinha de milho acrescido de antifúngico Nipagin. Foram estudadas ao todo 33 linhagens de 21 espécies do gênero *Drosophila* (Tab. 1).

3.2. Obtenção do DNA

A extração do DNA genômico de moscas adultas foi realizada utilizando protocolo padrão fenol-clorofórmio. As moscas foram mantidas durante uma hora em tubo de vidro forrado com papel umedecido em água para eliminação do excesso de ácaros, adormecidas em seguida com éter etílico, transferidas para um microtubo de 1,5 ml, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas. Este protocolo emprega um tampão de lise composto de SDS 1%, EDTA 0,1M, TRIS-HCl 0,1M e NaCl 1M para rompimento das membranas. As etapas de purificação e precipitação do DNA são realizadas utilizando fenol equilibrado (pH 8,0), clorofórmio e etanol absoluto adicionados ao macerado (SASSI *et al.*, 2005).

3.3. Amplificação por PCR

Para amplificação de sequências relacionadas ao retroelemento *412* foi realizada a técnica de PCR (Reações em Cadeia da Polimerase) utilizando os iniciadores *412RTS* (5'GCGATTGCCATTTGGCTT3') e *412RTA* (5'TGGGGTTCACCATCGAGAA3') desenhados por Blauth (2005). Estes iniciadores amplificam um fragmento de aproximadamente 782pb dentro da ORF2 do TE *412* de *D. melanogaster* (GenBank X04132) (Fig. 1).

Foram utilizadas aproximadamente 25ng de DNA para uma reação de 25µl contendo 1U de Taq Polimerase (Neotaq), 2,5µl de tampão 10X fornecido pelo fabricante, 10mM de cada nucleotídeo, 10pmol de cada primer e 2,0mM de MgCl₂.

As condições de amplificação foram: 97°C por 10 minutos (desnaturação inicial), seguida de 40 ciclos de 97°C por 30 segundos (desnaturação), 48°C por 40 segundos (anelamento) e 72°C por 40 segundos e uma extensão final de dez minutos a 72°C.

Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com GelREd™ (Biotium), visualizados e fotografados em Fotodocumentador L-Pix Ex (Loccus Biotecnologia), sob luz UV.

3.4. Hibridização por *Southern Blot*

Produtos de amplificação obtidos pela PCR foram submetidos à técnica de hibridização por *Southern blot* para confirmação da especificidade dos fragmentos.

Como sonda para hibridização foi utilizado o fragmento de 782pb amplificado a partir dos iniciadores *412RTS* e *412RTA* no genoma de *D. melanogaster*.

Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1%, transferidos para uma membrana de nitrocelulose Hybond N+ (GE Healthcare Life Sciences) e hibridizados de acordo com o protocolo do kit de marcação e hibridização AlkPhos Direct Labeling and Detection System with CDP-Star (GE Healthcare Life Sciences). As lavagens de estringência da membrana foram realizadas a 60°C, primeiro 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 da hibridização, foi utilizado o kit de detecção acima referido com exposições de 10 a 20 minutos e captura de quimioluminescência em fotodocumentador MF-ChemiBIS 1.6 (DNR Bio-Imaging Systems). O tamanho molecular (em kb) dos fragmentos detectados foi determinado usando os fragmentos do marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen) como controle.

3.5. Sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento, os produtos das reações de PCR foram separados em gel de agarose 1% e purificados seguindo as recomendações do kit de purificação de DNA de banda de gel (Ludwig Biotec). O sequenciamento das amostras foi realizado em sequenciador automático MEGA BACE 500 no Laboratório de *Drosophila* da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.6. Análise *in silico*

A sequência do fragmento esperado dentro do elemento completo disponível no GenBank (código de acesso X04132) foi identificada a partir dos iniciadores utilizados neste trabalho. Este fragmento, bem como aquele obtido no presente trabalho, foi investigado nos genomas de *Drosophila* disponíveis no banco de dados FlyBase (www.flybase.org) através da ferramenta BLAST.

