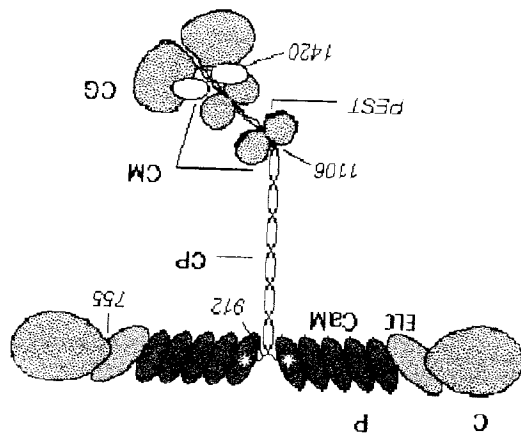


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

# ESTUDO DA MIOSINA-V DE CÉREBRO DE *ABELHA APIS MELLIFERA* E DE ALGUNS VERTEBRADOS



RENATA ROLAND TEIXEIRA

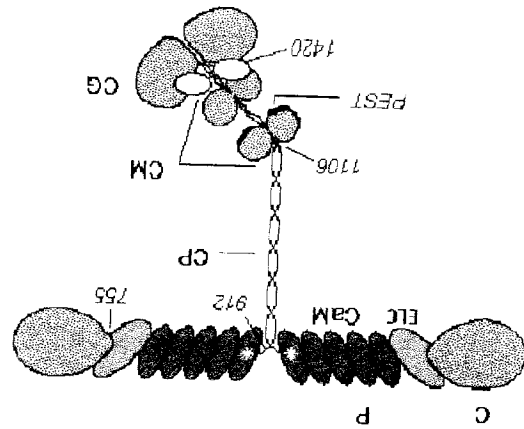
PROF. DR. FOUED SALMEN ESPINDOLA

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia - MG  
Dezembro - 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

# ESTUDO DA MIOSINA-V DE CÉREBRO DE *ABELHA APIS MELLIFERA* E DE ALGUNS VERTEBRADOS



RENATA ROLAND TEIXEIRA

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas

Uberlândia - MG  
Dezembro - 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DA MIOSINA-V DE CÉREBRO DE  
ABELHA *APIS MELLIFERA* E DE ALGUNS  
VERTebrADOS**

RENATA ROLAND TEIXEIRA

Aprovado pela Banca Examinadora em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Nota \_\_\_\_

LABORATÓRIO DE GENÉTICA E  
EVOLUÇÃO DE ANIMAIS  
Prof. Dr. Foued Sahen Espindola  
Mestrado em Genética e Evolução  
Mestrado em Genética e Evolução

Profa. Dra. Maria de Fátima Rodrigues da Silva

Ms. Leonardo Gomes Peixoto

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 2004.

Aos meus PAIS,  
Hugo Tormin Teixeira e Olívia Aparecida Roland,  
pelo amor, compreensão e apoio.  
Acompanharam-me desde meus primeiros passos,  
me entregaram ao mundo e hoje,  
podem ver os frutos da minha caminhada...  
Muito OBRIGADAAA!!!

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, presente em minha vida em todos os momentos, dando-me persistência e coragem para desafiar e descobrir meus próprios limites;

Aos **meus pais**, pelo amor, paciência, incentivo e compreensão da minha ausência em muitos momentos;

À **minha irmã**, que eu amo e que esteve comigo compartilhando de um modo ou de outro todos os momentos pelos quais passei... alegrias, tristezas, angústias, risos e palhaçadas;

À **minha família**, que sempre esteve torcendo e rezando por mim;

Ao **Jean**, amigo e amado, companheiro e confiante com o qual compartilhei a alegria de minhas conquistas, as dúvidas e incertezas da vida e vivenciei a felicidade de descobrir o que é amar e ser amada;

Ao **Prof. Dr. Foued Salmen Espindola**, pela confiança e oportunidade de aprender, persistir e conquistar;

À **Prof. Dr.ª Maria de Fátima Rodrigues da Silva**, por me ensinar muito do que eu sei hoje e me mostrar o que é uma rotina de laboratório;

Aos **técnicos e principalmente a Maura**, por facilitarem a minha formação auxiliando da melhor forma possível;

À **Universidade Federal de Uberlândia e seus funcionários**, por me auxiliar na minha formação acadêmica;

Aos **Institutos de Biologia e de Genética e Bioquímica**, por oferecerem recursos para completar e complementar a minha formação acadêmica;

À **FAPEMIG (013/2004)**; pela bolsa de iniciação científica;

Ao **Prof. Dr. Roy Larson**, pela gentileza de receber-me em seu laboratório;

À **Ms. Hellen**, por me ajudar em Ribeirão Preto e não medir esforços para a realização de parte do meu trabalho;

Aos amigos **Pablo Marco Veras Peixoto, Maria de Fátima Rodrigues da Silva, Miguel Armando Bortolini Júnior e Paulo César Borges Júnior**, que hoje não pertencem mais ao LABIBI, mas que com certeza deixaram um pouco de si através daqueles que ficaram;

Ao **Grupo de Abelha: Leo, Lú e Vivi**, pelo apoio, colaboração e enriquecimento proporcionado à minha formação científica;

**Aos amigos do Labibi:** Ana Clara, Andréa, Anibal, Carol, Cibele, Cláudia, Fabiana, Inez, Ismair, Juliana Sayuri, Juliana Hubaide, Karen, Leticia, Leonardo, Lorenna, Michel, Paulo, Romeu, Rosy, Vanessa e Viviane que sempre estiveram de braços abertos e prontos para ajudar.

