

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Evilis da Silva Monte**

**Cartografia Genômica e Evolução em *Drosophila*  
*sturtevantii* Duda, 1927 (grupo *saltans*)**

**Recife  
2013**

**Evilis da Silva Monte**

**Cartografia Genômica e Evolução em *Drosophila*  
*sturtevantii* Duda, 1927 (grupo *saltans*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

**Orientador:** Profa. Tania Tassinari Rieger

**Coorientador:** Prof. Dr. José Ferreira dos Santos

**Recife**

**2013**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Monte, Evilis da Silva**

**Cartografia genômica e evolução em *Drosophila sturtevantii* Duda, 1927 (grupo saltans)/ Evilis da Silva Monte– Recife: O Autor, 2013.**

**56 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Tania Tassinari Rieger**

**Coorientador: José Ferreira dos Santos**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2013.**

**Inclui bibliografia**

- 1. Citogenética 2. Mosca I. Rieger, Tania Tassinari (orientadora) II. Santos, José Ferreira dos (coorientador) III. Título**

**572.8**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2013- 168**

**Evilis da Silva Monte**

**Cartografia Genômica e Evolução em *Drosophila*  
*sturtevantí* Duda, 1927 (grupo *saltans*)**

**Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**Banca Examinadora:**

---

**Dra. Tania Tassianri Rieger**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. Martín Alejandro Montes**  
**Universidade Federal Rural de Pernambuco**

---

**Dra. Rita de Cassia de Moura**  
**Universidade de Pernambuco**

---

**Dra. Neide Santos**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

**Recife**  
**2013**



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer ao CNPq por financiar minha permanência na Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética – UFPE

Aos Professores Tania Tassinari Rieger e José Ferreira dos Santos por todos esses anos de orientação, amizade e afeição. Sou muito grata a ambos.

Aos meus pais **Lindalva** e **José**, e **Elvio** meu querido irmão. Obrigada pelo apoio, dedicação e confiança. Sem vocês não sou ninguém.

Aos meus sogros, **Vera** e **Dário**, por me aceitarem e acolherem em sua casa e família como se eu fosse filha. E ao meu cunhado **Danilo**, que é mais um irmão que ganhei na vida.

Aos meus queridos amigos que fazem parte da Família LED, pois nosso laboratório não é um simples laboratório. Nós somos uma família. Cada um faz e fez parte da história tanto da minha vida acadêmica como pessoal. **Adiles, Antonio Terto, Jessica, Jacke, Morse, Nathalia, Nicole, Paulinha, Tyago e Thiago Pinheiro**. A **Fernanda, Júlio e Ítalo** que mesmo distante estão presentes na minha vida. Que a nossa amizade perpetuo. AMO MUITO TODOS VOCES.

Aos ex-integrantes da Família LED mais que nunca vão deixar de ser: **Augusto, Luh e Rafa**.

Aos meus companheiros e amigos do **Maria José: Ana Lúcia, Renato, Rosely, Adriana e Johny**. Sou muito grata por ter encontrado pessoas como vocês. Obrigada por tudo!

Ao meu Amado, **Diego**, por toda dedicação, amor, carinho, compreensão e paciência. Sou muito grata por todos os maravilhosos momentos de alegrias e felicidades. E por me tornar um ser humano cada dia melhor. Te amo muito, meu amor!

“O caminho do desmedido conduz ao palácio da sabedoria.”  
William Blake

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”  
Dalai Lama

## Resumo

A disponibilidade de 12 genomas sequenciados de espécies do gênero *Drosophila* enfatizou a importância da citogenética, incluindo a construção de fotomapas dos cromossomos politênicos de outras espécies do gênero. Esta ferramenta é relevante para a localização de genes, detecção de diversidade genética entre populações e para a verificação de inferências evolutivas. A proposta deste trabalho foi de ampliar os estudos citogenéticos no gênero *Drosophila*, através da construção do fotomapa dos cromossomos politênicos e mapeamento gênico em *Drosophila sturtevantii*, devido à escassez de dados citogenéticos do grupo *saltans*. Para a preparação do fotomapa foi utilizada a linhagem DIR (Dois Irmãos, Recife) coletada no *Campus* da UFRPE em 2009. O fotomapa mostrou que o complemento cromossômico é constituído por cinco braços eucromáticos. O par I é submetacêntrico, representado pelos braços **XL** e **XR**, o par II é metacêntrico representado pelos braços **IIIL** e **IIIR** e o cromossomo **III** é acrocêntrico. Foram observadas duas diferentes inversões paracêntricas, uma no braço **XL** e outra no cromossomo **III**. Para os genes *Hsp70* e *Hsp83* foram identificadas apenas uma marcação relevante, no cromossomo **III** (seção 86) e no braço **XR** (seção 32), respectivamente. Os resultados encontrados possibilitaram a comparação do genoma de *D. sturtevantii* com o genoma de outras espécies e, ainda, sugerem a homologia cromossômica entre os grupos *saltans*, *willistoni* e *melanogaster*.

**Palavras-chave:** *Drosophila*; fotomapa; *Hsp70*; *Hsp83*; Hibridização *in situ*.



## Abstract

The availability of sequenced genomes of 12 species of the genus *Drosophila* emphasized the importance of cytogenetics, including preparation of polytene chromosome maps of other species. This tool is relevant to gene mapping, detection of genetic diversity among populations, as well as checking for evolutionary inferences. The purpose of this work was to broaden the evolutionary studies in the genus *Drosophila*, through the preparation of *Drosophila sturtevantii* polytene chromosomes photomap and gene mapping, which are unavailable to *saltans* group species. The strain DIR (Dois Irmãos, Recife), collected in the UFRPE campus in 2009, was used to prepare a photomap. The photomap showed that the chromosome complement consists of five euchromatic arms. The pair I is submetacentric, represented by **XL** and **XR** arms, pair II is metacentric represented by **IIL** and **IIR** arms, and chromosome III is acrocentric. Were observed two different paracentric inversions in polytene arm **XL** and in chromosome **III**. The *Hsp70* and *Hsp83* genes were mapped in the section 86 of **XR** arm and in the section 32 of chromosome **III**, respectively. These results allowed the comparison of *D. sturtevantii* to other species also suggest the chromosomal homology between groups *saltans*, *willistoni* and *melanogaster*.

**Key words:** *Drosophila*; photomap; *Hsp70*; *Hsp83*; *In situ* Hybridization.

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1-</b> Mapa desenhado em câmara clara de <i>D. prosaltans</i> (Cavalcanti, 1948)	19
<b>Figura 2</b> - Exemplares fêmea <b>(A)</b> e macho <b>(B)</b> da linhagem DIR da espécie <i>Drosophila sturtevantii</i> (Fotos da Linhagem DIR, no Laboratório de Experimentação em <i>Drosophila</i> ).	21
<b>Figura 3</b> – Fotomapa dos cromossomos politênicos de <i>Drosophila sturtevantii</i> , linhagem DIR. Os centrômeros estão voltados à esquerda.	39
<b>Figura 4</b> – Inversão detectada no braço <b>XL</b> , envolvendo as seções 1 a 12 (seta).	41
<b>Figura 5</b> – Inversão observada no braço <b>III</b> , envolvendo as seções 82 a 86.	42
<b>Figura 6</b> - Marcação da sonda do gene <i>Hsp70</i> na seção 86 do braço <b>III</b> (A), seção 62 do cromossomo <b>IIR</b> (B), seção 40 do cromossomo <b>IIL</b> e seção 30 do braço <b>XL</b> de <i>Drosophila sturtevantii</i> .	43
<b>Figura 7</b> - Sinal da sonda do gene <i>Hsp83</i> na seção 32 (seta) do braço <b>XR</b> de <i>Drosophila sturtevantii</i> .	44
<b>Figura 8-</b> Relação de homologia entre os elementos cromossômicos de <i>D. sturtevantii</i> , <i>D. willistoni</i> e <i>D. melanogaster</i> e sua relação como elementos de Muller	49

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Homologia cromossômica entre algumas espécies do subgênero <i>Sophophora</i> de <i>Drosophila</i> .	23
<b>Tabela 2</b> Frequência de localização dos genes <i>Hsp70</i> e <i>Hsp83</i> nos cromossomos politênicos de <i>Drosophila strutevanti</i> . N = total de núcleos politênicos com marcação identificada.	38

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>13</b>
<b>2. Revisão da Literatura</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Ordem Diptera</b>	<b>14</b>
<b>2.1.1 Família Drosophilidae</b>	<b>15</b>
<b>2.1.1 Gênero <i>Drosophila</i></b>	<b>16</b>
<b>2.1.3 Grupo <i>saltans</i></b>	<b>18</b>
<b>2.2. Organização estrutural do genoma de <i>Drosophila</i></b>	<b>21</b>
<b>2.2.1 Cromossomo politênicos em <i>Drosophila</i></b>	<b>23</b>
<b>2.3 Hibridização <i>in situ</i></b>	<b>25</b>
<b>2.4 Proteínas de Choque Térmico</b>	<b>25</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>31</b>
<b>4. Material e Métodos</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Linhagem utilizada, cultivo e manutenção dos estoques</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Tratamento das lâminas</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Preparações citológicas</b>	<b>33</b>
<b>4.3.1 Construção do fotomapa</b>	<b>34</b>
<b>4.4 Amplificação e marcação dos plasmídios</b>	<b>34</b>
<b>4.5 Hibridização <i>in situ</i></b>	<b>34</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>36</b>

<b>5.1 Fotomapa dos cromossomos politênicos</b>	<b>36</b>
<b>5.1.2 Ocorrência de inversões</b>	<b>37</b>
<b>5.1.3 Hibridização <i>in situ</i> permanente</b>	<b>37</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>45</b>
<b>6.1 Fotomapa e caracterização cariotípica de <i>D. sturtevantii</i></b>	<b>45</b>
<b>6.2 Ocorrência de inversões</b>	<b>46</b>
<b>6.3 Localização de genes por Hibridização <i>in situ</i></b>	<b>47</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>50</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>51</b>

## 1. Introdução

O grupo *saltans* é composto por pequenas moscas, descrito como membro do subgênero *Sophophora* do gênero *Drosophila*. Na descrição original, o grupo incluía apenas espécies escuras, tendo sido posteriormente ampliado para incluir espécies amareladas. Com base nas características dos órgãos genitais masculinos e morfologia externa do corpo, o grupo *saltans* foi subdividido em cinco subgrupos: *cordata*, *elliptica*, *parasaltans*, *saltans* e *sturtevantii*. A espécie tipo do subgrupo *sturtevantii*, *D. sturtevantii*, é a espécie mais dispersa do grupo *saltans*, ocorrendo nas ilhas do Caribe e do México até o Sul do Brasil. Tal dispersão a torna ideal para estudos evolutivos. Vários estudos sobre o papel dos elementos de transposição nesta espécie foram realizados. Contrastando com a abundância de estudos com elementos de transposição, os dados citogenéticos são escassos tanto para espécie como para o grupo.

Neste trabalho, o fotomapa dos cromossomos politênicos de *D. sturtevantii* foi confeccionado para possibilitar a identificação das regiões gênicas marcadas pela técnica de hibridização *in situ* e identificar os pontos de quebra de inversões ocorridas na linhagem de estudo. Nas localizações cromossômicas dos genes *Hsp70* e *Hsp83* foram utilizadas sondas obtidas a partir do genoma de *D. melanogaster*.

A construção do fotomapa e o mapeamento físico de genes proporciona o início nos estudos citogenéticos em *D. sturtevantii*. Assim, este trabalho visa contribuir para o entendimento das relações evolutivas entre os grupos *saltans* e *willistoni* do subgênero *Sophophora*, do gênero *Drosophila*.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1. Ordem Diptera**

A ordem Diptera (Insecta, Arthropoda) é uma das mais ricas em número de espécies de moscas, representando 10-15% das espécies conhecidas de animais, e sendo ecologicamente um dos grupos de organismos mais diversificados (Kitching *et al.* 2005). Estima-se que 150 mil espécies de Diptera foram descritas, mas o número total de espécies de moscas existentes é subestimado (Thompson, 2005). As espécies de dípteros foram classificadas em cerca de 10.000 gêneros, 150 famílias, 22 a 32 superfamílias, 8 a 10 infraordens e 2 subordens (Yeates & Wiegmann 1999; Thompson, 2005).