Tabela 1. Espécies e linhagens de *Drosophila* utilizadas no estudo

subgênero	grupo	subgrupo	espécie - linhagem	
<i>Drosophila</i>	<i>cardini</i>	<i>cardini</i>	<i>D. cardinoides</i>	
	<i>funnebris</i>	<i>funnebris</i>	<i>D. funnebris</i>	
	<i>guarani</i>	<i>guarani</i>	<i>D. ornatifrons</i>	
	<i>immigrans</i>	<i>guaramuru</i>	<i>D. griseolineata</i>	
		<i>immigrans</i>	<i>D. immigrans</i>	
		<i>hydei</i>	<i>D. hydei</i>	
	<i>repleta</i>	<i>mercatorum</i>	<i>D. mercatorum</i>	
		<i>mulleri</i>	<i>D. buzzatii</i>	
	<i>robusta</i>	<i>robusta</i>	<i>D. robusta</i>	
	<i>tripunctata</i>		<i>D. bandeirantorum</i>	
	<i>Sophophora</i>	<i>virilis</i>	<i>virilis</i>	<i>D. virilis</i>
				<i>D. equinoxialis México</i>
				<i>D. insularis</i>
				<i>D. paulistorum - CA</i>
			<i>D. paulistorum - KID</i>	
			<i>D. paulistorum - RIBS</i>	
			<i>D. paulistorum - SC</i>	
			<i>D. tropicalis</i>	
<i>willistoni</i>			<i>D. willistoni - GdH4</i>	
			<i>D. willistoni - México</i>	
			<i>D. Willistoni - Serra do Cipó</i>	
			<i>D. willistoni - wip-4</i>	
			<i>D. willistoni - CIP</i>	
			<i>D. willistoni - Osório</i>	
	<i>D. willistoni - Cerrado</i>			
	<i>D. willistoni - 17A2</i>			
	<i>D. melanogaster</i>			
	<i>D. simulans - Chile</i>			
<i>melanogaster</i>	<i>melanogaster</i>	<i>D. simulans - DPP</i>		
		<i>D. simulans - white</i>		
	<i>montium</i>	<i>D. kikkawai</i>		
<i>saltans</i>	<i>saltans</i>	<i>D. prosaltans</i>		
<i>Dorsilopa</i>		<i>D. busckii</i>		

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação por PCR

Um total de 21 espécies de drosofilídeos foi investigado quanto à presença do TE 412, sendo nove pertencentes ao subgênero *Sophophora*, 11 do subgênero *Drosophila* e uma do subgênero *Dorsilopha*. Entre as espécies estudadas, 14 amplificaram fragmentos a partir dos iniciadores utilizados.

No subgênero *Sophophora*, dentre as espécies do grupo *melanogaster*, *D. melanogaster* apresentou o fragmento amplificado correspondente ao tamanho esperado de 782pb. Nas linhagens de *D. simulans* (DPP, Chile e White), assim como em *D. kikkawai*, o fragmento amplificado supera o tamanho esperado, aproximando-se dos 900pb (Fig.3A), enquanto *D. prosaltans*, do grupo *saltans* apresenta amplificação de fragmentos de ambos os tamanhos (Fig. 3B).

Dentre as espécies do grupo *willistoni*, nove amplificaram fragmentos a partir dos iniciadores utilizados, mas apenas as linhagens Cerrado, 17A2, Osório e Cip de *D. willistoni* amplificaram fragmentos do tamanho esperado. *D. tropicalis*, *D. insularis* e as linhagens RIB e SC de *D. paulistorum* amplificaram apenas fragmentos diferentes do tamanho esperado. As linhagens KID e CA de *D. paulistorum* e GdH4, Wip, México e S. Cipó de *D. willistoni* não amplificaram nenhum fragmento (Fig. 3C).

No subgênero *Drosophila*, fragmentos de tamanhos próximos a 782 pares de bases foram amplificados em *D. virilis*, *D. robusta*, *D. buzzatii*, *D. griseolineata* e *D. bandeirantorum*, enquanto *D. funebris* amplificou apenas fragmentos diferentes do esperado e *D. cardinoides*, *D. hydei*, *D. immigrans*, *D. mercatorum* e *D. ornatifrons* não amplificaram fragmento de nenhum tamanho (Fig. 3D).

A única espécie do subgênero *Dorsilopha* investigada, *D. buscki*, não apresentou amplificação de nenhum fragmento (Fig. 3B).

Cabe salientar que todas as reações foram acompanhadas por um controle negativo (sem amostra de DNA), não havendo problema de contaminação em nenhum dos experimentos (imagens não mostradas).

4.2. Hibridização por *Southern blot*

Para confirmar se os fragmentos amplificados realmente se relacionam com o elemento 412, os produtos da amplificação foram submetidos à hibridização por *Southern blot*, utilizando-se como sonda o fragmento interno de 412 de *D. melanogaster*. Apenas os fragmentos de *D. funebris*, *D. buzzatii* e *D. kikkawai*, além de *D. simulans* e *D. melanogaster*, exibiram sinal de hibridização detectável (Fig. 4).

4.3. Sequenciamento e Análise *in silico*

Dentre 17 fragmentos purificados do gel de agarose, foi possível obter apenas uma sequência com qualidade satisfatória para análise. Esse fragmento foi o isolado de *D. simulans* (White), que resultou em uma leitura de 202pb.

Na busca por similaridade com sequências 412 depositadas nos bancos de dados (GenBank), a sequência obtida neste trabalho apresentou 89% de similaridade com o elemento 412 canônico de *D. melanogaster*, confirmando, portanto ser do elemento 412 e apresentando elevado grau de similaridade.