À amiga **Luciana Karen Calábria**, irmã por parte de anjo, com a qual tive a felicidade de conviver por estes anos e aprender muita sobre a vida. Agradeço por me ajudar, ouvindo, conversando e agindo para que meus objetivos pudessem se cumprir;

**Aos demais colegas do Curso de Ciências Biológicas**, que pelo bem ou pelo mal me ensinaram a valorizar as pessoas que realmente nos amam.

**E a todos que de alguma forma me auxiliaram na realização deste trabalho!**

**Obrigada!**

**Renata Roland Teixeira**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Imunodeteção da miosina V (190 kDa) na fração sobrenadante (S1) de cérebro de abelha *Apis mellifera*
- Figura 02** – Perfil eletroforético das frações P<sub>2</sub> de cérebro de abelha *Apis mellifera* incubadas com EGTA, cálcio e calpaina
- Figura 03** – Perfil eletroforético das frações P<sub>2</sub>TX de cérebro de abelha *Apis mellifera* incubadas com EGTA, cálcio e calpaina
- Figura 04** – Imunodeteção de proteínas de cérebro de abelha fosforiladas no resíduo, utilizando-se o anticorpo anti-fosfoserina
- Figura 05** – Imunodeteção de proteínas de cérebro de abelha fosforiladas no resíduo treonina, utilizando-se o anticorpo anti-fosfotreonina
- Figura 06** – Perfil eletroforético das frações sinaptosomais de cérebro de rato
- Figura 07** – Imunodeteção da miosina V na fração 3% do gradiente de Percoll-sacarose
- Figura 08** – Imunodeteção da miosina V na fração 15% do gradiente de Percoll-sacarose
- Figura 09** – Gel de eletroforese das fatias de cérebro de rato cortadas em criostato
- Figura 10** – Imunodeteção da miosina V nas fatias de cérebro de rato
- Figura 11** – Imunodeteção da miosina V em fatias de cérebro de rato incubadas com diversas soluções
- Figura 12** – Imunodeteção de miosina V em amostra de S1 de cérebro de abelha *Apis mellifera* utilizando-se diferentes tipos de anticorpos anti-cabeça de miosina V

**Figura 13** - Imunodeteção de miosina V em amostra de S5 de cérebro de pintainho utilizando-se diferentes tipos de anticorpos anti-cabeça de miosina V

**Figura 14** - Imunodeteção de miosina V em amostra de P2 de cérebro de rato *Wistar* utilizando-se diferentes tipos de anticorpos anti-cabeça de miosina V

**Figura 15** - Imunodeteção de miosina V em amostra de S1 de cérebro de coelho utilizando-se diferentes tipos de anticorpos anti-cabeça de miosina V



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01** – Esquema de preparação de fração S<sub>5</sub> de cérebro de pintainho

**Tabela 02** – Distribuição dos pontos da curva-padrão para determinação da concentração protéica da amostra pelo método de BRADFORD (1976)

**Tabela 03** - Lista dos anticorpos do laboratório testados contra cérebro de abelha, coelho, rato e pintainho

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	01
1.1 O cálcio na célula .....	01
1.1.1 A relação entre o cálcio e a fosforilação de proteínas .....	02
1.2 Proteína quinase II dependente de $Ca^{2+}$ - calmodulina .....	02
1.3 Motores Moleculares .....	03
1.3.1 Miosina-V .....	03
1.4 Calpaina .....	06
1.5 Abelha <i>Apis mellifera</i> .....	07
1.5.1 Sistema Nervoso: cérebro .....	08
2. OBJETIVOS .....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
3.1 Material biológico .....	12
3.2 Dissecção .....	12
3.3 Métodos bioquímicos .....	12
3.3.1 Homogeneização dos tecidos para a obtenção da fração sobrenadante (S <sub>1</sub> ) de cérebro de abelha <i>Apis mellifera</i> .....	12
3.3.2 Obtenção da fração enriquecida em membrana (P <sub>2</sub> ) de cérebro da abelha <i>Apis mellifera</i> .....	13
3.3.3 Obtenção da fração enriquecida em membrana tratada com Triton X-100 10% (P <sub>2</sub> TX) de cérebro da abelha <i>Apis mellifera</i> .....	13
3.3.4 Incubação das frações P <sub>2</sub> e P <sub>2</sub> TX com cálcio .....	14
3.3.5 Preparação da fração S <sub>1</sub> de cérebro de coelho .....	14
3.3.6 Preparação da fração P <sub>2</sub> de cérebro de rato .....	14

3.3.7	Preparação da fração S <sub>5</sub> de cérebro de pintainho	15
3.3.8	Teste dos anticorpos anti-MV nas frações obtidas de cérebro de abelha (S <sub>1</sub> ), coelho (S <sub>1</sub> ), rato (P <sub>2</sub> ) e pintainho (S <sub>5</sub> )	16
3.3.9	Dosagem de proteína	17
3.3.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	17
3.3.11	Transferência eletroforética do gel para a membrana de nitrocelulose - <i>Western Blot</i>	18
3.3.12	Imunodeteção por fosfatase alcalina	18
3.3.13	Imunodeteção por quimioluminescência	19
3.3.14	Aquisição e Análise de imagens	19
3.4	Preparação de sinaptosomas em gradiente de Percoll-sacarose	20
3.4.1	Incubação das preparações sinaptosomais com cálcio e KCl	20
3.5	Cortes de cérebro de rato em criostato	21
3.5.1	Incubação das fatias de cérebro de rato com cálcio e KCl	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Imunodeteção de miosina V na fração S <sub>1</sub>	23
4.2	Frações enriquecidas em membrana: P <sub>2</sub> e P <sub>2</sub> TX	23
4.3	Sinaptosoma de cérebro de rato	25
4.4	Cortes de cérebro de rato em criostato	27
4.5	Teste da reação cruzada dos anticorpos	28
5	CONCLUSÕES	30
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