Diversos autores (Kukalova-Peck, 1991; Griffiths, 1996; Merritt *et al.*, 2003) sustentam a monofilia ou origem comum de Diptera, estabelecida através de alterações morfológicas reconhecidas como sinapomorfias, incluindo a transformação das asas traseiras em halteres e desenvolvimento da porção oral em região esponjosa, diferindo dos demais insetos. Entretanto, foi proposto um caráter merofilético, ou seja, vários clados possuem origem distinta (Yeates & Wiegmann, 1999).

Dípteros são insetos dióicos e ovíparos, com desenvolvimento holometábolo. O tamanho corpóreo varia, em geral, entre 3 e 15 mm de comprimento. Apenas as asas anteriores possuem função de voo, as posteriores foram modificadas em órgãos de equilíbrio denominados balancins ou halteres. Existe diversidade nas peças bucais, como por exemplo, aparelho sugador, picador-sugador ou lambedor. A postura dos ovos é próxima ou sobre o substrato, para facilitar o encontro do alimento pelas larvas ao eclodir. As larvas geralmente são ápodas e vermiformes. As pupas são geralmente imóveis e seu casulo é

formado a partir da última exúvia larval. A partenogênese é rara, sendo encontrada em espécies das famílias Psychodidae, Chironomidae e Drosophilidae (Buzzi & Myazati, 2002).

### **2.1.1. Família Drosophilidae**

A família Drosophilidae diferenciou-se dentro do agrupamento merofilético Cyclorrhapha, um dos mais estudados da ordem Diptera. A diversificação de Cyclorrhapha foi datada aproximadamente no Cretáceo (100-140 milhões de anos) e os fósseis das famílias Drosophilidae e Muscidae foram localizados a partir do Eoceno (Yeates & Wiegmann, 1999).

A família Drosophilidae pertence à superfamília Ephydroidea, que contém duas grandes famílias, Ephydridae e Drosophilidae, bem como várias famílias menores, tais como Camilidae, Diastatidae e Curtonotidae (McAlpine, 1989; Thompson, 2005). Baseado na similaridade de hábitos alimentares, Throckmorton (1975) sugeriu que Diastatidae seria a família mais próxima de Drosophilidae.

As espécies pertencentes à família Drosophilidae são vulgarmente conhecidas como moscas-das-frutas ou, mais apropriadamente, moscas-do-vinagre, por se alimentarem em material orgânico em decomposição. Possuem pequeno porte, com tamanho médio entre 2,5 a 3,0 mm de comprimento, olhos com colorações avermelhadas e asas hialinas, algumas espécies podem apresentar veias esfumadas ou manchas em suas asas, como as drosófilas havaianas (Wheeler, 1981). O corpo apresenta variação de coloração, sendo encontradas espécies claras a escuras e/ou ocorrer variação de ornamentação como, listrado ou manchado, tal como nas espécies do grupo *saltans* e faixas prateadas no gênero *Zaprionus* (Markow & O'Grady, 2006).



### 2.1.2. Gênero *Drosophila*

Muitos aspectos da biologia são similares na maioria dos organismos, entretanto, alguns são mais fáceis de estudar do que outros. *Drosophila melanogaster* é utilizada como organismo modelo a mais de 100 anos, fazendo com que atualmente seja um dos eucariotos multicelulares melhor caracterizados em todos os níveis. Os primeiros experimentos com *Drosophila* remontam ao ano de 1910, no laboratório de Thomas Hunt Morgan. Inicialmente, o tamanho pequeno, grande número de descendentes e facilidade de cultivo e manipulação foram o que converteram *D. melanogaster* em uma espécie ideal para os estudos de transmissão de genes e mutagenese. Na primeira década do Século XXI, a análise comparativa dos genomas de 12 espécies de *Drosophila*, único gênero de eucariotos com tal número de genomas disponíveis, contribuiu de forma definitiva para firmar *D. melanogaster* como modelo biológico (Clark *et al.*, 2007).

O Gênero *Drosophila* possui 8 subgêneros e cerca de 1.400 espécies, apresenta alta diversidade e ampla distribuição geográfica (Wheeler, 1986). O subgênero *Sophophora* que foi estabelecido por Sturtevant (1939), compreende 332 espécies subdivididas em oito grupos, entre os quais o grupo *saltans* que contém o subgrupo *sturtevanti* (Bächli, 2013).

Embora a taxonomia do gênero *Drosophila* seja alvo de bastante controvérsia. A versão mais atual e aceita divide o gênero da seguinte maneira (Bächli, 2013).

Ordem **Diptera**

Subordem **Cyclorrhapha**

Divisão **Schizophora**

Seção **Acalyptratae**

Superfamília **Ephydroidea**

Família **Drosophilidae**

Subfamília **Drosophilinae**

Tribo **Drosophilini**

Subtribo **Drosophilina**

Gênero **Drosophila**

Subgêneros

- *Dorsilopha*
- *Drosophila*
- *Siphlodora*
- *Sophophora*
- *Chusqueophila*
- *Dudaica*
- *Phloridosa*
- *Psilodorsha*

Grupo *saltans*

Subgrupo *cordata*

Subgrupo *elliptica*

Subgrupo *parasaltans*

Subgrupo *saltans*

Subgrupo *sturtevanti*

Espécie *Drosophila sturtevanti*

### 2.1.3 Grupo *saltans*

O grupo *saltans* foi estabelecido por Sturtevant (1929), como membro do subgênero *Sophophora*. Na descrição inicial, o grupo incluía apenas as espécies escuras, tendo sido posteriormente estendido para incluir espécies amareladas por Magalhães (1956). Magalhães e Björnberg (1957) subdividiram o grupo *saltans* em cinco subgrupos, *cordata*, *elliptica*, *parasaltans*, *saltans* e *sturtevanti*, baseados nas características dos órgãos genitais masculinos e morfologia externa do corpo. O subgrupo *sturtevanti* ocuparia uma posição intermediária durante a diversificação, enquanto os subgrupos *cordata* e *elliptica* foram os primeiros a divergir na história do grupo *saltans*, os subgrupos *saltans* e *parasaltans* seriam os mais recentes (O'Grady *et al.*, 1998).

O mapa desenhado em câmara clara por Cavalcanti (1948) faz de *D. prosaltans* a única espécie do grupo *saltans* que possui um mapa politênico (Fig. 1). A espécie apresenta cinco braços politênicos de tamanhos similares, sendo dois correspondentes ao cromossomo X (braços XL e XR), dois ao cromossomo II (braços IIL e IIR), que são metacêntricos, e um braço maior correspondente ao cromossomo III, que é acrocêntrico.

As espécies mais próximas com disponibilidade de mapas politênicos são as do grupo *willistoni* (Sorsa, 1988; Schaeffer *et al.*, 2008; Rohde e Valente, 2012), considerado o grupo irmão de *saltans* ambos situados na base da filogenia de *Sophophora* (Robe *et al.*, 2005).

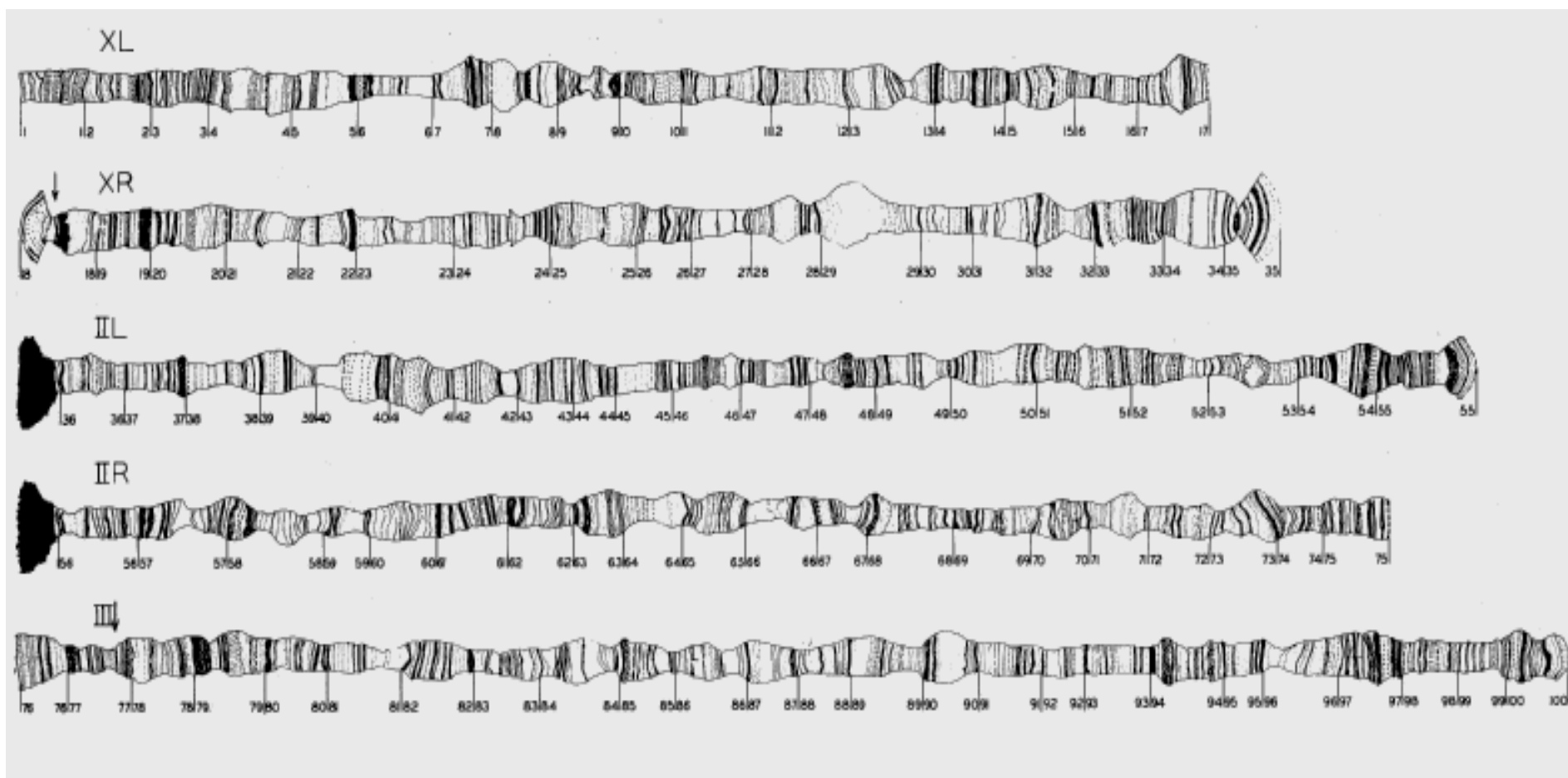


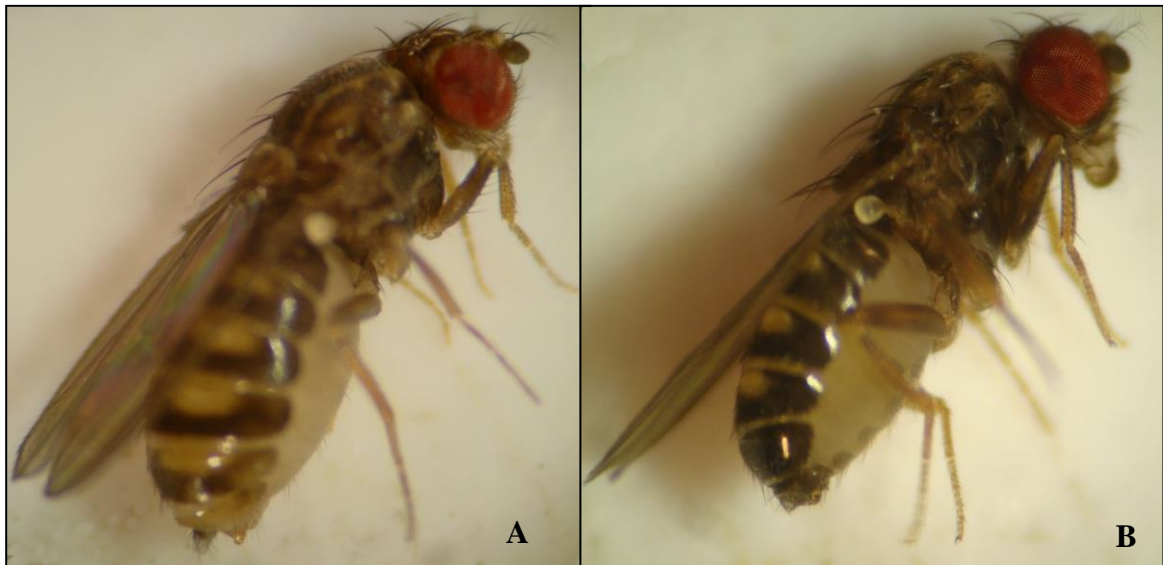
Figura 1. Mapa desenhado em câmara clara de *D. prosaltans* (Cavalcanti, 1948)

*Drosophila sturtevantii* (Fig. 2 A e B) é a espécie tipo representativa do subgrupo *sturtevantii*, do grupo *saltans* do gênero *Drosophila*. Este subgrupo inclui também *D. rectangularis*, *D. milleri*, *D. magalhãesii* e *D. dacunhai* (Mourão e Bicudo, 1967; Bicudo, 1979). Com base no isolamento reprodutivo, Bicudo (1979) sugeriu que a sequência de derivação filogenética no subgrupo *sturtevantii* seria: *D. magalhãesii*, *D. milleri*, *D. sturtevantii* e *D. dacunhai*. Embora a ampla distribuição geográfica de *D. sturtevantii* possa indicar sua ancestralidade no grupo.