Quando a sequência obtida neste trabalho foi analisada nos genomas de *Drosophila* disponíveis (Flybase), foram identificadas sequências similares apenas em *D. simulans* e *D. sechelia*, além de *D. melanogaster*, em várias cópias e em diferentes regiões genômicas (braços cromossômicos ou *scaffolds*), apresentando similaridades de até 93%. As mesmas espécies são as únicas a apresentarem sequências similares quando a busca foi realizada utilizando tanto a sequência do fragmento interno isolado a partir dos iniciadores utilizados (ver anexo).

Figura 3. Amplificação do retroelemento 412 por PCR em espécies do gênero *Drosophila*. A amplificação foi feita utilizando iniciadores para o elemento 412 de *D. melanogaster* e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%). **A** – Subgênero *Sophophora*, grupo *melanogaster*: *D. melano* - *D. melanogaster*; *D. sim* - *D. simulans* (DPP; Chile; white); *D. kikkawai*. **B** - Grupo *saltans*: *D. prosaltans*; Subgênero *Dorsilopa*: *D. busckii*. **C** - Subgênero *Sophophora*, grupo *willistoni*: *D. tropicalis*; *D. insularis*; *D. equi* - *D. equinoxialis* México; *D. paulis* - *D. paulistorum* (KID; RIBS; CA; SC); *D. willi* - *D. willistoni* (GdH4; Wip; México; Serra do Cipó; Cerrado; 17A2; Osório; CIP). **D** – Subgênero *Drosophila*: *D. cardinoides*; *D. hydei*; *D. funebris*; *D. immigrans*; *D. virilis*; *D. robusta*; *D. buzzatii*; *D. mercatorum*; *D. ornatifrons*; *D. griseolineata*; *D. bandeirantorum*.

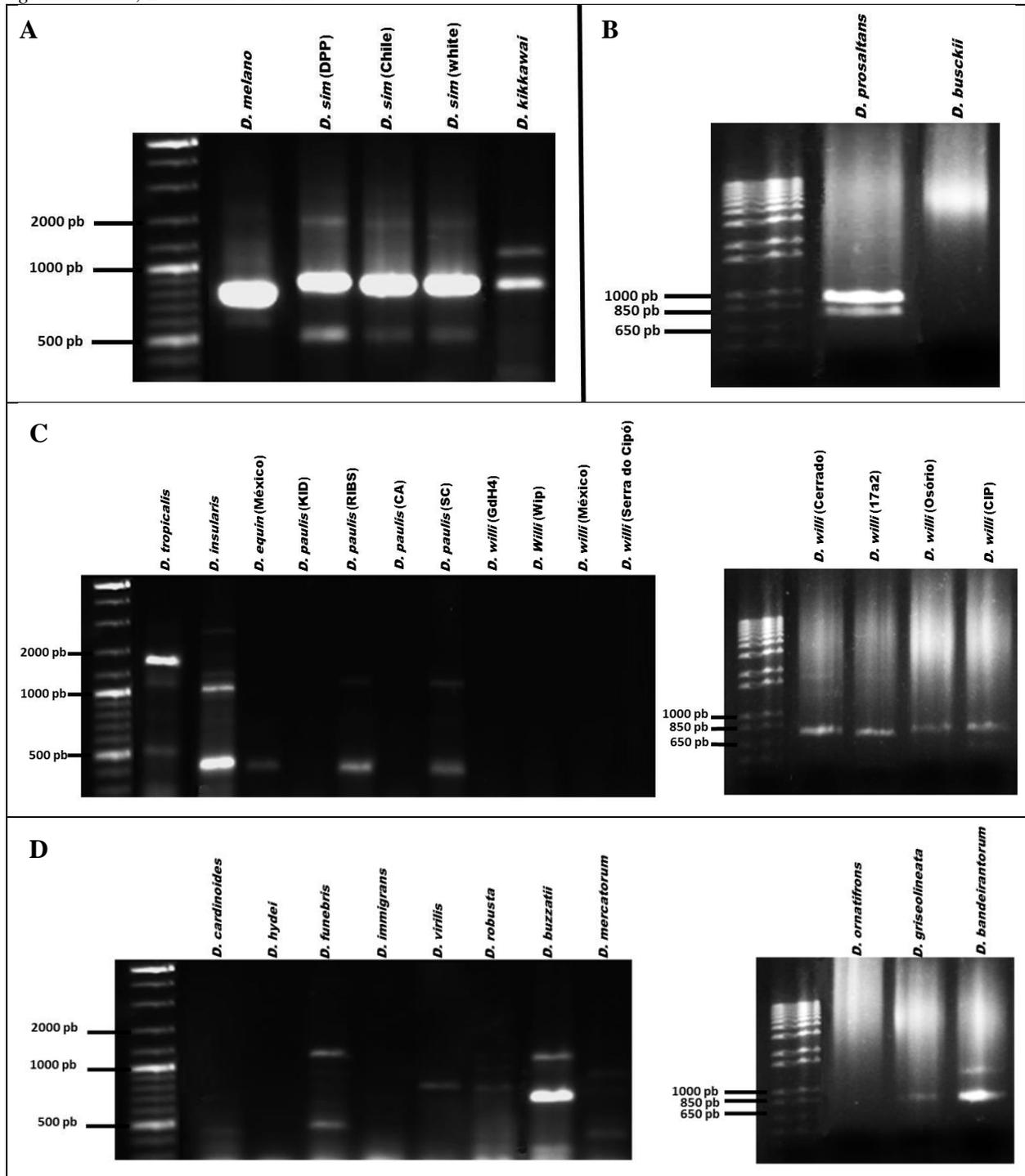
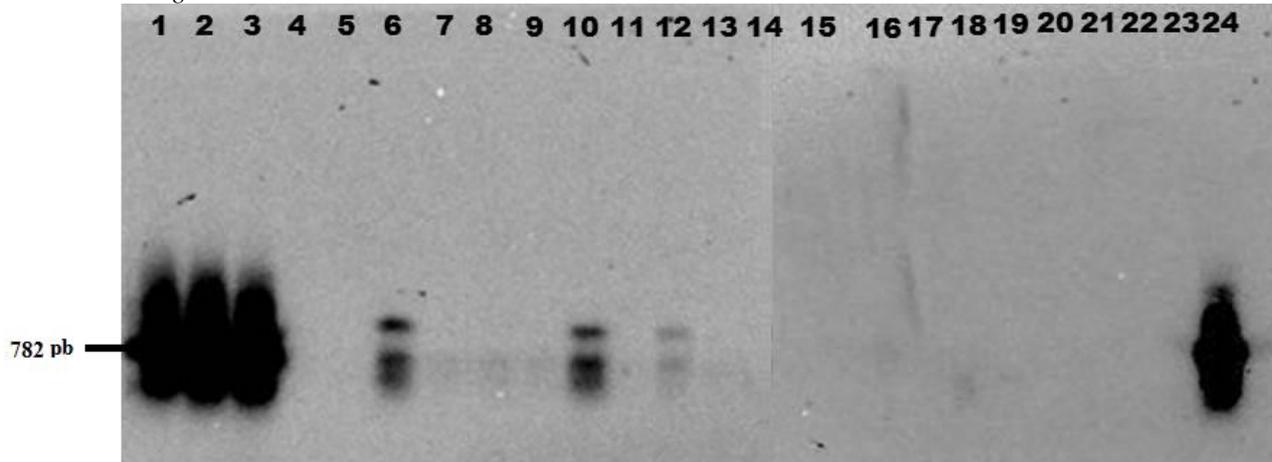