## RESUMO

A miosina V (MV) é um motor molecular envolvido no transporte de organelas e vesículas sobre o filamento de actina através da hidrólise do ATP. Sua estrutura molecular é formada por duas cadeias pesadas que se associam a cadeias leves. Cada cadeia pesada possui uma região N-terminal formando a cabeça motora, onde estão localizados os sítios ligantes de ATP e actina; uma região pescoço que apresenta seis sítios consecutivos de associação para calmodulina e cadeias leves de 23 e 17 kDa, chamados "motivos IQ"; uma cauda na região C-terminal dividida em três subdomínios: cauda proximal; cauda medial, região de estrutura variável contendo a sequência PEPT que é o domínio de clivagem por calpaina; e a cauda globular. Uma das prováveis vias de regulação desta proteína é a clivagem pela ação do  $Ca^{2+}$  e calpaina, em condições polarizantes e despolarizantes, sobre MV em frações enriquecidas em membrana ( $P_2$  e  $P_2TX$ ), em sinaptosoma de cérebro de rato e em cortes, por criostato, de cérebro de rato. Entretanto, a diversidade de métodos utilizados na preparação de cortes de cérebro pode refletir nos resultados finais. Sendo assim, visou-se à padronização da técnica de homogeneização dos cortes de cérebro de rato para a detecção da MV. Além disso, verificou-se a fosforilação dos resíduos serina e treonina de proteínas das frações enriquecidas em membrana. O anticorpo anti-cabeça MV reconheceu o fragmento de massa relativa de 190 kDa correspondente a essa proteína. Concluímos que a MV foi clivada na presença de cálcio e essa clivagem apresentou-se maior quando a amostra foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente na presença de KCl. A calpaina e o EGTA alteram o perfil eletroforético e influenciam a fosforilação das proteínas. Em relação às fatias de cérebro, aquelas homogeneizadas com tampão de extração de MV possibilitaram uma melhor visualização da marcação correspondente a esse motor molecular.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O CÁLCIO NA CÉLULA

O cálcio é o principal mensageiro do sistema intracelular de sinalização que transforma um estímulo extracelular em sistemas de regulação de um grande número de fenômenos intracelulares como a contração muscular, liberação de neurotransmissores e outros processos de secreção, proliferação celular, expressão gênica e apoptose. Além disso, o íon cálcio desempenha um papel importante no ambiente extracelular, envolvendo a interação célula-célula, adesão celular, participando de processos de reparação tecidual, na estrutura de receptores, na modelagem e formação do exoesqueleto e endoesqueleto (Evenäs, 1998).

A liberação de transmissores nas sinapses nervosas, desencadeada por íons cálcio constituem um dos exemplos mais bem estudados de sua ação como segundo mensageiro (Kandel, 1983). A despolarização pré-sináptica causa a abertura de canais de cálcio presentes na membrana celular levando a um aumento transitório de sua concentração no citosol e difusão para os sítios receptores. A ligação do cálcio às proteínas receptoras desencadeia a exocitose de vesículas sinápticas com a consequente liberação de neurotransmissores (Augustine *et al.*, 1987).

Estudos sobre a função do cálcio na célula indicam que a concentração de cálcio nuclear é responsável pelo controle da abertura de poros na membrana, assim como pelo balanço da concentração de cálcio intracelular e nuclear (Periz-Terzic, 1997).

Os principais alvos do cálcio liberado na célula são as proteínas ligantes de cálcio, sendo que muitas delas são participantes de processos regulatórios intracelulares. A calbindina, troponina C, calpaina e calmodulina-quinase II (CaMK-II) são exemplos de proteína cálcio-dependentes (Spyracoopoulos, 1997; Goldberg, 1996; Blanchard, 1997).

Sabe-se também que a organização e a dinâmica do citoesqueleto envolvem os seguintes tipos de regulação por íons cálcio: fosforilação dependente de  $Ca^{2+}$ /CaM, ligação de cálcio livre, interação com o complexo  $Ca^{2+}$ /CaM e proteólise dependente de cálcio (McIntosh, 1997).

### 1.1.1 A relação entre o cálcio e a fosforilação de proteínas

Em geral, as proteínas-quinases são as responsáveis pela fosforilação das proteínas na célula, sendo consideradas transdutoras e amplificadoras de sinais biológicos. As proteínas-quinase utilizam como substratos o  $Mg^{2+}$ -ATP e proteínas fosforiláveis. O sítio catalítico de ligação do ATP e do substrato é geralmente conservado entre as diferentes proteínas-quinase (Lukas *et al.*, 1988 e Soderling, 1990).

Essas proteínas variam amplamente em termos de sua especificidade de substrato, regulação e distribuição celular. Entretanto, podem ser classificadas na maioria dos casos como tirosina-quinase ou serina/treonina-quinase, dependendo do aminoácido do substrato que funciona como aceptor de fosfato (Lukas *et al.*, 1988).