A espécie mais dispersa do grupo *saltans* é *D. sturtevantii*, ocorre desde as ilhas do Caribe e do México até o Sul do Brasil, tornando-se assim ideal para estudos de evolução. Vários estudos sobre o papel dos elementos de transposição nesta espécie foram realizados (Almeida *et al.*, 2003; Castro & Carareto, 2004; Silva & Kidwell, 2004).

Contrastando com a abundância de estudos com elementos de transposição, os dados citogenéticos são escassos para *D. sturtevantii*. Dobzhansky e Pavan (1943) descreveram o cariótipo mitótico, que apresenta  $2n=6$ , com o par 1, o metacêntrico maior, correspondendo aos cromossomos sexuais, sendo o par 2 um autossomo metacêntrico e o par 3 um autossomo acrocêntrico, um pouco menor que o par 1. Kobayashi e Bicudo (1997) apresentaram a análise de 37 linhagens de *D. sturtevantii*, relatando 18 inversões paracêntricas heterozigóticas, a maioria no cromossomo III. No entanto, não há na literatura um mapa dos cromossomos politênicos de *D. sturtevantii*, necessário para uma melhor caracterização citogenética e genômica. Powel *et al* (2003) sequenciaram os genes, *RpL32*, *Adh*, *Hsp83*, *Sod*, *Gpdh*, *per* e *ry* de *D. sturtevantii*, com base nessas sequências foi realizada a análise filogenética e o

padrão do uso de códon, em relação às espécies dos grupos *willistoni* e *melanogaster*. Os resultados demonstraram que o padrão do uso de códon é semelhante para todas as espécies e que a divergência genética, entre *saltans/willistoni*, possivelmente, ocorreu há 20 milhões de anos.



**Figura 2.** Exemplares fêmea **(A)** e macho **(B)** da linhagem DIR da espécie *Drosophila sturtevantii* (Fotos da Linhagem DIR, no Laboratório de Experimentação em *Drosophila*).

## 2.2. Organização estrutural do genoma de *Drosophila*

Comparar os genomas de diferentes espécies é fornecer informações sobre os padrões e as taxas de evolução com a finalidade de permitir inferências de informação das espécies mais estudadas para outras com menos informação. Mapas físicos facilitam a identificação de marcadores moleculares, assim como genes e sequências. Atualmente, estão disponíveis mapas físicos do genoma de

muitas espécies de *Drosophila*, bem como a sequência completa de nucleotídeos de 12 espécies (Murphy *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2007; Bhutkar *et al.*, 2008).

*Drosophila* continua a ser um excelente modelo para realizar estudos de genômica comparada. A existência de cromossomos politênicos e da disponibilidade de clones genômicos permite uma comparação direta da organização do genoma em diferentes espécies do gênero (Sidén-Kiamos, 1990; Segarra, 1995; Hahn, *et al.*, 2007; Behura, *et al.*, 2011;). Estruturalmente, o genoma de *Drosophila* é heterogêneo, mas classicamente duas regiões são distinguidas nos cromossomos, a heterocromatina e a eucromatina. A eucromatina é formada em 80% por sequências de DNA codificante e os 20% restantes na maior parte por sequências moderadamente repetitivas, como elementos de transposição. A heterocromatina encontra-se principalmente nas regiões centroméricas dos autossomos, enquanto metade do cromossomo X e o cromossomo Y são heterocromáticos. Esta porção do genoma consiste, essencialmente, de elementos de transposição, DNA satélite e os genes que codificam o RNA ribossomal e histonas (Powell, 1997).

Muller (1940), Sturtevant e Novitski (1941) propuseram que o cariótipo ancestral do gênero *Drosophila* seria formado por cinco cromossomos médios acrocêntricos e um cromossomo puntiforme. Enquanto o número de cromossomos é variável no gênero, existe uma notável conservação do conteúdo gênico dos braços cromossômicos. Dois tipos de alterações cromossômicas são predominantes na evolução cariotípica de *Drosophila*: fusão ou fissão de centrômeros e inversões paracêntricas. A hipótese de Müller pode ser demonstrada analisando a distribuição dos cariótipos das filogenias do gênero *Drosophila* (Powell, 1997).

Em estudos genéticos comparativos, Muller (1940), Sturtevant e Novitski (1941) foram também os primeiros a salientar que diferentes espécies do gênero tendem a ter mutantes fenotípicos similares nas mesmas famílias gênicas. Baseados no padrão de banda e interbanda e com auxílio desses mutantes foi possível estabelecer um sistema de nomenclatura cromossômica comum para todo o gênero. Cada cromossomo ou braço cromossômico apresentaria correspondência com um dos seis elementos cromossômicos propostos, conforme representado na Tabela 1 (Powell, 1997). As comparações evolutivas, através da busca de homologias cromossômicas, também se estendem para além do gênero *Drosophila*, como exemplo, *Musca*, *Anopheles* e *Aedes*, entre outros (Heckel, 1993; Hahn et al., 2007; Behura et al., 2011 ).

Tabela 1. Homologia cromossômica entre algumas espécies do subgênero *Sophophora* de *Drosophila*.

Espécies	Elementos de Müller					
	A	B	C	D	E	F
<i>Melanogaster</i>	X	2L	2R	3L	3R	4
<i>Simulans</i>	X	IIL	IIR	IIIL	IIIR	4
<i>Ananassae</i>	XL-XR	IIIR	IIIL	IIL	IIR	X
<i>Willistoni</i>	XL	IIR	IIL	XR	III	
<i>Suboscura</i>	A	U	E	J	O	D

Fonte: Powell, 1997.

### 2.2.1. Cromossomos politênicos em *Drosophila*

Em alguns tecidos de insetos e plantas, os núcleos em diferenciação passam novamente pelas fases S e G<sub>2</sub> do ciclo celular, mas não completam a



divisão. Os cromossomos descondensam mais uma vez e os núcleos entram em um novo período G<sub>1</sub>, caracterizando os ciclos endomitóticos, sendo o produto desses ciclos denominados núcleos poliplóides (Zhimulev, 1996).

Nas glândulas salivares em dípteros forma-se um tipo especial de núcleo poliplóide, nos quais as novas cromátides irmãs, surgidas após cada ciclo endomitótico, são mantidas completamente pareadas, dando origem aos cromossomos politênicos. A cromatina torna-se visível devido ao pareamento dos cromonemas irmãos e ao alto nível de poliploidização. O posicionamento lado a lado dos cromômeros forma o padrão de bandas e interbandas. Em sua morfologia podemos observar inversões heterozigóticas paracêntricas e/ou pericêntricas, deleções e regiões alargadas com intensa atividade gênica denominada pufes. Em insetos, estes cromossomos podem ocorrer também em células do ceco gástrico e túbulos de Malpighi (Zhimulev, 1996).

Os cromossomos politênicos foram descritos por Balbiani em 1881, observando glândulas salivares do díptero *Chironomus*. Observando células em meiose Liliun e Belling (1928) descreveram que o cromonema tinha aparência de “colar-de-contas”, e que cada espessamento contém genes. Assim, a partir de 1930 os cromossomos politênicos passaram a ter mapeamentos de genes por análise de mutantes, construção de mapas citogenéticos e a organização de suas principais estruturas morfológicas (Zhimulev, 1996; Novikov *et al.*, 2007).

A construção de mapas dos cromossomos politênicos continua sendo uma importante ferramenta citogenética, com grande utilidade didática como guia de conferência de marcas físicas durante a montagem de sequências de DNA (Clark *et al.*, 2007; Bhutkar *et al.*, 2008) e para comparação cromossômica em estudos

evolutivos (Campos *et al*, 2007; Bhutkar *et al*, 2008; Schaeffer *et al*, 2008; Rohde e Valente, 2012).

### **2.3. Hibridização *in situ***

A hibridização *in situ* detecta sequências específicas de DNA ou RNA, utilizando como sonda uma sequência complementar de ácido nucléico marcado radioativa ou quimicamente (Lancellotti *et al.*, 2000; Villa, 2000). Tem sido aplicada em cromossomos de diversos organismos, principalmente para localização de sequências repetitivas. Combinada aos cromossomos politênicos ela é especialmente informativa, também para localizar genes de cópia única, tendo sido utilizada em diversos gêneros de dípteros, tais como *Rhagoletis* (Procunier e Smith, 1993), *Aedes* (Brown & Knudson, 1997), *Anopheles* (Benedict *et al.*, 1993; Kumar & Collins, 1994) e *Zaprionus* (Campos *et al.*, 2007). A hibridização *in situ* permite realizar a “cartografia cromossômica” das espécies, através da localização de genes. A hibridização *in situ* é extremamente útil para estudos evolutivos no gênero *Drosophila*, através da comparação da localização dos genes entre *D. melanogaster* e outras espécies, permitindo a identificação de blocos de sintenia gênica e de rearranjos cromossômicos entre as espécies (Campos *et al.*, 2007).

### **2.4. Proteínas de Choque Térmico**

Quando uma célula sofre estresse severo, algumas funções são paralisadas ou pelo menos retardadas, tais como os processos de transporte, síntese de DNA, RNA e de proteínas. Entretanto, as células de todos os organismos

respondem aos estresses através de transcrição e subsequente tradução de um grupo específico de proteínas altamente conservadas, denominadas “proteínas de estresse” (Locke *et al.*, 1990). A definição “proteína de estresse” tem caráter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular (Welch, 1993).

Esse conjunto particular de proteínas são preferencialmente expressas sob condições de variações térmicas e podem ser chamadas de proteínas de choque térmico (Hsps, do inglês *heat shock proteins*). A síntese de proteínas de choque térmico, também chamadas de chaperonas moleculares, é induzida quando a variação ambiental perturba o sistema fisiológico de um organismo, na medida em que suas proteínas desnaturam (Frydman, 2001). Sob tais condições as Hsps e outras chaperonas moleculares estabilizam a desnaturação proteica através do reenovelamento de proteínas desnaturadas e/ou facilitação da degradação de proteínas irreversivelmente desnaturadas (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Estas respostas fisiológicas aos estresses se mantêm conservadas entre os organismos, tanto procariotos como eucariotos (Lee & Delinger, 1991).

Samali e Orrenius (1998) indicaram que o acúmulo de proteínas danificadas pode não somente sinalizar a indução de Hsps, mas também iniciar o programa de autodestruição celular, conhecido como apoptose. As Hsps ainda exercem funções de assistência no dobramento e redobramento conformacional de proteínas, na catálise de isomerização *cis/trans* de peptídeos e no reconhecimento de resíduos de prolina, para definir a conformação correta de segmentos das proteínas alvos (van Eden & Young, 1996; Feige *et al.*, 1996; Neto *et al.*, 2008). Também atuam em processos de alteração homeostática, tais como exposição a metais pesados, aumento na concentração de cálcio intracelular,

diminuição de glicose para fornecimento de energia às células, infecções virais e bacterianas, hipóxia, análogos de aminoácidos, estresse oxidativo e presença de toxinas (Welch, 1993; Yellon & Marber, 1994).

A descoberta da resposta ao choque térmico ocorreu ao observar o aumento especial nas seções dos cromossomos politênicos de *D. busckii* depois do tratamento térmico das moscas. Ao expor as larvas ao choque térmico, houve a indução de novos pufes, que também surgiram em resposta a outros tipos de estresse (Zhimulev, 1996).