Figura 4. Southern blot da amplificação do retroelemento 412 por PCR em espécies do gênero *Drosophila*. A amplificação foi feita utilizando iniciadores para o elemento 412 de *D. melanogaster*, as bandas foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1% e transferidas para a membrana. Para hibridização na membrana foi utilizado como sonda o fragmento interno do elemento 412 amplificado em *D. melanogaster*. As espécies analisadas foram: 1 - *D. simulans* (DPP); 2 - *D. simulans* (Chile); 3 - *D. simulans* (White); 4 - *D. cardinoides*; 5 - *D. hydei*; 6 - *D. funebris*; 7 - *D. immigrans*; 8 - *D. virilis*; 9 - *D. robusta*; 10 - *D. buzzatii*; 11 - *D. mercatorum*; 12 - *D. kikkawai*; 13 - *D. tropicalis*; 14 - *D. insularis*; 15 - *D. equinoxialis* (México); 16 - *D. paulistorum* (KID); 17 - *D. paulistorum* (RIBS); 18 - *D. paulistorum* (CA); 19 - *D. paulistorum* (SC); 20 - *D. willistoni* (GdH4); 21 - *D. willistoni* (Wip); 22 - *D. willistoni* (México); 23 - *D. willistoni* (Serra do Cipó); 24 - *D. melanogaster*.



5. DISCUSSÃO

A amplificação do elemento 412 foi positiva para as três espécies do grupo *melanogaster* estudadas, incluindo *D. kikkawai*, do subgrupo *montium*. Entretanto, a amplificação mostrou a presença de um fragmento levemente maior em *D. simulans* e em *D. kikkawai* em comparação ao fragmento amplificado em *D. melanogaster*.

Este resultado concorda com estudos anteriores que demonstram (por hibridização) que estas espécies possuem cópias do elemento 412 (CIZERON & BIÉMONT, 1999; CIZERON *et al.*, 1998) e sugere que estas cópias podem ser diferentes mesmo entre espécies filogeneticamente muito próximas. A mesma reflexão pode ser elencada para explicar a detecção do elemento em apenas algumas linhagens de *D. willistoni*.