As proteínas-quinase dependentes de  $Ca^{2+}$ /CaM são serina/treonina-quinase de substratos específicos, como a proteína-quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e de substratos multiespecíficos, como a CaMK-II, que fosforila uma variedade de proteínas, apresentando função múltipla na regulação celular (Lukas *et al.*, 1988).

### 1.2 PROTEÍNA QUINASE II DEPENDENTE DE $Ca^{2+}$ - CALMODULINA

A calmodulina, uma proteína multifuncional da família das proteínas gigantes de cálcio, apresenta sua estrutura bastante conservada e quatro domínios gigantes de  $Ca^{2+}$ , participando do controle de atividades de proteínas quinases, fosfatases e de proteínas associadas ao citoesqueleto. A ligação do  $Ca^{2+}$  a calmodulina causa uma mudança conformacional na molécula, formando um complexo  $Ca^{2+}$ /CaM que tem como principal alvo a proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMK-II) que é capaz de fosforilar proteínas envolvidas nas mais diversas atividades celulares (Cheung, 1980).

A CaMK-II é conhecida como a central de coordenação e execução de transdução de sinais mediados por  $Ca^{2+}$ , possuindo uma vasta especificidade de substratos. Os substratos fosforilados pela CaMK-II estão envolvidos em importantes processos celulares, e principalmente nas modificações a complexas respostas cognitivas e comportamentais, incluindo aprendizagem e memória (Lisman *et al.*, 2002).

As miosinas são mecanoenzimas associadas aos filamentos de actina e capazes de hidrolisar ATP (adenosina trifosfato) e acoplar a energia química dessa hidrólise à

### 1.3.1 Miosina V

## 1.3 MOTORES MOLECULARES

cauda pela quinase associada com o citoesqueleto de actina. de um controle da atividade da miosina V pelos ions cálcio através da fosforilação de sua os sítios de fosforilação pela CaMK-II (Coelho e Larson, 1993), hipotetizando a existência produz um fragmento de 80kDa da região C-terminal, onde se encontra a maioria ou todos de miosina V fosforila a região carboxi-terminal desta proteína. A clivagem pela calpaina Além disso, estudos mostraram que a atividade de CaMK-II associada a preparação endógena com características semelhantes a CaMK-II (Larson *et al.*, 1990). fosforilação de uma das cadeias leves da miosina de cérebro por uma proteína-quinase  $Ca^{2+}/CaM$  da cadeia leve da miosina em sinaptosomas. Outros estudos mostraram a Edelman *et al.* (1995) mostraram a associação de uma fosforilação dependente de ionotrópicos (Tan e Liang, 1996; Wolfman *et al.*, 1994). proteínas importantes para a plasticidade sináptica, incluindo os receptores glutamatérgicos intracelular que ocorre após a ativação de receptores NMDA. A CaMK-II fosforila várias A atividade da CaMK-II é regulada pelo aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  do domínio da subunidade  $\alpha$  (Thr 287 nas subunidades  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) (Camarota *et al.*, 2002). proteínas como também promove sua autofosforilação atingindo o resíduo Thr 286 dentro O complexo  $Ca^{2+}/CaM$  atua ativando a CaMK-II que não só fosforila outras fosforilação, serina ou treonina para o reconhecimento dos substratos (Colbran *et al.*, 1989). requer a presença de uma arginina como um terceiro resíduo amino-terminal do sítio de comum ao domínio catalítico altamente conservado na maioria das quinases. Essa enzima *et al.*, 2002). A metade N-terminal das subunidades contém uma sequência de aminoácidos subunidade contém um domínio catalítico, um regulatório e um associativo (Lisman *et* funcionais, divididos em dois grupos de seis, que consistem nas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Cada A holoenzima CaMK-II tem uma arquitetura única, apresentando 12 domínios

produção de força e movimento, necessários para a realização de vários eventos celulares

(Evans *et al.*, 1997).

A miosina V (MV) foi inicialmente identificada como uma proteína ligante de calmodulina presente em cérebro de coelho (Larson *et al.*, 1990; Espindola *et al.*, 1992). A estrutura molecular da MV foi determinada com base na análise da sequência primária de aminoácidos e em dados de microscopia eletrônica da miosina V de cérebro purificada na forma nativa. As miosinas da classe V cuja sequência completa de cDNA foi determinada incluem o produto do gene *dilute* em camundongo, MV de cérebro de galinha, myo2 e myo4 em levedura, MV de *Drosophila* e myr6 de rato. (Espreatico, 1992; Cheney *et al.*, 1993).

As miosinas V são motores moleculares envolvidos no transporte de organelas e vesículas, bem como na interação com o citoesqueleto via filamentos de actina (Espindola *et al.*, 1992). É uma proteína altamente dependente de cálcio intracelular e de calmodulina para executar sua função, possuem duas cadeias pesadas na porção N-terminal formando a cabeça motora, semelhante às miosinas da classe II (Espreatico *et al.*, 1992). Logo após a cabeça, esta a região do pescoço que apresenta seis sítios consecutivos de associação para cadeias leves, entre elas a calmodulina (de 4-5 calmodulinas por molécula de cadeia pesada), chamados "motivos IQ" (repetições de 24-30 aminoácidos hidrofóbicos), e as cadeias leves essenciais de 17 e 23 kDa (Reck-Peterson *et al.*, 2000; Cheney *et al.*, 1993). Na região carboxi-terminal encontra-se o domínio cauda dividido em três subdomínios: cauda proximal, constituída por dupla hélice responsável pela dimerização da molécula; cauda medial, região de estrutura variável que se inicia na sequência PEPT (domínio de clivagem por calpaína) e a cauda globular, contendo de 400 a 500 aminoácidos, aonde interage uma subunidade de 10kDa similar a DLC, a PIN, que interage com uma gama de outras proteínas envolvidas em diversos processos celulares (Espreatico *et al.*, 1992, Espindola *et al.*, 2000).