As Hsps são uma classe de proteínas altamente conservadas, desde seres procariotas até o homem, o que é um indicativo de seu grande valor evolutivo (Peetermans, 1995). As Hsps são agrupadas de acordo com seus pesos moleculares, sendo definidas como famílias HSP20, HSP47, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP110 e a família da Ubiquitina (Nover & Scharf, 1991; Jäättelä & Wissing, 1992).

Os membros das famílias que possuem o menor peso molecular (12 – 43 kDa) são conservados e ubiquitinados (Jakob *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1998). Essas proteínas facilitam a redobragem correta de proteínas danificadas (Jakob *et al.*, 1993; Rogalla *et al.*, 1999). As proteínas da família HSP60 são também chamadas de chaperoninas. Em eucariotos são sintetizadas no citoplasma e transportadas para a mitocôndria. Estão associadas com a matriz mitocondrial, produção, armazenamento e transporte de proteínas na mitocôndria (Richter-Landsberg & Goldbaum, 2003).

A *Hsp70* é a mais abundante entre as proteínas de choque térmico sendo apontada como sendo a responsável pelo mecanismo de sensibilidade à temperatura, como um termômetro celular, que regula a expressão das demais

proteínas de choque térmico (Craig & Gross, 1991). Além das funções de chaperonas e de proteção celular, têm forte interação com os receptores de hormônios quando há um aumento de sua concentração nas células (Tsai e O'Malley, 1991; Welch, 1993). A Hsp70 é composta por dois domínios, um domínio de ATPase e uma proteína domínio de ligação (Zhu *et al.*, 1996). A atividade de Hsp70 é regulada por cofatores, como o grupo de proteínas que contêm um domínio J e uma Hsp40 (Kampinga & Craig, 2010). Esse domínio interage com o domínio ATPase da Hsp70 estimulando a hidrólise do ATP vinculado. Juntos, vinculam proteínas não-nativas e entregam à Hsp70 (Goloubinoff & De Losrios, 2007).

Em *D. melanogaster* foram identificados cinco cópias do gene *Hsp70*, com grau de homologia superior a 75% (Lindquist & Craig, 1988; Pardue *et al.* 1992). As cópias estão localizadas em duas diferentes seções no braço **IIIR**, apresentando dois locos na seção 87A7 e três locos na seção 87C1 (Livak *et al.*, 1978).

As proteínas da família Hsp90 podem ser consideradas como "recicladoras". Suas metas são manter de forma competente o estado dobrável das proteínas até que toda a célula se recupere e torne-se capaz de fornecer a energia para o processo de redobragem. Membros desta família ligam acompanhantes de vários peptídeos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Menoret *et al.*, 1999). Estes resíduos de peptídeos, que escapam da ação proteolítica citoplasmática, podem seriamente interferir nos processos de sinalização (Blum *et al.*, 2000), e portanto, representam uma grande ameaça para a função celular.

As chaperonas da família Hsp90 estão presentes no citosol de procariotos e células eucarióticas em condições fisiológicas normais, como também, em

condições de estresse (Welch & Feramisco, 1982). Os membros da família gênica Hsp90 são conservados em bactérias, leveduras, insetos e mamíferos, tendo como principais representantes os genes *Hsp83* e *Hsr-ômega*. Esses genes são os maiores transcritos de choque térmico em *Drosophila* e são expressos constitutivamente (Frydman, 2001).

O mRNA de *Hsp83* encontra-se pronto para a tradução após o estresse (Pardue *et al.*, 1992; Vazquez *et al.*, 1993). Os transcritos de *Hsp83*, em *Drosophila*, demonstraram ser induzidos durante o desenvolvimento ovariano, onde podem ser encontrados em grande abundância em células nutricionais. Sua importância está, também, relacionada com a ação do hormônio ecdisona durante a embriogênese (Arrigo & Tanguary, 1991) e no tamponamento da variação morfológica críptica (Rutherford e Lindquist, 1998).

Em *D. melanogaster*, o gene *Hsp83* foi localizado no braço **IIIL**, seção 63B11 (Holmgren *et al.*, 1981) e o gene *Hsr-ômega*, encontra-se no braço **IIIR**, seção 93D (Pardue *et al.*, 1990).

Embora o gênero *Drosophila* seja o grupo de organismos eucariontes com o maior número de genomas sequenciados e que apresenta o maior volume de conhecimento disponível, o gênero ainda retém diversas dúvidas e controvérsias, tanto sobre a relação interna entre os subgêneros *Sophophora* e *Drosophila*, quanto sobre as relações externas com outros grupos como *Zaprionus*. Neste sentido, evidências têm se acumulado de que o gênero *Drosophila* seja um grupo parafilético, necessitando de ampla revisão taxonômica para refletir a real relação filogenética entre os grupos de espécies (Robe *et al.*, 2005; Katoh *et al.*, 2007). Assim, a ampliação da análise genômica e evolutiva destas espécies, bem como

a inclusão de outras espécies, portanto, trará novas hipóteses fundamentais para o esclarecimento das relações filogenéticas dentro deste grupo.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Geral

Inferir as relações evolutivas entre as espécies *Drosophila sturtevantii*, *D. willistoni*, *D. melanogaster*, através do mapeamento de genes evolutivamente conservados nos cromossomos politênicos de *D. sturtevantii*, para comparação evolutiva de várias espécies.

#### 3.2 Específicos

1. Preparar o fotomapa de referência para os cromossomos politênicos de *D. sturtevantii*;
2. Descrever as inversões que ocorrem na linhagem DIR;
3. Mapear por hibridização *in situ* permanente (PISH) os genes *Hsp83* e *Hsp70* em *D. sturtevantii*;
4. Comparar o posicionamento destes genes em *D. sturtevantii*, *D. willistoni* e *D. melanogaster*, levantando novos dados sobre as relações filogenéticas no subgênero *Sophophora*.



## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Linhagem utilizada, cultivo e manutenção dos estoques**

A linhagem DIR (coletada no *Campus* Dois Irmãos da UFRPE, em Recife em 2009) é cultivada em vidros tampados com rolhas de espuma, contendo o meio de cultura, onde ocorre a postura dos ovos, para a obtenção das larvas para preparações citológicas.

O meio de cultura foi preparado com farinha de milho (150g), aveia (50g), centeio (25g), fermento biológico (10g), mel (30g), banana (100g batida em 100 ml de água). Depois de misturados os ingredientes, foi feito o cozimento em forno de microondas por 15 minutos com homogeneização a cada 1 minuto. Após o cozimento foram adicionados o antifúngico Nipagin (metilparabeno, 1,5g em 30 ml de etanol) e os ácidos fosfórico e propiônico (6ml de cada, diluídos em 20ml de água destilada).

### **4.2. Tratamento das lâminas**

Nas preparações cromossômicas com coloração as lâminas foram previamente lavadas com detergente e deixadas para secar por 24 horas, protegidas de poeira. Após a secagem foram imersas em uma solução de gelatina comestível incolor em uma proporção 7,5g/L, dissolvida em água destilada. Após a secagem as lâminas gelatinadas foram armazenadas em caixas a 4°C.

As lâminas que receberam preparações cromossômicas para hibridização foram inicialmente lavadas com detergente e expostas para secar por 24 horas. Posteriormente, foram imersas em álcool 70% (TA) por 1 hora, em solução

SSC/Denhardt's a 65°C por 2 horas e 30 minutos e fixadas em etanol-acético (3:1) por 30 minutos. Depois de secas foram armazenadas a 4°C.

As lavagens das lamínulas foram feitas com detergente comercial, seguida por banho em etanol 70% contendo gotas de ácido clorídrico. Após a secagem, foram imersas em solução de silicone em proporção de 1:50, diluído em clorofórmio. Depois de nova secagem, foram armazenadas a 4°C.

#### **4.3. Preparações citológicas**

Larvas de *D. sturtevantii* no 3º estágio, ideal para a visualização dos cromossomos politênicos, foram dissecadas segurando com pinças os lados anterior e posterior do corpo (dentículos do aparelho bucal e região posterior) e puxando até retirada da porção anterior com as glândulas salivares. Depois de separadas, as glândulas foram colocadas na lâmina e adicionado fixador (3 ácido propiônico : 2 água destilada : 1 ácido láctico). Após 3 minutos o excesso de fixador foi retirado com papel filtro e adicionado o corante (Orceína 2%) por 3 minutos. O material foi esmagado e espalhado sob lamínula (Ashburner, 1967). Depois de retirado o excesso de corante das bordas, as lamínulas foram seladas com esmalte para evitar o ressecamento.

Na preparação das lâminas para hibridização foi seguida a mesma metodologia para as preparações coradas. Entretanto, foi adicionada uma gota de ácido propiônico a 45% e o fixador por 3 minutos, sem a adição do corante. Para facilitar a aderência do material cromossômico, as lâminas foram deixadas na horizontal por no mínimo 18 horas. Após este período as lamínulas foram retiradas com nitrogênio líquido, seguido por banhos de estringência, conforme

descrito em Campos *et al* (2007). Foram confeccionadas 250 lâminas sem coloração, sendo utilizadas cinco para o mapeamento de cada gene.

#### **4.3.1. Construção do fotomapa**

O fotomapa dos cromossomos politênicos de *D. suturtevantii* foi construído a partir dos cromossomos politênicos extraídos das glândulas salivares de larvas no 3º estágio. Os melhores núcleos analisados foram fotografados no Sistema de Captura Digital de Imagem IMG50® acoplado ao microscópio Leica DMLB.

Para a identificação dos braços politênicos foi utilizado inicialmente o mapa da espécie *D. prosaltans* produzido em câmara clara (Cavalcanti, 1948).

#### **4.4. Amplificação e marcação dos plasmídios**

Plasmídios pBR322 contendo fragmentos conservados dos genes *Hsp70* (Livak *et al.*, 1978) e *Hsp83* (Holmgren *et al.*, 1981), clonados a partir do genoma de *D. melanogaster*, foram obtidos dos respectivos autores. Após amplificação na bactéria *Escherichia coli* em meio LB com o antibiótico ampicilina a 100 µg/ml (Ausubel *et al.*, 2002), os plasmídios completos foram marcados com biotina, utilizando o sistema BioNick DNA (Invitrogen) e utilizados como sondas. A marcação respeitou as condições experimentais necessárias para que a maior parte dos fragmentos estivesse por volta de 500pb.

#### **4.5. Hibridização *in situ***

A hibridização *in situ* permanente (PISH) foi realizada em tampão contendo 50% de formamida, por 40h a 37°C, utilizando 500ng de DNA marcado para cada lâmina (Rieger *et al*, 2007). A revelação foi realizada com

estreptoavidina/fosfatase alcalina (SAP), azul de nitrotetrazólio (NBT) e bromo-cloro indolil fosfato (BCIP), em condições de estringência superior a 50% (SSC 2X a 37°C), conforme Silva-Valenzuela et al. (2006). As lâminas foram contra-coradas com orceína-lactoacética 2% e montadas em Entellan (Merck).

Os núcleos politênicos foram analisados individualmente, em microscópio Nikon Alphaphot-Y52 sob contraste de fase, e os sinais de hibridização foram contados e fotografados em aumento de 1000X. Foi considerado como índice consistente de marcação a presença de sinal de hibridização em pelo menos 30% dos núcleos marcados, conforme indicado por Rieger et al. (2007).

## 5. Resultados

### 5.1. Fotomapa dos cromossomos politênicos

O fotomapa dos cromossomos politênicos de *Drosophila sturtevantii* foi preparado a partir da linhagem DIR e mostra que o complemento é constituído por cinco braços eucromáticos. O fotomapa completo dos cromossomos politênicos de *D. sturtevantii* (Fig. 3) foi dividido em 100 seções, sendo entre 15 a 24 seções por braço. Todos os braços estão orientados com as regiões centroméricas para o lado esquerdo e as regiões teloméricas para o lado direito. A identificação dos braços foi baseada na tendência a permanecerem conectados e na comparação e reconhecimento das principais marcas homólogas com outras espécies.