Cizeron & Biémont (1999) analisaram polimorfismos na estrutura do elemento 412 em diferentes populações de *D. simulans* e *D. melanogaster*. Seus resultados mostram que ambas as espécies, em todas as populações analisadas, possuem tanto cópias do elemento 412 canônico quanto cópias recombinadas. Entretanto, nas populações de *D. simulans* a taxa de recombinantes observada é sempre maior que em *D. melanogaster*.

Para estes autores, a hibridização em fragmentos de tamanhos diferentes aos esperados se dá devido à perda ou inserção de um sítio de restrição para a enzima utilizada, além da possibilidade de ter havido perda ou ganho de sequência dentro do fragmento observado.

A amplificação de fragmentos de tamanhos diferentes dos esperados para os iniciadores utilizados foi detectada no presente estudo em diferentes espécies de *Drosophila*, concordando com os dados anteriores que demonstram por hibridização a presença de cópias de tamanhos diferentes em diferentes espécies do gênero. A amplificação destes fragmentos maiores ou menores que o esperado em nosso trabalho pode ser explicada tanto pela perda de sequências no sítio de anelamento dos iniciadores utilizados, como pela inserção de novas sequências dentro da região amplificada.

A hibridização demonstrou haver grande similaridade entre as cópias do elemento presentes nas espécies do grupo *melanogaster*, com menor intensidade de sinal detectada em *D. kikkawai* (do subgrupo *montium*). A hibridização demonstrada em *D. funebris* (grupo *funebris*) e *D. buzzatii* (grupo *repleta*) demonstra haver similaridade entre as cópias presentes nestas espécies e as cópias presentes no grupo *melanogaster*. A não detecção do elemento pela hibridização em outras espécies se deve, provavelmente, ao fato de a sonda utilizada ser específica para o fragmento interno do elemento 412 de *D. melanogaster*, podendo não haver similaridade com possíveis cópias presentes nestas outras espécies investigadas.

A não amplificação de fragmentos em algumas espécies investigadas, nas quais a presença do elemento já tenha sido demonstrada anteriormente, como *D. buscki* (MARTIN *et al.*, 1983) e *D. immigrans* (CIZERON *et al.*, 1998), assim como naquelas que não tenham sido estudadas por outros autores, como *D. cardinoides*, *D. equinoxialis*, *D. insularis* e *D. ornatifrons* pode não estar relacionada necessariamente à ausência do elemento nestas espécies, mas à ausência de cópias completas capazes de amplificar fragmentos a partir dos iniciadores utilizados. Tal argumento pode ser suportado pelo relato de Cizeron & Biémont (1999) que observaram, nas populações que estudaram, a ocorrência de cópias com a ORF2 deletadas. É necessário ressaltar que se encontram justamente nesta região os sítios de inserção dos iniciadores utilizados neste trabalho (Fig. 1).

Ainda, existe a possibilidade de que as cópias presentes nestas espécies sejam diferentes o suficiente do elemento 412 de *D. melanogaster*, a ponto de não poder ser amplificado a partir dos iniciadores utilizados neste trabalho.

A sequência obtida a partir de *D. simulans* demonstrou por análise *in silico* grande similaridade (89%) com o elemento 412 de *D. melanogaster*. A mesma sequência demonstra similaridade ainda maior, de até 93%, com outras regiões do genoma de *D. simulans* e *D. sechelia*, podendo estas regiões ter sua origem relacionada à inserção e atividade do elemento 412.

A dificuldade encontrada na etapa de sequenciamento dos fragmentos obtidos e purificados do gel de agarose pode estar ligada tanto à baixa temperatura de anelamento dos iniciadores utilizados nas reações de PCR (diferente da utilizada na reação de sequenciamento), quanto ao método utilizado para isolamento dos fragmentos obtidos.

Mesmo após separarmos por eletroforese os fragmentos amplificados e purificá-los do gel para prosseguir à etapa de sequenciamento, não podemos garantir que uma única cópia do fragmento de nosso interesse tenha sido recuperada como produto final e o possível acúmulo de cópias na reação de sequenciamento pode causar ruídos de leitura, que impedem o sequenciador de determinar com alguma certeza a sequência de bases presentes naquela reação.

Apesar da afirmação de Bevan *et al.* (1992) de que o sequenciamento direto de produtos de PCR seja essencial para confirmar a especificidade da amplificação, identificar variações genéticas como polimorfismos, rearranjos, translocações, entre outras, identificar genes desconhecidos e mapeá-los no genoma de organismos, é fortemente recomendável a clonagem dos fragmentos obtidos, em se tratando de elementos transponíveis. Cabe salientar que esta abordagem foi tentada, porém não obteve-se sucesso nessa tentativa.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença do elemento *412* em espécies de drosofilídeos pode ser investigada por meio de amplificação por PCR utilizando-se iniciadores específicos, além dos estudos por hibridização descritos na literatura.

Embora amplificado em diferentes espécies, os fragmentos observados apresentaram polimorfismos de tamanho e similaridades distintas nas espécies estudadas.