A sequência de aminoácidos do domínio cabeça é altamente conservada através das diferentes miosinas da classe V, com 42% de identidade e mais 23% de homologia (Langford e Molyneaux, 1998). Embora baixos níveis de MV estejam expressos na maioria dos tecidos de vertebrados, ela é mais abundante em tecidos nervosos e células neurosecretórias, seguido



por tecidos de origem endócrina e tecidos musculares inervados (Espreafico *et al.*, 1992). Isso leva a crer que exista um relacionamento intrínseco entre a localização e as funções desempenhadas por esta proteína em tecido nervoso, pois estudos mostram que a MV está presente em preparações de vesículas sinápticas (Mani *et al.*, 1994) e interage com várias vesículas sinápticas associadas a proteínas como a CaMK-II, sintaxina e o complexo Vamp/sinaptobrevina, podendo estar associada com organelas envolvidas na maturação ou reciclagem de vesículas (Costa, 1999; Prekeris e Terrian, 1997; Ohyama, 2001).

Estudos realizados com MV de cérebro de aves e mamíferos mostraram a precipitação desta proteína na presença de 0,6 M de NaCl originando uma fração P<sub>2</sub> enriquecida em miosina V, sendo que esta fração caracteriza-se por apresentar esta proteína associada a vesículas, miosina VI e outras proteínas de transdução de sinal (Cheney *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1998).

Recentemente, estudos demonstraram que a Síndrome de Griscelli, uma doença recessiva humana caracterizada pela baixa quantidade de pigmentação, imunodeficiência e distúrbios neurológicos, está associada à mutação da MV e da Rab27a, uma proteína de ancoragem presente na membrana da vesícula (Anikster *et al.*, 2002). Tanto as mutações dos motores moleculares como a agregação de proteínas, características de diversas doenças neurodegenerativas humanas, podem impedir o transporte de organelas pelos axônios (Vale, 2003).

A miosina V é alvo de três proteínas mediadoras de sinal de cálcio: calmodulina, CaMK-II e calpaina. Espindola *et al.* (1992) mostraram que a calpaina, uma cisteína protease ativada por cálcio, digere a MV por proteólise limitada gerando um fragmento contendo o domínio cabeça de 65kDa que cosedimenta com F-actina ATP-sensível e um fragmento cauda de 80 kDa que não interage com F-actina. Esse fragmento de 80 kDa é resultante da clivagem por calpaina em um resíduo de aminoácido após a região PEST (motivo alvo de clivagem por calpaina presente em muitas proteínas).

Costa *et al.* (1996) mostraram a interação entre miosina V e CaMK-II, duas proteínas gigantes de calmodulina. Demonstrou-se que na presença somente de Ca<sup>2+</sup> e MV a CaMK-II foi autofosforilada e subsequentemente fosforilou a miosina V. Experimentos de *overlay* e imunoprecipitação empregando essa proteína. CaMK-II purificada e anticorpos específicos para miosina V mostraram uma interação física entre essas proteínas. Esses resultados

Dentre os seus substratos destacam-se proteínas do citoesqueleto como a fodrina, talina, filamina e miosinas, além de enzimas como a proteína quinase C (PKC), CaMK-II e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Essa protease participa de vários processos celulares desencadeados pelo sinal do íon cálcio como o remodelamento do citoesqueleto, agregação de plaquetas, fusão celular e potenciação de tempo longo e seu mau funcionamento foi associado com alguns processos patológicos como hipertensão e morte celular (Croall e DeMartino, 1991).

A calpaina é uma protease não lisossomal dependente de cálcio que cliva proteínas específicas gerando polipeptídeos estáveis, possuindo um papel regulador melhor do que degradativo (Wang et al., 1989). Há duas isoformas de calpaina, calpaina I e II, que embora possuam propriedades similares constituem produtos de genes diferentes e distinguem-se quanto à sensibilidade aos íons cálcios. Para alcançar sua atividade máxima a calpaina I (μcalpaina) necessita de 20 a 50 μm de cálcio, enquanto que a calpaina II (mcalpaina) requer 0,5 a 1 mM de cálcio (Murachi, 1983; Suzuki, 1987; Croall e DeMartino, 1991).

A estrutura da calpaina compreende uma subunidade catalítica de 80 kDa e uma subunidade regulatória de 30 kDa, com domínio de cisteína-protease, dois domínios semelhantes aos ligantes de cálcio da calmodulina e um domínio de ligação (Suzuki *et al.*, 1987; Mellgren et al., 1987).

#### 1.4 CALPAINA

Estudos mostraram que as proteínas motoras miosina V e VI e clatrina, uma proteína relacionada com a endocitose de vesículas estão presentes em preparação de sinaptosomas de cérebro de abelha *Apis mellifera* (Silva *et al.*, 2002). Casaleti (2003) demonstrou que a polarização-repolarização de sinaptosomas na presença de cálcio extracelular provoca a clivagem da MV, originando um polipeptídeo de 80 kDa, reconhecido pelo anticorpo anti-cauda da miosina V, sugerindo que esse fragmento possa ser resultado da clivagem por calpaina endógena.

levantam a intrigante hipótese de que a MV com suas cadeias leves de calmodulina poderia estar transportando a própria calmodulina para ativação de CaMK-II em sítios específicos da célula.