O par I corresponde ao cromossomo **X**, que apresenta morfologia submetacêntrica, pois o braço **XL** é menor que o **XR**, sendo também o menor de todos os braços politênicos. O braço **XL** foi subdividido em 15 seções, da seção 1 a 15, apresentando como principais marcas de reconhecimento à ponta aberta e constrições evidentes nas seções 10, 11 e 13, bem como as regiões de pufes bem visualizados nas seções 3, 6, 9, 10 e 13. O braço **XR** foi subdividido em 20 seções, da seção 16 a 35 apresenta marcas bem caracterizadas e de fácil identificação. Sua ponta em forma de leque seguida de três faixas intensas (seção 35), e grandes pufes nas seções 18 e 27, sendo este o maior observado no 3º estágio. Também apresenta constrições nas seções 18 e 21. E uma sequência na seção 25 que pode ser visualizada como faixas sobressalentes na horizontal.

O cromossomo **II** apresenta-se metacêntrico, embora o braço **II<sub>L</sub>** seja levemente menor que o braço **II<sub>R</sub>**. O braço **II<sub>L</sub>** foi subdividido em 20 seções, de 36 a 55 cujas principais marcas de identificação são o grande pufe na seção 49 e outro menor na seção 45. O pufe da seção 49 é o segundo maior do 3º estágio

enquanto que o da seção 45 é arredondado com uma faixa pontilhada no centro, na região central do braço. Foram observadas constrições nas seções 39, 44 e 50. O braço **IIR** está dividido em 21 seções, da 56 a 76. Apresenta ponta em forma de bulbo com duas faixas evidentes pontilhadas, finalizando em uma constrição após uma banda forte. Entretanto, a constrição mais evidente é a da seção 65. O maior pufe do braço está localizado na seção 73.

O cromossomo **III** representa o único par acrocêntrico, sendo o maior dos braços politênicos da espécie. Está subdividido em 24 seções, da 77 a 100 e mostra ponta fusiforme. Os maiores puffes deste cromossomo são visualizados nas seções 85 e 90. A última banda da seção 83 tem aspecto pontilhado. A única constrição evidente é na seção 98.

#### **5.1.2. Ocorrência de inversões**

Duas diferentes inversões foram observadas na linhagem DIR de *D. sturtevantii* com baixa frequência no braço politênico **XL** envolvendo as seções 1 a 12 e no cromossomo **III**, entre as seções 82 a 86 (Fig. 4 e Fig. 5).

#### **5.1.3. Hibridização *in situ* permanente**

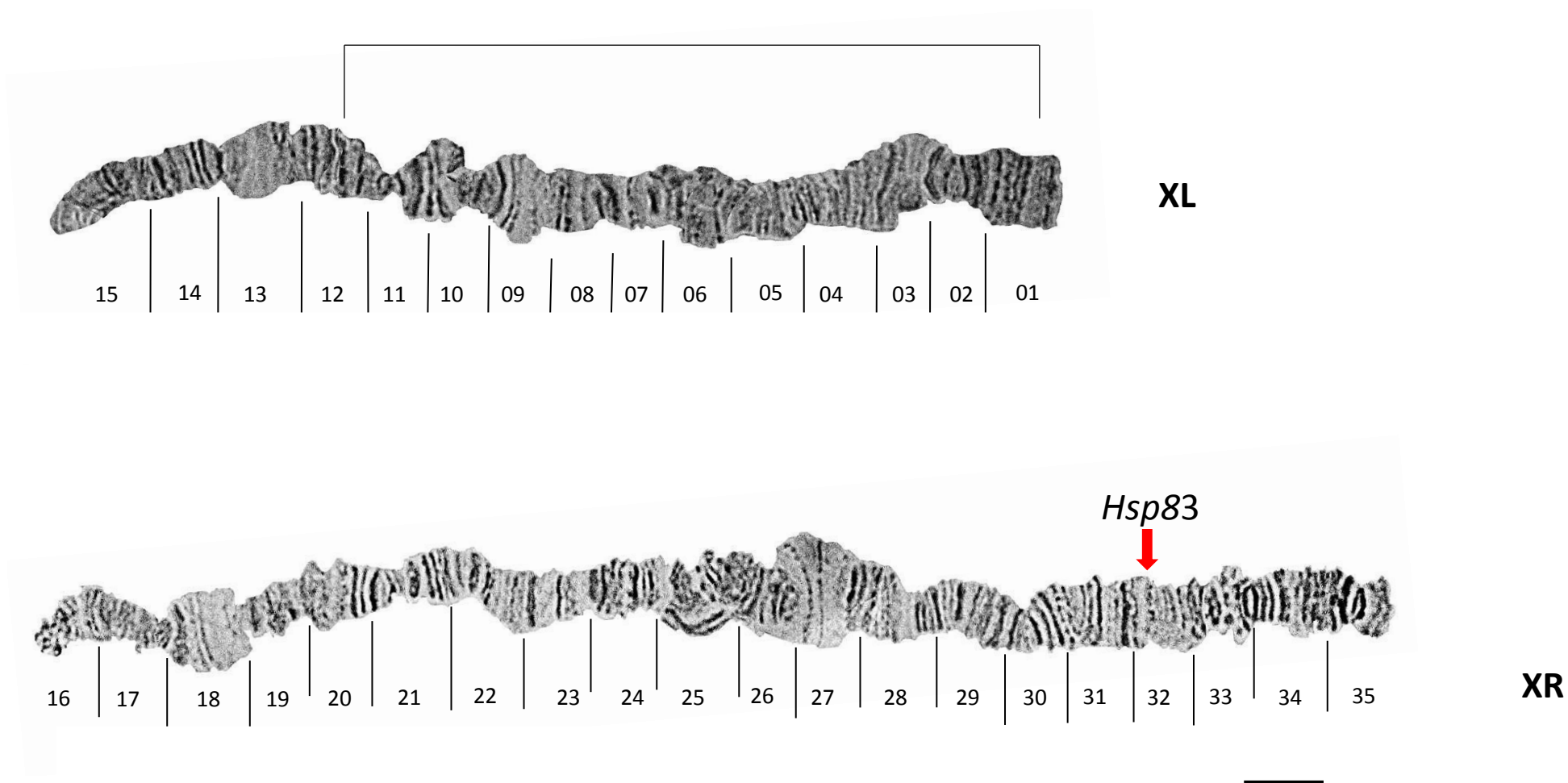
Para o gene *Hsp70* foram analisados 140 núcleos politênicos, dos quais 102 núcleos foram marcados (Tabela 2). Destes, 56 núcleos apresentaram marcas na seção 86 do braço cromossômico **III** representando 55% dos núcleos analisados (Fig. 6). Outras marcas apareceram em menor frequência em 26 núcleos, na seção 62 do cromossomo **IIR** com frequência de 25%. Em 8 núcleos

na seção 40 do cromossomo **IIIL**, com frequência de 8%. E em 12 núcleos na seção 30 do braço **XL**, com frequência de 12%.

Na hibridização do gene *Hsp83* foram analisados 98 núcleos, dos quais 45 núcleos estavam marcados (Tabela 2). Destes em 28 núcleos foi possível identificar a localização do sinal de hibridização, observado na seção 32 do braço cromossômico **XR**, representando 62% (Fig. 7). Outras marcações com frequências menores foram identificadas, em 7 núcleos, na seção 70 do braços **IIR** com frequência de 15%. Em 5 núcleos, na seção 40 do braço **IIIL** e na seção 81 do cromossomo **III** ambas com frequência de 11%.

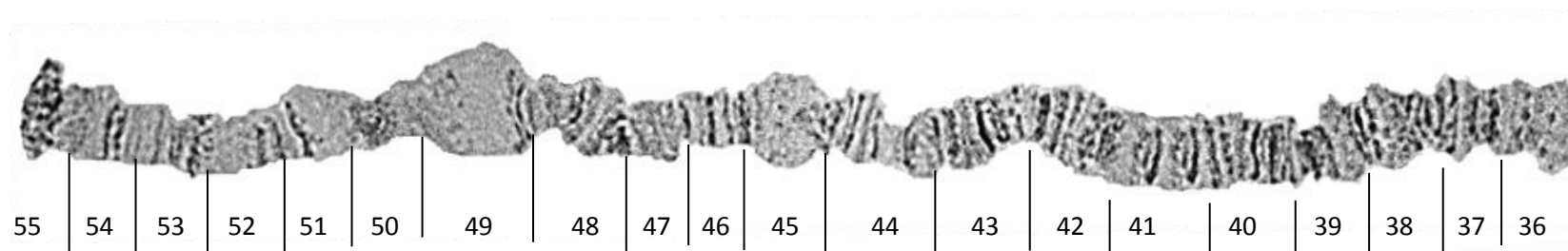
Tabela 2. Frequência de localização dos genes *Hsp70* e *Hsp83* nos cromossomos politênicos de *Drosophila strutevanti*. N = total de núcleos politênicos com marcação identificada.

<b>Genes</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Seção</b>	<b>N</b>	<b>Frequência</b>
<b><i>Hsp70</i></b>			<b>102</b>	
	III	86	56	54,90%
	IIR	62	26	25,49%
	IIIL	40	8	7,84%
	XR	30	12	11,76%
<b><i>Hsp83</i></b>			<b>45</b>	
	XR	32	28	62,22%
	IIR	70	7	15,55%
	IIIL	40	5	11,11%
	III	81	5	11,11%

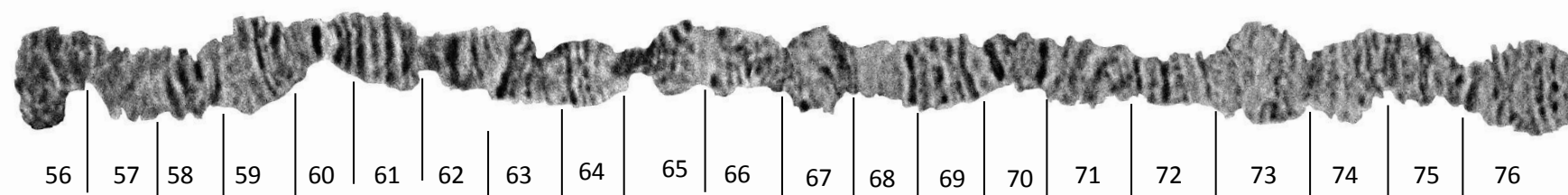


**Figura 3** – Fotomapa dos cromossomos politênicos de *Drosophila sturtevantii*, linhagem DIR. Os centrômeros estão voltados à esquerda. Linhas contínuas indicam extensões de inversões encontradas na linhagem. Escala: 10µm