O desenho de novos iniciadores, com temperatura de anelamento maior, e específicos para outras regiões do elemento, pode ser uma alternativa para possibilitar a amplificação do elemento em determinadas espécies, permitindo a detecção de cópias distintas, além de possibilitar melhores resultados na etapa de sequenciamento.

Para melhores resultados na obtenção e análise das possíveis diferentes cópias amplificadas nas linhagens, é recomendável uma etapa de clonagem dos fragmentos amplificados, seleção de clones e purificação para posterior sequenciamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, L. M. de, Carareto, C. M. A. (2005). **Origem, proliferação e extinção de elementos transponíveis: qual seria a importância da transferência horizontal na manutenção desse ciclo?** Sociedade Brasileira de Genética.
- Alzohairy, A. M., Gyulai, G., Jansen, R. K., Bahieldin, A. (2013). **Transposable elements domesticated and neofunctionalized by eukaryotic genomes.** *Plasmid*, v. 69, p. 1–15.
- Aulard, S., Lemeunier, F., Hoogland, C. (1995). **Chromosomal distribution and population dynamics of the 412 retrotransposon in a natural population of *Drosophila melanogaster*.** *Chromosoma*, n. 103, p. 693–699.
- Bächli, G. (2008). **TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae**, v.1.03, Database 2008/01. <http://taxodros.unizh.ch/>
- Bergman, C. M., Quesneville, H., Anxolabéhère, D., Ashburner, M. (2006). **Recurrent insertion and duplication generate networks of transposable element sequences in the *Drosophila melanogaster* genome.** *Genome biology*, v. 7, n. 11, p. R112.
- Bevan, I. S., Rapley, R., Walker, M. R. (1992). **Sequencing of PCR-amplified DNA.** *Genome Research*, v. 1, n. 4, p. 222–228.
- Biémont, C. A., Vieira, C. (2006). **Junk DNA as an evolutionary force.** *Genetica*, v. 443, n. 1, p. 521–524.
- Biémont, C.A. (2010). **Brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution.** *Genetics*, v. 186, n. 4, p. 1085–93.
- Blauth, M. L. (2005). **Expressão de elementos transponíveis em *Drosophila willistoni*.** Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Blauth, M. L., Bruno, R. V., Abdelhay, E., Valente, V. L. (2011). **Spatiotemporal transcription of the P element and the 412 retrotransposon during embryogenesis of *Drosophila melanogaster* and *D. willistoni*.** *Genetics and molecular biology*, v. 34, n. 4, p. 707–710.
- Borie, N., Loevenbruck, C., Biémont, C. (2000). **Developmental expression of the 412 retrotransposon in natural populations of *D. melanogaster* and *D. simulans*.** *Genetical research*, p. 217–226.
- Borie, N., Maisonhaute, C., Sarrazin, S., Loevenbruck, C., Biémont, C. A. (2002). **Tissue-specificity of 412 retrotransposon expression in *Drosophila simulans* and *D. melanogaster*.** *Heredity*, v. 89, n. 4, p. 247–52.
- Brookfield, J. F. (2005). **The ecology of the genome – mobile DNA elements and their hosts.** *Nature Reviews Genetics*, v. 6: 128-136.

Brookman, J. J., Toosy, A. T., Shashidhara, L. S., White, R. A. (1992). **The 412 retrotransposon and the development of gonadal mesoderm in *Drosophila***. *Development*, v. 116, n. 4, p. 1185–1192.

Capy, P., Vitalis, R., Langin, T., Higuete, D., Bazin, C. (1996). **Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor?** *Journal of molecular evolution*, v. 42, n. 3, p. 359–68.

Capy, P. (1998). **Dynamics and evolution of transposable elements**. Austin, Texas, U. S. A. Lands Bioscience and Chapman & Hall, p. 197.

Cizeron, G., Lemeunier, F., Loevenbruck, C., Brehm, A., Biémont, C. V. (1998). **Distribution of the retrotransposable element 412 in *Drosophila* species**. *Molecular biology and evolution*, v. 15, n. 12, p. 1589–1599.

Cizeron, G., Biémont, C. (1999). **Polymorphism in structure of the retrotransposable element 412 in *Drosophila simulans* and *D. melanogaster* populations**. *Gene*, v. 232, n. 2, p. 183–190.

De Frutos, R., Peterson, K., Kidwell, M. (1992). **Distribution of *Drosophila melanogaster* transposable element sequences in species of the obscura group**. *Chromosoma*, v. 101, p. 293–300.

Doolittle, W. F., Sapinza, C. (1980). **Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution**. *Nature*, v. 284, p. 601–603.

Finnegan, D. J., Rubin, G. M., Young, M. W., Hogness, D. S. (1978). **Repeated Gene Families in *Drosophila melanogaster***. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 42, p. 1053–1063.