As abelhas são himenópteros sociais altamente adaptados, capazes de comportamentos específicos cujo objetivo é a manutenção da colônia. Alimentam-se de néctar e pólen e vivem em colônias permanentes com cerca de 20.000 indivíduos divididos em três castas: rainha, operária e zangão (Winston, 1987). A base molecular de seu comportamento social tem sido amplamente investigada devido ao paradoxo de possuírem complexas respostas a estímulos, baseada em uma simples e eficiente plasticidade neuronal. As operárias, presentes em maior número na colônia, são fêmeas estéreis que apresentam uma diversidade de funções na colônia como construção, limpeza, condicionamento e defesa da colônia, cuidado e alimentação das larvas de zangões, rainhas e operárias (Winston, 1987). Fora da colônia, uma operária navega até 13 quilômetros e memorizando os locais de interesse. Todas essas informações armazenadas são transmitidas através de movimentos corporais, acerca de fontes de alimento, distâncias e direções (Menzel and Giurfa, 2001).

As *Apis mellifera* garantiram seu sucesso adaptativo por possuírem um sistema sensorial eficiente e uma capacidade de memória e aprendizagem, baseado no seu sistema nervoso composto por cérebro e cordão nervoso ventral (Oleskevich and Clements, 1997).

## 1.5 ABELHA *APIS MELLIFERA*

As células que possuem calpaina apresentam também um inibidor específico para presença de cálcio a calpastina liga-se a calpaina e inibe a sua atividade. O processo de LTP "long term potentiation" envolve a participação da PKC que é alvo da calpaina. Estudos em abelhas utilizando E 64, um inibidor da calpaina, mostram que ele bloqueia a elevação da atividade da PKC quando aplicada pouco antes ou durante o treinamento. Demonstrando assim que é necessária a utilização de um mecanismo proteolítico para indução da atividade da PKC durante as primeiras horas após o condicionamento (Grünbaum e Muller, 1998; Lynch e Baudry, 1984).

essa protease denominado de calpastina (Waxman e Krebs, 1978; Murachi, 1983). Na

## 1.5.1 Sistema Nervoso: cérebro

Contendo aproximadamente cerca de 960.000 neurônios (células Kenyon), com um volume de 1 mm<sup>3</sup>, o cérebro da abelha é equipado com sistemas sensoriais sofisticados, capacidade de aprendizagem e memória, cujos mecanismos essenciais não diferem drasticamente dos vertebrados (Giurfa et al., 2003).

Em sua forma adulta, a *Apis mellifera* apresenta cordão nervoso com sete gânglios e um cérebro dividido em três regiões: protocérebro na região anterior, compreendido pelos lobos ópticos e corpos de cogumelo; o deutocérebro formado pelos lobos antenais e o tritocérebro abaixo do deutocérebro, aparecendo reduzido no adulto (Snodgrass, 1956).

No protocérebro localizam-se estruturas bilaterais e especializadas denominadas “mushroom bodies”, “corpora pendunculata” ou corpos de cogumelo. Eles recebem informações de diferentes áreas do cérebro, principalmente dos lobos óptico e antenal, e são estruturas essenciais para a associação e integração das informações recebidas (Cayre, 1998). Cada corpo de cogumelo possui dois cálices que contêm neurônios intrínsecos, as células Kenyon (aproximadamente 170.000 por hemisfério cerebral) arranjadas de maneira altamente organizada (Oleskevich and Clements, 1997). Os estímulos são recebidos pelos neurônios dos cálices, que se ramificam e conduzem a informação para os lobos alfa e beta, localizados no pedúnculo (Cayre, 1998).

As células Kenyon presentes no cérebro das abelhas podem ser subdivididas em três tipos: células Kenyon compactadas internas, compactadas externas e não compactadas. As compactadas internas têm um corpo celular muito pequeno e estão empacotadas na região central do cálice, enquanto as não compactadas estão dispersas no restante dos cálices. Já as compactadas externas têm um tamanho e aparência similar às compactadas internas, mas estão no lado externo dos cálices (Nässel, 1996). Estudos mostram evidências de que os corpos de cogumelo equivalem ao hipocampo dos vertebrados em relação à aprendizagem espacial. Levando a crer que os estímulos sensoriais captados pelos olhos e antenas dos insetos são processados nos corpos de cogumelo. Além disso, muitos pesquisadores relacionam diretamente os corpos de cogumelo com a aprendizagem olfatória e o comportamento sexual dos insetos (Capaldi et al., 1999).