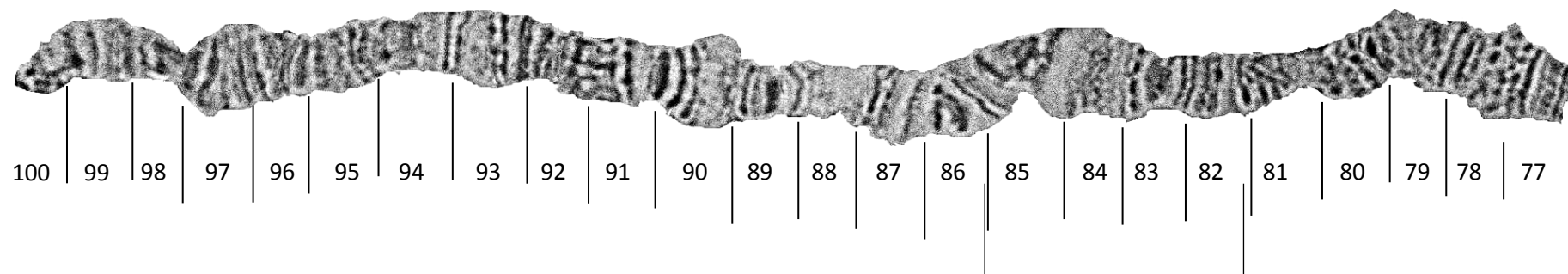




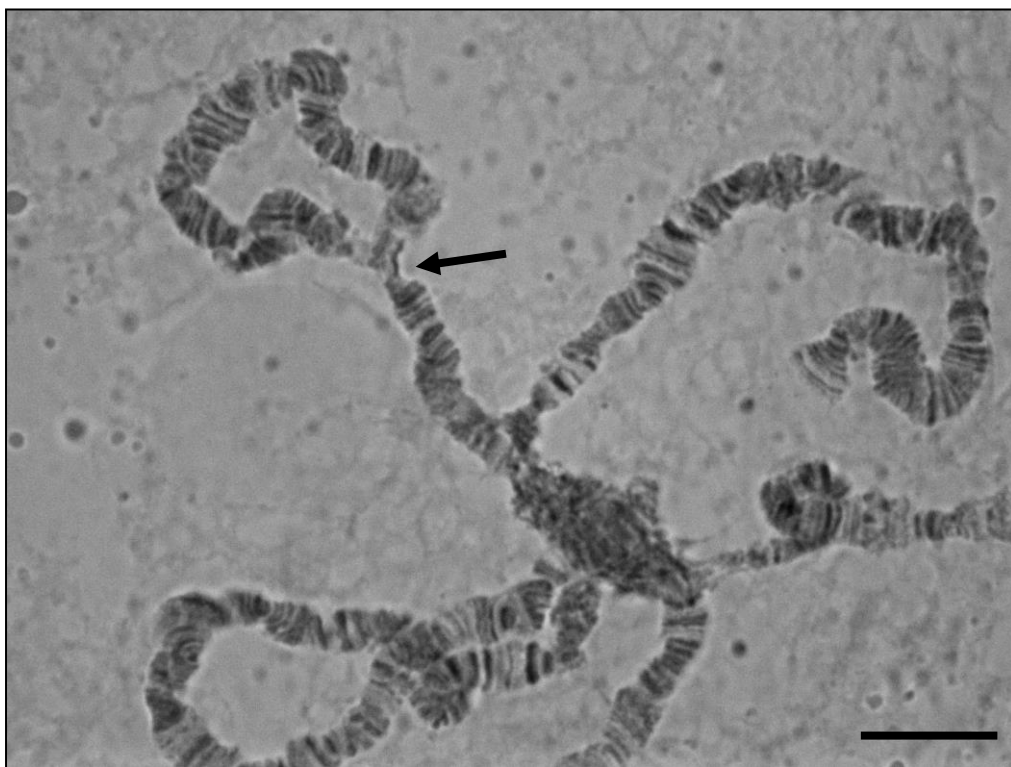
**IIL**



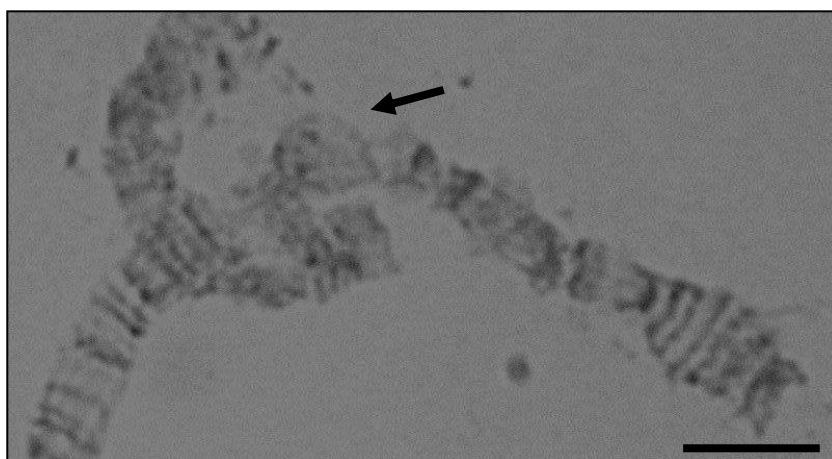
**IIR**



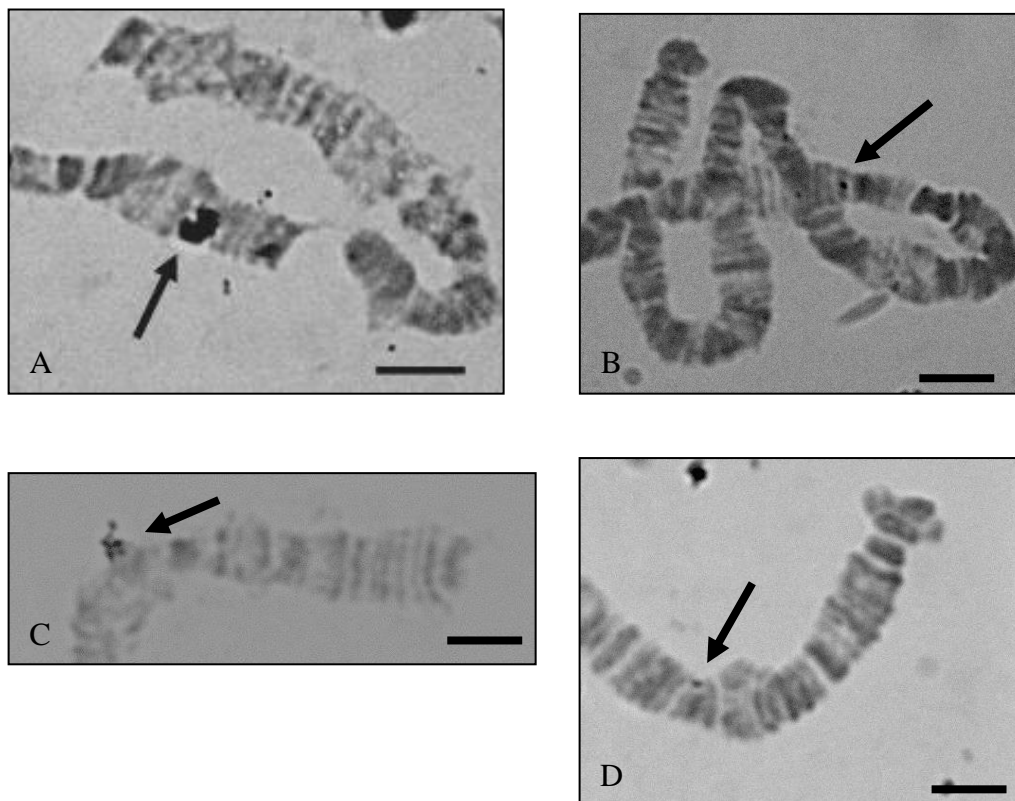
**III**



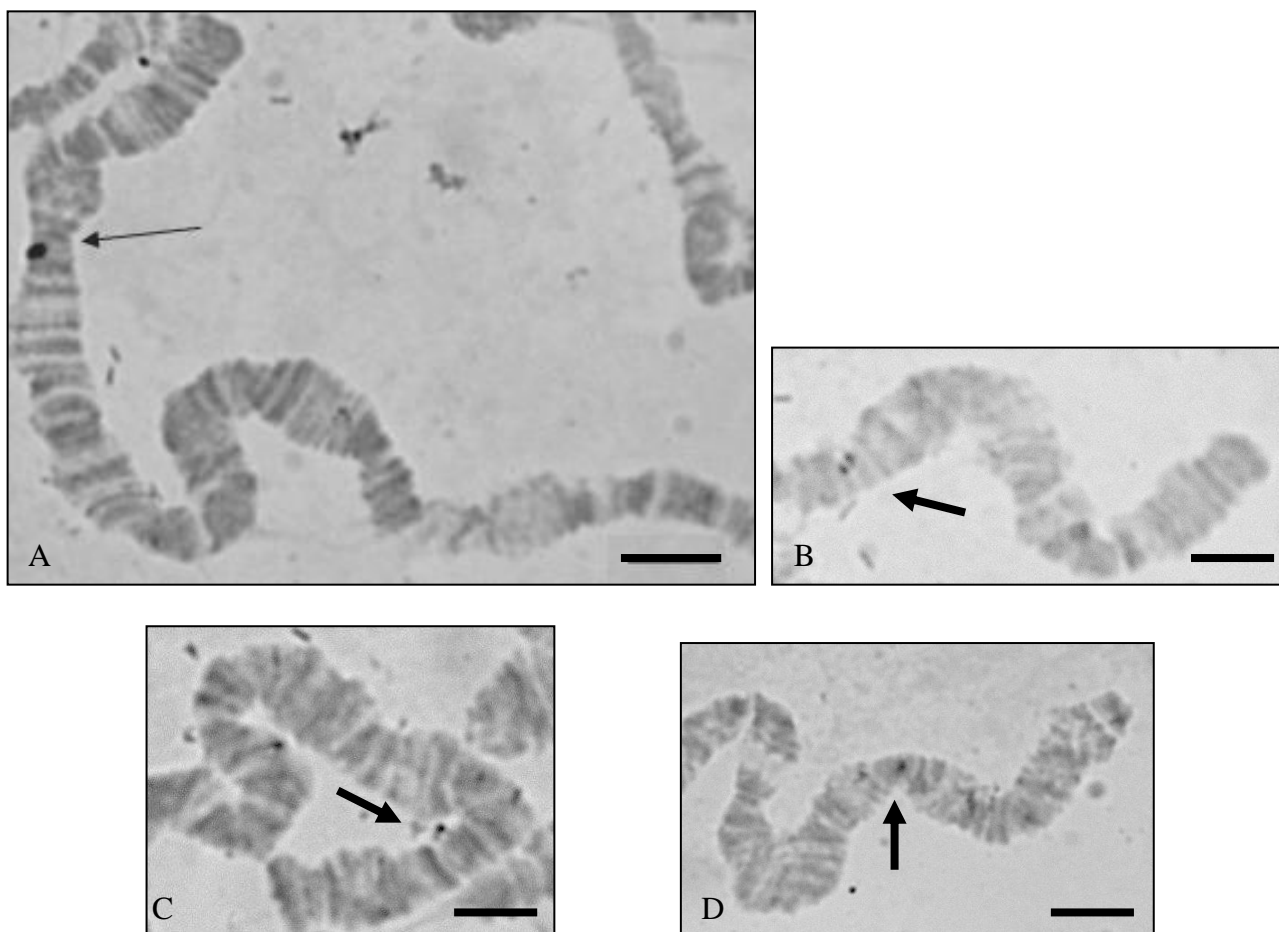
**Figura 4** – Inversão detectada no braço **XL** de *D. sturtevantii* – Linhagem DIR, envolvendo as seções 1 a 12 (seta). Escala: 10µm



**Figura 5**– Inversão observada no braço **III** de *D. sturtevantii* – Linhagem DIR, envolvendo as seções 82 a 86 (seta). Escala: 10µm



**Figura 6** - Marcação (seta) da sonda do gene *Hsp70* na seção 86 do braço **III** (A), seção 62 do cromossomo **IIR** (B), seção 40 do cromossomo **IIL** (C) e seção 30 do braço **XL** (D) de *Drosophila sturtevantii*. Escala: 10μm.



**Figura 7** - Sinal da sonda do gene *Hsp83* na seção 32 (seta) do braço **XR** (A), na seção 70 do braço **IIR** (B), na seção 40 do braço **IIL**(C) e na seção 81 do cromossomo **III** (D) de *Drosophila sturtevantii*. Escala: 10μm

## 6. Discussão

### 6.1. Fotomapa e caracterização cariotípica de *D. sturtevantii*

Após o desenvolvimento da técnica de espalhamento dos cromossomos politênicos (Painter, 1933), a construção do mapa cromossômico de *Drosophila melanogaster* por Bridges (1935) estabeleceu um padrão para os mapas dos politênicos, dividindo os seis braços da espécie em 102 seções (Zhimulev, 1996). Desde então, foram preparados mapas politênicos para grande número de espécies de *Drosophila* (Sorsa, 1988), cuja importância se mantém atualmente, tendo sido utilizados no programa de sequenciamento genômico de várias espécies de *Drosophila* (Clark *et al.*, 2007; Bhutkar *et al.*, 2008; Schaeffer *et al.*, 2008).

A confecção do fotomapa para os cromossomos politênicos de *Drosophila sturtevantii* permite caracterizar a espécie por meio citogenético, tornando mais fácil a identificação do complemento cromossômico. Os mapas de cromossomos politênicos permitem relacionar os mapas físicos e genéticos e, ainda, podem ser úteis na identificação de rearranjos cromossômicos, de modo que será possível fazer inferências evolutivas e/ou filogenéticas, através da comparação com outras espécies (Sperlich & Pfriem, 1986; Anderson *et al.*, 1991; Krimbas & Powell, 1992).

A espécie *D. sturtevantii* tem sido pouco estudada do ponto de vista citogenético, possivelmente devido ao grande enovelamento e à relativa fragilidade dos braços cromossômicos, que costumam se fragmentar facilmente, de maneira similar ao que ocorre com *D. prosaltans* (Cavalcanti, 1948). A confecção do fotomapa coloca a espécie em outro nível citogenético,

possibilitando o início de esclarecimento da sua história evolutiva dentro do grupo *saltans*. Uma das aplicações do fotomapa é a utilização para mostrar a posição de genes localizados através da técnica de hibridização *in situ*. Da mesma forma, tornam-se uma ótima ferramenta para um futuro programa de sequenciamento genômico ou de genes interesse (Aggarwal *et al.*, 2009; Andreyenkova *et al.*, 2009; Schemerhorn *et al.*, 2009).