Finnegan, D. J. (1985). **Transposable Elements in Eukaryotes**. In: Bourne, G. H., Danielli, J. F., Jeon, K. W. *International Review of Cytology*, Academic Press, v. 93: 281-326.

Finnegan, D. J. (1989). **Eukaryotic transposable elements and genome evolution**. *Trends in Genetics*, v. 5, n. 4.

Galun, E. (2003). **Transposable Elements: A Guide to the Perplexed and the Novice - With Appendices on RNAi, Chromatin Remodeling and Gene Tagging**. Editora Springer

Hoogland, C., Vieira, C., Biémont, C. (1997). **Chromosomal distribution of the 412 retrotransposon in natural populations of *Drosophila simulans***. *Heredity*, v. 79 (Pt 2), n. May 1996, p. 128–34.

Jones, R. N. (2005). **McClintock's controlling elements: the full story**. *Cytogenetic and Genome Research*, n. 109, p. 90–103.

Kaminker, J. S., Bergman, C. M., Kronmiller, B., Carlson, J., Svirskas, R., Patel, S., Frise, E., Wheeler, D. A., Lewis, S. E., Rubin, G. M., Ashburner, M., Celniker, S. E. (2002). **The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective**. *Genome biology*, v. 3, n. 12.

Kass, L. B., Chomet, P. (2009). **Barbara McClintock**. In: Bennetzen, J. L.; Hake, S. C. The handbook of maize - Genetics and Genomics. Springer, v. 18p. 17–52.

Kidwell, M. G., Lisch, D. R. (2001). **Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution**. Evolution; international journal of organic evolution, v. 55, n. 1, p. 1–24.

Martin, G., Wiernasz, D., Schedl, P. (1983). **Evolution of Drosophila repetitive-dispersed DNA**. Journal of molecular evolution, v. 19, p. 203–213.

Mcclintock, B. (1956). **Controlling elements and the gene**. Department of Genetics, Carnegie Institution of Washington, Cold Spring Harbor Symposia, New York.

Mugnier, N., Biémont, C., Vieira, C. (2005). **New regulatory regions of Drosophila 412 retrotransposable element generated by recombination**. Molecular biology and evolution, v. 22, n. 3, p. 747–57.

Pinsker, W., Haring, E., Hagemann, S. and Miller, W.J. (2001). **The evolutionary life history of P transposons: from horizontal invaders to domesticated neogenes**. Chromosoma 110: 148-158.

Potter, S. S., Brorein, W. J. Jr., Dunsmuir, P., Rubin, G. M. (1979). **Transposition of elements of the 412, copia and 297 dispersed repeated gene families in Drosophila**. Cell, v. 17, n. 2, p. 415–427.

Powell, J. R. (1997). **Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model**. Oxford: Oxford University Press, p. 577.

Robe, L. (2008). **Relações filogenéticas no gênero Drosophila (Diptera, Drosophilidae): uma abordagem molecular**. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rubin, G., Finnegan, D., Hogness, D. (1977). **The chromosomal arrangement of coding sequences in a family of repeated genes**. Progress in nucleic acid research and Molecular biology. v. 19, p. 221–226.

Sassi, A. K., Herédia, F., Loreto, E. L. S., Valente, V. L. S., Rohde, C. (2005). **Transposable elements P and gypsy in natural populations of Drosophila willistoni**. Genetics and molecular biology, v. 28, n. 4, p. 734–739.

Silva, J. C., Loreto, E. L.S., Clark, J. B. (2004). **Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements**. Current issues in molecular biology, v. 6, n. 1, p. 57–71.

Throckmorton, L. H. (1975). **The phylogeny, ecology and geography of Drosophila**. In: KING, R. C. Handbook of genetics. New York. p. 421–469.

Toda, M. J. (2007). **DrosWLD-Species: Taxonomic Information Database for World Species of Drosophilidae**. <http://bioinfo.lowtem.hokudai.ac.jp/db/modules/stdb/>

Vieira, C., Aubry, P., Lepetit, D., Biémont, C. (1998). **A temperature cline in copy number for 412 but not roo/B104 retrotransposons in populations of *Drosophila simulans*.** *Proceedings. Biological sciences/The Royal Society*, v. 265, n. 1402, p. 1161–5.

Vieira, C., Biémont, C. (1997). **Transposition rate of the 412 retrotransposable element is independent of copy number in natural populations of *Drosophila simulans*.** *Molecular biology and evolution*, v. 14, n. 2, p. 185–8.

Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., Schulman, A. H. (2007). **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** *Nature reviews. Genetics*, v. 8, n. 12, p. 973–82.

Will, B. M., Bayev, A. A., Finnegan, D. J. (1981). **Nucleotide sequence of terminal repeats of 412 transposable elements of *Drosophila melanogaster*. A similarity to proviral long terminal repeats and its implications for the mechanism of transposition.** *Journal of molecular biology*, v. 153, n. 4, p. 897–915.