O lobo antenal possui neurônios receptores de estímulos olfatórios captados pelas antenas. Esses estímulos são distribuídos para o lobo óptico e corpos de cogumelo, os quais enviam o sinal para neurônios descendentes, que induzirão uma resposta comportamental tanto na região da cabeça, como no tórax e abdômen. No lobo antenal estão presentes cento e cinquenta e seis glomérulos, considerados como centros sinápticos (Nässel, 1986). Devido ao seu comportamento, à suas características especiais, como a

O lobo óptico da abelha é uma massa de fibras e células nervosas, presentes em três gânglios sinápticos internos: lâmina, medula e lóbula, nos quais existem receptores sinápticos específicos para as projeções de axônios enviados de fotorreceptores da retina (Nässel *et al.*, 1987). A retina é formada por elementos ópticos, células pigmentadas e fotorreceptores, arranjados em aproximadamente 4.000 omatídeos. Dez tipos de neurônios conectam a lâmina à medula e apenas um tipo conecta aquela região à lóbula. A medula é formada por aproximadamente sessenta tipos de neurônios, os colunares, que formam estruturas com cerca de trinta axônios, conectam a medula à lóbula e os tangenciais projetam-se para diferentes pontos do lobo óptico. A lóbula possui arborizações mais extensivas dos elementos colunares, formando canais que convergem as nove colunas de neurônios da lóbula para a medula (Nässel, 1986).

Os ocelos são três pequenos olhos situados na porção anterior da cabeça. A parte externa de cada ocelo é formada por uma lente biconvexa, que contém aproximadamente 800 a 1.000 células da retina que irão conduzir os estímulos até o protocérebro (Goodman, 1975). A estrutura e a fisiologia dos ocelos indicam que eles são responsáveis pela percepção da quantidade e da intensidade da luz, influenciando na orientação espacial das abelhas (Fent and Wehner, 1985).

Os corpos de cogumelo das abelhas são relativamente maiores quando comparados com os de outros insetos, esse aumento da complexidade estrutural dos corpos de cogumelo pode estar relacionado com a variedade de sinais sensoriais que elas podem processar. Acredita-se que a habilidade das operárias de executar comportamentos tão diversos e avançados pode estar associada aos neurotransmissores que operam em seu circuito sináptico. Além disso, estudos mostram a expressão de proteínas envolvidas na transdução de sinal de cálcio: CaMK-II e PKC (Kamikouchi *et al.*, 2000).

aprendizagem e a memória, e à sua grande importância econômica, pois dela são extraídos o mel, a cera, a geléia real, a própolis e outros subprodutos, a *Apis mellifera* vem sendo uma das espécies de abelhas mais conhecidas e estudadas.

Os avanços nas áreas da genômica e proteômica da *Apis mellifera* têm levado ao estabelecimento de relações entre os genes e seu complexo comportamento. Este inclui uma variedade de fenômenos, tais como, reconhecimento familiar, comunicação complexa através da linguagem da dança, divisão de trabalho regulada socialmente, e uma grande variedade de formas de aprendizagem.

Metade dos genes de *Drosophila* normalmente implicados na transmissão sináptica e comportamento estão representados em *Apis*, porém, mais de 100 seqüências transcritas de *Apis* que são conservadas em outros organismos não aparecem no genoma de *Drosophila* (Whitfield, W. C. et al; 2002). Usando a estratégia ORESTES (Open Reading Frame Expressed Sequence Tags), um grupo de consorciados brasileiros conseguiu gerar 5021 seqüências de todos os estágios do ciclo de vida de abelhas operárias *Apis mellifera*. Os resultados mostram o alinhamento com seqüências já conhecidas de *Apis* (35,2%), define ortólogos em outras espécies, *Anopheles* (43,9%), *Drosophila* (29,5%), e também revelam que 42,4% não alinham com nenhuma seqüência depositada no GenBank (Nunes, F. M. et al., 2004).

Desta forma, o genoma da *Apis* torna-se a cada dia uma realidade que, sem dúvida facilitará e completará os inúmeros estudos já realizados, evidenciando ortologia, filogenia, similaridade e homologia de seus vários genes com outros invertebrados e vertebrados.

## 2. OBJETIVOS

### - Cérebro de abelha *Apis mellifera*

1. Preparar fração S<sub>1</sub> e frações enriquecidas em membranas (P<sub>2</sub> e P<sub>2</sub>TX) e imunodetectar a MV;
2. Realizar ensaios de incubação das frações P<sub>2</sub> e P<sub>2</sub>TX com cálcio e calpaina;
3. Observar a diferença no perfil eletroforético das proteínas na presença e ausência de cálcio e calpaina;
4. Verificar a fosforilação de proteínas na fração P<sub>2</sub> utilizando-se anticorpo anti-fosfoserina;
5. Verificar a fosforilação de proteínas na fração P<sub>2</sub>TX utilizando-se anticorpo anti-fosforeonina;

### - Cérebro de rato

1. Preparar sinaptosomas e imunodetectar a MV;
2. Realizar ensaios de incubação dos sinaptosomas com cálcio e calpaina em condições polarizantes e despolarizantes e imunodetectar a MV;
3. Padronizar a preparação de fatias de cérebro por congelamento para a imunodeteccção da MV;
4. Realizar ensaios de incubação das fatias com cálcio e detergente, em condições polarizantes e despolarizantes, e imunodetectar a MV.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

Neste trabalho, utilizamos cérebros de abelhas operárias campeiras *Apis mellifera*, coletadas de uma colmeia do Jardim experimental do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia-MG. Os cérebros de rato e coelho foram cedidos pelo VALE de Uberlândia-MG.

#### 3.2 Dissecção

Inicialmente, as abelhas foram anestesiadas com clorofórmio e, a seguir, fixadas em placa de Petri contendo parafina, com o auxílio de alfinetes entomológicos. Adicionou-se uma quantidade de tampão fosfato de sódio (PBS, pH 7.3) suficiente para cobrir o material, mantendo-o em condições fisiológicas.