O fotomapa de *D. sturtevantii* apresenta cinco braços politênicos, similar a *D. prosaltans*, embora a morfologia cromossômica seja divergente entre as duas espécies. A principal divergência é que em *D. sturtevantii* o cromossomo **X** é submetacêntrico, sendo o braço **XL** claramente menor que o **XR**, enquanto em *D. prosaltans* o cromossomo **X** foi descrito como metacêntrico (Cavalcanti, 1948).

Não foi encontrado em *D. sturtevantii* um elemento cromossômico pontual livre, correspondente ao elemento **F** de Muller, de modo similar ao descrito para *D. prosaltans* (Cavalcanti, 1948) e para o grupo *willistoni* (Schaeffer *et al.*, 2008). Este fato sugere que a fusão do elemento **F** com **E**, descrito para o grupo *willistoni*, pode ter ocorrido antes da divergência entre os grupos *saltans* e *willistoni*.

## 6.2. Ocorrência de Inversões

A linhagem DIR de *D. sturtevantii* foi escolhida para confecção do fotomapa por apresentar poucas inversões. Não é estranho que entre as duas inversões paracêntricas relatadas uma ocorra no cromossomo **III**, pois, Kobayashi e Bicudo (1997) analisando 37 linhagens relataram a ocorrência de 18 diferentes inversões paracêntricas no cromossomo **III**. Na linhagem DIR, pode-se, também relatar uma nova inversão paracêntrica ocorrida no braço politênico **XL**.

### 6.3. Localização de genes por hibridização *in situ*

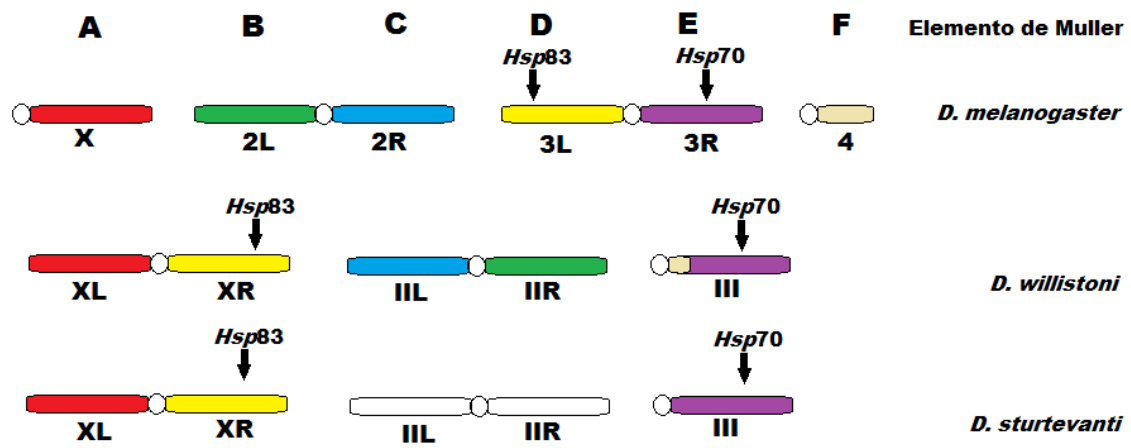
A localização do gene *Hsp70* na seção 86 do cromossomo **III** indica sua correspondência deste com o elemento **E** de Muller (Fig. 8). Em *D. willistoni* o gene *Hsp70* está localizado no cromossomo **III** também correspondente ao elemento **E** (Bonorino *et al.*, 1993), da mesma maneira que em *D. melanogaster* o gene está localizado no braço **IIIR**, que corresponde ao elemento **E** de Muller (Livak *et al.*, 1978). A localização do gene *Hsp83* em *D. sturtevantii* encontra-se na seção 32 do braço cromossômico **XR**, indicando que corresponde ao elemento **D** de Muller (Fig. 8). Em *D. willistoni* o gene *Hsp83* está localizado no braço **XR**, que corresponde ao elemento **D** de Muller (Schaeffer *et al.*, 2008). Em *D. melanogaster* este gene está localizado no braço **IIIL**, que corresponde ao Elemento **D** (Holmgren *et al.*, 1981).

Considerando a relação evolutiva próxima, já que são considerados grupos irmãos na base da filogenia do subgênero *Sophophora* (Robe *et al.*, 2005), os grupos *willistoni* e *saltans* apresentam estrutura e morfologia cromossômica muito similares. O cariótipo mitótico de ambos os grupos é composto por dois pares aproximadamente, submetacêntricos, correspondentes aos cromossomos **X** e **II** e um par acrocêntrico correspondente ao cromossomo **III** (Cavalcanti, 1948; Schaeffer *et al.*, 2008). Os braços **XL** e **XR** seriam homólogos aos elementos de Muller **A** e **D**, respectivamente, os braços **IIR** e **IIL** homólogos aos elementos **B** e **C**, também respectivamente, e o cromossomo **III** homólogo ao elemento **E**, em cuja base estaria fusionado o elemento **F** (Schaeffer *et al.*, 2008). Desta maneira, pode ser inferido que em *D. sturtevantii* ocorreu o mesmo evento que proporcionou a reorganização cromossômica observada em *D. willistoni*, provavelmente antes da diferenciação dos grupos *willistoni* e *saltans*.



Para o grupo *saltans* a construção do fotomapa e o mapeamento por hibridização *in situ* dos genes *Hsp70* e *Hsp83* do presente trabalho são pioneiros. Uma vez que o elemento **F** deve estar fusionado a outro, possivelmente ao **E** e que foram identificados os elementos **D (XR)** e **E (III)**, falta identificar os braços cromossômicos de *D. sturtevantii* correspondente aos elementos **A**, **B** e **C**. Já que o braço **XL** de *D. willistoni* corresponde ao elemento **A**, o mesmo pode ser sugerido para o braço **XL** de *D. sturtevantii*. A hibridização de outros genes deverá definir a correspondência dos braços **IIL** e **IIR** de *D. sturtevantii* com os elementos de Muller.

É de grande relevância a continuidade da hibridização de genes em *D. sturtevantii*, visando estender os resultados obtidos com estes genes. Além da confirmação dos elementos de Muller, poderá ser verificada a extensão dos possíveis rearranjos cromossômicos ocorridos no grupo *saltans*. Por fim, a localização de vários genes indicará a extensão da sintenia gênica que ocorre entre os grupos *saltans* e *willistoni*, bem como com outras espécies de drosofilídeos, proporcionando robustez para esclarecer os rearranjos que aconteceram na divergência entre os grupos.



**Figura 8.** Relação de homologia entre os elementos cromossômicos de *D. sturtevantii*, *D. willistoni* e *D. melanogaster* e sua relação com os elementos de Muller (Fontes: Schaeffer *et al.*, 2008 e presente trabalho).

## 7. Conclusões

1. A construção do fotomapa da linhagem DIR de *Drosophila sturtevantii* possibilita seu uso como padrão de identificação dos braços cromossômicos e pontos de quebras de inversões;
2. As inversões paracêntricas identificadas na linhagem DIR *D. sturtevantii* foram encontradas no braço **XL** e no cromossomo **III**;
3. Na linhagem DIR de *D. sturtevantii*, os genes *Hsp70* e *Hsp83* estão localizados respectivamente, no braço **III** que corresponde ao elemento **E** de Muller e **XR** que corresponde ao elemento **D**;
4. A organização cromossômica de *D. sturtevantii* assemelha-se à de *D. prosaltans* e de *D. willistoni*, indicando que os principais rearranjos cromossômicos entre os grupos *saltans* e *willistoni* ocorreram anteriormente à sua divergência.

## 8. Referências Bibliográficas

- Aggarwal R, Benatti TR, Gill N, Zhao C, Chen MS., Fellers JP & Stuart JJ. (2009). A BAC-based physical map of the Hessian fly genome anchored to polytene chromosomes. *BMC genomics*, 10(1), 293.
- Almeida LM, Langeani F, Carareto CMA (2003). Geographic polymorphism of P element in populations of *Drosophila sturtevantii*. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 175-179.
- Anderson WW, Arnold J, Baldwin DG, Beckenbach AT, Brown CJ, Bryant SH, Coyne JA, Harshman LG, Heed WB, Jeffrey DE, Klaczko LB, Moore BC, Porter JM, Powell JR, Prout T, Schaeffer SW, Stephens JC, Taylor CE, Turner ME, Williams GO, Moore JA (1991). Four decades of inversion polymorphism in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci* 88: 10367-10371.
- Andreyenkova NG, Kokoza EB, Semeshin VF, Belyaeva ES, Demakov SA, Pindyurin AV, Andreyeva EN, Volkova EI, Zhimulev IF (2009). *Chromosoma* 118: 747-761.
- Arrigo AP & Tanguay, RM.(1991) Expression of heat shock proteins during development in *Drosophila*. In: Hightower L and Nover L. (Eds.), Heat shock and development. Springer-Verlag, Berlin. P. 106-119.
- Ashburner M.: Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. (1967) I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma (Berl.)* 21, 398–428.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2002). Short Protocols in Molecular Biology, 1512 pages, 2º Vol., John Wiley & Sons. 2002.
- Bächli G (2013) TaxoDros: The Database on Taxonomy of Drosophilidae, v.1.03, Database 20013/01. <http://taxodros.unizh.ch/>.
- Behura SK, and WD Severson. (2011) Coadaptation of isoacceptor tRNA genes and codon usage bias for translation efficiency in *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Insect molecular biology* 20.2: 177-187.
- Benedict MQ, Cockburn AF. and Seawright JA. (1993) The Hsp70 heat-shock gene family of the mosquito *Anopheles albimanus*. *Insect molecular biology* 2.2: 93-102.
- Bicudo HEMC (1979). Reproductive isolations in the saltans group of *Drosophila*. IV. The sturtevantii subgroup. *Rev. Brasil. Genet*, 4: 247-258.
- Bonorino CB, Pereira M, Alonso CEV, Valente VLS and Abdllhay E (1993) In situ mapping of the Hsp70 locus in seven species of the *willistoni* group of *Drosophila*. *Rev Brasil Genetic* 16:561-571.
- Blum JH, Dove SL, Hochschild A and Mekalanos J. (2000) Isolation of peptide aptamers that inhibit intracellular processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2241–2246.
- Bhutkar A, Schaeffer SW, Russo SM, Xu M, Smith TF and Gelbart WM (2008) Chromosomal Rearrangement Inferred From Comparisons of 12 *Drosophila* Genomes. *Genetics* July 2008 vol. 179 no. 31657-1680
- Brown SE & Knudson DL (1997) FISH landmarks for *Aedes aegypti* chromosomes. *Insect Mol. Biol* 6:197-202.
- Bridges CB. (1935). Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Heredity*, 26(2), 60-64.