Yeates, D. K., Wiegmann, B. M. (2005). **Phylogeny and Evolution of Diptera: Recent insights and new perspectives.** In: Yeates D. K., Wiegmann B. M. *The evolutionary biology of flies*. Columbia University Press, New York, pp 14-44.

Yuki, S., Ishimaru, S., Inouye, S., Saigo, K. (1986a). **Identification of genes for reverse transcriptase-like enzymes in two *Drosophila* transposons, 412 and gypsy; a rapid detection method of reverse transcriptase genes using YXDD box probes.** *Nucleic Acids Reseach*, v. 14, n. 7, p. 3017–3030.

Yuki, S., Inouye, S., Ishimaru, S., Saigo, K. (1986b). **Nucleotide sequence characterization of a *Drosophila* retrotransposon, 412.** *European journal of biochemistry/FEBS*, v. 158, n. 2, p. 403–10.

8. ANEXOS

A - Alinhamento da sequência de *Drosophila simulans* obtida neste trabalho com sequência do elemento 412 de *Drosophila melanogaster* (GenBank X04132).

```

          10      20      30      40      50      60
dme1  -----ATGGTCTATGGTCTGTTTTCACAGTGAAA-TGTTTCCGTAAATGTATGGTCT
dsim  AATATGCATGGTCTATGGTCTGTTTTCACAGTGAAAATGTTTCCGTAAATGTATGGTCT
Clustal Consensus *****

          70      80      90      100     110     120
dme1  GAAAATGTATTATTGCCCAATGAAT-TGCTGCTAACTCTTGTC-TGTTGTACTCTTATT
dsim  GACATGTATTATTGCCCAATGAATCTGCTGCTA-CTCTTGCTCACTGTTGTCTCTTATT
Clustal Consensus ** *****

          130     140     150     160     170     180
dme1  GCTT--TCACCTTC--GTAAAA-GCTCT-----
dsim  GCCTCATCACCTCTCCCGTACAACGCTCTTGCGACTGCATCACGGCACACTCGCGCGCGT
Clustal Consensus ** * *****

          ....|....
dme1  -----
dsim  TCGCGCGCC
Clustal Consensus

```

B - Alinhamentos da sequência de *Drosophila simulans* obtida neste trabalho com sequências dos genomas disponíveis de *Drosophila* (FlyBase).

Drosophila simulans chrU_M_6729 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence

>gnl|dsim|chrU_M_6729 type=golden_path_region; loc=chrU_M_6729:1..11596; ID=chrU_M_6729; dbxref=GB:CH991053; MD5=1322109296608ac518c468a8438dd67e; length=11596; release=r1.4; species=Dsim; Length = 11596

HSP # = 1, Score = 135.293 bits (68), Expect = 8.94491e-30
Identities = 107 / 115 (93%), Positives = 107 / 115 (93%), Gaps = 5 / 115 (4.3%)
Strand = Plus / Minus

GBrowse		Subject FASTA	
Query: 8	ATGGTCTATGGTCTGTTTTACAGTGAAAATGTTTTCCGTAAATGTATGGTCTGACATGT	67	
Subject: 2953	ATGGTCTATGGTCTGTTTTACAGTGAAA-TGTTTTCCGTAAATGTATGGTCTGAAAATGT	2895	
Query: 68	ATTATTGCCCAATGAATCTGCTGCT-ACTCTTGCTCACTGTTGTCCTCTTATTGC	121	
Subject: 2894	ATTATTGCCCAATGAAT-TGCTGCTAACTCTTGTT--CTGTTGACTCTTATTGC	2843	

Drosophila melanogaster chromosome X, complete sequence

>gnl|dmel|X type=chromosome_arm; loc=X:1..22422827; ID=X; dbxref=REFSEQ:NC_004354, GB:AE014298; MD5=a83251de102926ba52e3e71c72f1d9b0; length=22422827; release=r5.53; species=Dmel; Length = 22422827

HSP # = 1, Score = 135.293 bits (68), Expect = 8.94491e-30
Identities = 107 / 115 (93%), Positives = 107 / 115 (93%), Gaps = 5 / 115 (4.3%)
Strand = Plus / Plus

GBrowse View: Gene Models/Evidence		GBrowse		Subject FASTA	
Query: 8	ATGGTCTATGGTCTGTTTTACAGTGAAAATGTTTTCCGTAAATGTATGGTCTGACATGT	67			
Subject: 192292	ATGGTCTATGGTCTGTTTTACAGTGAAA-TGTTTTCCGTAAATGTATGGTCTGAAAATGT	192350			
Query: 68	ATTATTGCCCAATGAATCTGCTGCT-ACTCTTGCTCACTGTTGTCCTCTTATTGC	121			
Subject: 192351	ATTATTGCCCAATGAAT-TGCTGCTAACTCTTGTT--CTGTTGACTCTTATTGC	192402			