- Buzzi ZJ & RD Miyazaki. (2002). Entomologia Didática. 3ª. ed. Curitiba, Editora da UFPR, 306p.
- Campos SRSLC, Rieger TT, Santos JF (2007). Homology of polytene elements between *Drosophila* and *Zaprionus* determined by *in situ* hybridization in *Z. indianus*. Genet Mol Res 6 (2): 162 -176.
- Castro JP, Carareto CMA (2004). Characterization of two full-sized P elements from *Drosophila sturtevantii* and *Drosophila prosaltans*. Genetics and Molecular Biology, 27, 3, 373-377.
- Cavalcanti AGL (1948) Geographic variation of chromosome structure in *Drosophila prosaltans* genetics 3 3: 529.
- Clark AG, Garcia, ACL., Rieger TT, Rohde C, Valente VLS (2007) *Drosophila* 12 Genomes Consortium: Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. Nature, 450: 203-215.
- Craig EA, Gross, CA (1991). Is hsp70 the cellular thermometer? Trends Biochem 16: 135-139.
- Dobzhansky Th & Pavan C (1943). Chromosome complements of some south-brazilian species of *Drosophila*. Proc. N. A. S. vol. 29: 368-375.
- Feige U. & van Eden W.. (1996). Infection, autoimmunity and autoimmune disease. Stress Inducible Cellular Responses 77: 359–373.
- Frydman J (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. Annu. Rev. Biochem. 70: 603–649
- Goloubinoff P, De Los Rios P (2007). The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. Trends in biochemical sciences 32: 372-380.
- Griffiths GCD. (1996) Review of papers on the male genitalia of Diptera by D.M. Wood and associates. Studia Dipterologica, 3, 107–123.
- Hahn WM, Han MV & Sang-Gook H. (2007): Gene family evolution across 12 *Drosophila* genomes. PLoS Genetics 3.11 e197.
- Hartl F U & Hayer-Hartl M (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science 295: 1852–1858.
- Heckel DG. (1993) Comparative genetic linkage mapping in insects. Annual review of entomology 38.1: 381-408.
- Holmgren R, Corces V, Morimoto R, Blackman R, Meselson M (1981) Sequence homologies in the 5' regions of four *Drosophila* heat shock genes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v.78, p. 3775-3778.
- Jäättelä M, Wissing D. (1992) Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. Ann Med; 24:249-58.
- Jakob U, Gaestel M, Engel K. and Buchner J. (1993) J. Biol. Chem., 268, 1517-1520.
- Kampinga, HH & Craig EA. (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. Nature reviews Molecular cell biology 11.8: 579-592.
- Katoh T, Nakaya D, Tamura K, & Aotsuka T. (2007). Phylogeny of the *Drosophila immigrans* species group (Diptera: Drosophilidae) based on Adh and Gpdh sequences. Zoological Science, 24(9), 913-921.
- Kitching RL, Bickel DJ & Boulter S. (2005) Guild analyses of dipteran assemblages, a rationale and investigation of seasonality and stratification in selected rainforest faunas. In D.K. Yeates and B.M. Wiegmann, eds, The Evolutionary Biology of Flies. New York: Columbia University Press, pp. 388–415.

- Kim KK, Kim R and Kim SH. (1998). Crystal structure of a small heat shock protein. *Nature* 394, 595–599.
- Kobayashi MK & Bicudo HE (1997). Inversion polymorphism in laboratory strains and natural samples of *Drosophila sturtevantii* (saltans group, sturtevantii subgroup). *Cytobios*, 89:7-20.
- Krimbas CB & Powell JR (2000). Inversion polymorphism in *Drosophila*. In: Singh RS, Krimbas CB (eds) *Evolutionary genetics: from molecules to morphology*. v. 1. Cambridge University Press 2000, pp 284-299.
- Kukalova-Peck J. (1991) Fossil history and the evolution of hexapod structures. In *The Insects of Australia*, Melbourne: Melbourne University Press, CSIRO, pp. 141–79
- Kumar V & Collins FH. (1994) A technique for nucleic acid in situ hybridization to polytene chromosomes of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect molecular biology* 3.1: 41-47.
- Lancellotti CLP, Levi JE, Silva MALG, Schwarzschild M, SM, Nicolau. (2000) Diagnóstico laboratorial. In: Carvalho JJM, Oyakama N. Focchi J, editores. I Consenso Brasileiro de HPV-Papilomavírus Humano. 1ª ed. São Paulo: BG Cultural. p.45-60.
- Lee RE & Denlinger DL. (1991). *Insects at low temperatures*. Chapman & Hall.
- Lindquist & Craig EA. (1988) The heat-shock proteins. *Annu.Rev. Genet.* 22: 631–678.
- Livak KJ, Freund R, Schwebwe M, Wensink PC, Meselson M (1978) Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proceeding National Academy of Sciences USA*. 11:5613 – 5617.
- Locke M, Noble EG and Atkinson BG. (1990). Exercising mammals synthesize stress proteins. *American Journal of Physiology* 258, C723—729.
- Magalhães LE. (1956) Description of four new species of the " saltans" group of *Drosophila* (Diptera). *Rev. Bras. Biol* 16 273-280.
- Magalhães LE & Bjornberg AJS. (1957) Estudo da genitália masculina de 'Drosophila' do grupo 'saltans' (Diptera). *Revista Brasileira de Biologia* 17: 435-450.
- Markow TA, O'Grady PM (2006) *Drosophila: A guide to specie identification and use*. Elsevier, pp 259
- McAlpine PJ, Shows TB, Boucheix C, Stranc, LC, Berent TG, Pakstis AJ & Doute RC. (1989). Report of the nomenclature committee and the 1989 catalog of mapped genes (Part 1 of 3). *Cytogenetic and Genome Research*, 51(1-4), 13-30.
- Menoret A, Peng P. and Srivastava PK. (1999) Association of peptides with heat shock protein gp96 occurs in vivo and not after cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 262, 813–818.
- Merritt RW, Courtney GW and Keiper JB. (2003) *Diptera* (Flies, Mosquitoes, Midges, Gnats). In V.H. Resh and R.T. Cardé, eds, *Encyclopedia of Insects*. Academic Press, San Diego CA, USA, pp. 324–340.
- Mourão CA and Bicudo HEMC (1967). Duas novas espécies de *Drosophila* do grupo "saltans" (Drosophilidae, Diptera). *Papeis Avulsos de Zoologia*, 20: 123-134
- Muller HJ. (1940) Bearing of the *Drosophila* work on systematics. *The new systematics* 185-268.

- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA, O'Brien SJ (2001) Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature*, 409:614-618.
- Neto JMFA, Pereira-da-Silva L & Vaz DM (2008) Heat Shock Proteins as Oxidative Stress Markers in Rats Submitted to Exhaustive Intermittent Running Training. *Brazilian Journal of Biomotricity*, 160-175
- Nover & Scharf KD. (1991) Heat Shock proteins. In: Nover L (ed) Heat Shock response. CRC, Boca Raton, pp 5-40.
- Novikov DV, Kireev I, & Belmont AS. (2007). High-pressure treatment of polytene chromosomes improves structural resolution. *Nature Methods*, 4(6), 483-485.
- O'grady P, Clark JB and Kiwell MG. (1998) Phylogeny of the *Drosophila saltans* species group based on combined analysis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol Biol. Evol.*, 15 (6): 656-664.
- Painter T S. (1933) A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science* 78, 585–586.
- Pardue ML, Ballinger DG and Hogan NC. (1992) The heat shock response. Cells coping with transient stress. *Annals New York Acad. Sci.*, v.663, p. 125-138.
- Pardue ML, Bendena WG, Fini ME, Garbe JC, Hogan NC and Traverse KL (1990) Hsr – omega, a novel gene encoded by *Drosophila* heat shock response in *Drosophila*. *Experientia* 48:623 – 628.
- Peetermans WE (1995). Heat shock proteins in medicine. *Acta Clin Belg*; 50:131-6.
- Powell JR (1997). Progress and Prospects in Evolutionary Biology. The *Drosophila* Model. Oxford University Press, New York
- Powell JR, Sezzi E, Moriyama EN, Gleason JM, Caccone A. (2003) Analysis of a Shift in Codon Usage in *Drosophila* *J Mol Evol.*, 57:S214–S225
- Procunier WS, Smith JJ (1993) Localization of ribosomal DNA in *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) by in situ hybridization. *Insect Mol Biol* 2: 163-174.
- Richter-Landsberg C & Goldbaum O. (2003) Stress proteins in neural cells: functional roles in health and disease, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 337-349 1420-682X/03/020337-13.
- Rieger TT; Silva SVOE; Pacheco IA; Chagas BS. Santos JF. (2007) Localization of HSP single-copy genes by inexpensive, permanent non-fluorescent in situ hybridization on meiotic chromosomes of the grasshopper *Schistocerca pallens* (Acrididae). *Genetics and Molecular Research*, v. 6, p. 643-649.
- Robe LJ, Valente VLS, Budnik M, Loreto ELS (2005) Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36, 623–640
- Rohde C & Valente VLS (2012) Three decades of studies on chromosomal polymorphism of *Drosophila willistoni* and description of fifty different rearrangements *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4 (suppl), 966-979
- Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C. and Gaestel M. (1999). Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor  $\alpha$  by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 18947-18956.
- Rutherford SL. & Lindquist, S. (1998) Hsp90 as capacitor for morphological evolution. *Nature*, v. 396, p. 336-342.

- Samali, A & Orrenius, S. (1998) Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress & Chaperones*, v. 3, p. 228-236.
- Schaeffer SW, Rohde C, Valente VIS, Garcia ACL, Rieger TT. (2008). Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics*. 179: 1601-1655.
- Schemerhorn BJ, Crane YM, Morton PK, Aggarwal R & Benatti T. (2009). Localization and characterization of 170 BAC-derived clones and mapping of 94 microsatellites in the Hessian fly. *Journal of Heredity*, 100(6), 790-797.
- Segarra C. Lozovskaya ER, Ribó G, Agauadé M, Hartl DL. (1995) P1 clones from *Drosophila melanogaster* as markers to study the chromosomal evolution of Muller's A element in two species of the *obscura* group of *Drosophila*. *Chromosoma*, 104:129 – 136.
- Silva JC & Kidwell MG (2004). Evolution of P Elements in Natural Populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii*. *Genetics*, 168: 1323–1335.
- Silva-Valenzuela MG, Almeida FCS, Matizonkas-Antonio LF, Libório TN, Acquafreda T, Cazal C, Ferraz A, Nunes, FD (2006) Hibridização in situ com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. *J Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 42, nº 3, p. 207-213.
- Sorsa V (1988). *Chromosome maps of Drosophila*, vol I, CRC Press Inc, Boca Raton.
- Sperlich D & Pfriem P (1986). Chromosomal polymorphism in natural and experimental populations. In: Ashburner M, Carson HL, Thompson Jr, JN (eds) *The genetics and biology of Drosophila*. v.3a. Academic Press, New York, pp 123-168.
- Sturtevant AH (1939) On the subdivision of the genus *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 25:137-141.
- Thompson FC (ed) (2005) *Biosystematic Database of World Diptera*. <http://www.diptera.org/biosys.htm>.
- Throckmorton LH. (1975). The phylogeny, ecology and geography of *Drosophila*. In: King, R.C. (Ed.), *Handbook of Genetics*. Plenum, New York, pp. 421–469.
- Tsai MJ & O Malley BW. (1991). Mechanisms of regulation of gene transcription by steroid receptors. In: Cohen, P.; Foulkes, J.G. (eds), *The hormonal control regulation of gene transcription*. Elsevier Science Publishers, 101-116. pp.
- Van Eden W. & Young DB. (1996) *Stress proteins in medicine*. Informa Healthcare.
- Vazquez J, Pauli D and Tissieres A. (1993) Transcriptional regulation in *Drosophila* during heat shock: a nuclear run-on analysis. *Chromosoma*, v.102, p. 223-248.
- Villa LL. (2000) *Biologia Molecular: conceitos e princípios básicos*. In: Martins NV, Pereyra EG, editores. *Conhecendo o HPV: patologia do trato genital inferior, colposcopia e cirurgia de alta frequência*. 1a ed. São Paulo: Frôntis Editorial;. p.137-44.
- Welch WJ. (1993) How cells respond to stress. *Scientific American*, v. 268, p. 34-41.
- Wheeler, M.R., (1981). The Drosophilidae: a taxonomic overview. In: Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson, J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, Orlando, pp. 1–97.
- Wheeler MR (1986) Additions to the catalog of the world's Drosophilidae. In: Ashburner M, Thompson JN, Carson HL (eds) *The genetics and biology of Drosophila*. Academic Press, London, pp 395-409.



- Welch WJ & Feramisco JR. (1982). Purification of the major mammalian heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 257(24), 14949-14959.
- Yeates, DK, Wiegmann, BM (1999). Congruence and controversy: toward a higher-level phylogeny of Diptera. *Annu. Rev. Entomol.*44, 397–428.
- Yeates DK, Wiegmann BM (2005) Phylogeny and Evolution of Diptera: Recent insights and new perspectives. In: Yeates DK, Wiegmann BM (eds) *The evolutionary biology of flies*. Columbia University Press, New York, pp 14-44.
- Yellon DM & Marber MS. (1994). Hsp70 in myocardial ischaemia. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 50(11), 1075-1084.
- Zhao JT, Frommer M, Zhimulev JA, Zacharopoulou A (1998). Mitotic and polytene chromosome analyses in the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 41: 510-526.
- Zhimulëv I.F. (1996). Morphology and structure of polytene chromosomes. *Advances in genetics*, 34, 1-490.
- Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME and Hendrickson WA (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606–1614.