A remoção do cérebro foi feita com o auxílio de instrumental adequado (pinças e tesoura oftalmológica). As abelhas foram dissecadas no plano sagital mediano e o reconhecimento inicial da estrutura envolvida neste trabalho, foi realizado mediante consulta de trabalhos de SNOODGRASS (1956).

Imediatamente após a dissecção, o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em microtubo no ultracooler a -80°C.

#### 3.3 Métodos Bioquímicos

##### 3.3.1 Homogeneização dos tecidos para obtenção da fração sobrenadante (S1) de cérebro da abelha *Apis mellifera*

Os cérebros das abelhas foram homogeneizados em tampão de extração de miosina V (CHENEY et al., 1993) contendo Hepes 40 mM pH 7.7, EDTA 10 mM, EGTA 2 mM, ATP 5 mM, DTT 2 mM, Benzamida 1 mM, Aprotinina 0.1 mM e PMSF 0.5 mM, utilizando-se um homogeneizador de potter de vidro.

Para as amostras contendo 30 e 60 cérebros, acrescentou-se um volume de 1 mL de tampão de homogeneização e homogeneizou-se em gelo até a obtenção de uma amostra totalmente homogênea. Retirou-se uma alíquota de 5 µL para a dosagem de proteína total e o



restante da amostra foi submetida à centrifugação por 40 minutos a 40.000 xG, 4°C (Beckman Avanti centrífuge J-25). Após a centrifugação, o sedimento foi descartado e ao sobrenadante (fração S<sub>1</sub>) adicionou-se tampão da amostra 10x concentrado - "TA 10x [" (SDS 75%, sacarose 20%, tampão de equilíbrio 31 mM, β - mercaptoetanol 19%, EGTA-K 11 mM e bromofenol blue 0.25). Essas amostras, por sua vez, foram fervidas à 100°C por 2 minutos e estocadas a -20°C.

### **3.3.2 Obtenção da fração enriquecida em membrana (P<sub>2</sub>) de cérebro da abelha *Apis mellifera***

A fração enriquecida em membrana (P<sub>2</sub>) foi obtida de acordo com o protocolo de ensaio de motilidade modificado (Evans et al., 1998). As amostras de sobrenadante (S<sub>1</sub>) obtidas de acordo com o protocolo descrito acima foram incubadas com NaCl 0.6 M por 1 hora, em gelo, e posteriormente submetidas à centrifugação por 40 minutos a 40.000 xG, 4°C. O sobrenadante (S<sub>2</sub>) foi desprezado e o sedimento (P<sub>2</sub>) foi ressuspenso em tampão de vesícula contendo Hepes 25mM pH 7.4, EDTA 1mM, EGTA 1mM, KCl 50mM, DTT 2mM, Benzamidina 1 mM, Aprotinina 0.1 mM e PMSF 0.5 mM. Retirou-se uma alíquota de 5 µL para a dosagem de proteína total e ao volume restante adicionou-se TA 10x [ ]. Essas amostras foram fervidas à 100°C e estocadas a -20°C, por no máximo uma semana.

### **3.3.3 Obtenção da fração enriquecida em membrana tratada com Triton X-100 10% (P<sub>2</sub>TX) de cérebro de abelha *Apis mellifera***

A fração enriquecida em membrana foi obtida conforme etapas iniciais do protocolo de purificação da miosina-V (Nascimento et al. 1996) seguida pelo tratamento com Triton X-100 10% (Evans et al., 1998). A fração P<sub>2</sub> obtida de acordo com o protocolo descrito acima foi incubada com Triton X-100 10% gelado por 2 minutos, no gelo, e centrifugada por 20 minutos a 40.000 xG, 4°C. A fração sobrenadante (S<sub>3</sub>) foi desprezada e o sedimento ressuspenso no mesmo tampão de vesícula, obtendo-se a fração P<sub>2</sub>TX. Retirou-se uma alíquota de 5µl para dosagem de proteína total e ao volume restante adicionou-se TA 10x [ ]. Essas amostras foram fervidas à 100°C e armazenadas a -20°C.

### 3.3.4 Incubação das frações P<sub>2</sub> e P<sub>2</sub>TX com cálcio

Anteriormente à adição de TA 10x [ ], separou-se uma alíquota para a realização deste ensaio. As frações obtidas (P<sub>2</sub> e P<sub>2</sub>TX) foram incubadas com CaCl<sub>2</sub> 2 mM e DTT 2 mM por 30 minutos à temperatura ambiente no agitador rotatório. A reação foi interrompida adicionando-se TA 10x [ ]. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE e analisadas por *Western blot* (Casalotti, 2003).

### 3.3.5 Preparação de fração S<sub>1</sub> de cérebro de coelho

O cérebro de coelho foi homogeneizado em 1 mL de tampão de extração de miosina-V (CHENEY et al., 1993), utilizando-se um homogeneizador Potter - Elvehjem. A homogeneização procedeu-se em gelo até a obtenção de uma amostra totalmente homogênea. Retirou-se uma alíquota de 5 µL para a dosagem de proteína total e o restante da amostra foi submetida à centrifugação por 40 minutos a 40.000 xG, 4°C (Beckman Avanti centrifuge J-25). Após a centrifugação, o sedimento foi descartado e ao sobrenadante (fração S<sub>1</sub>) adicionou-se TA 10x [ ]. As amostras foram fervidas à 100°C por 2 minutos e estocadas a -20°C.

### 3.3.6 Preparação de fração P<sub>2</sub> de cérebro de rato

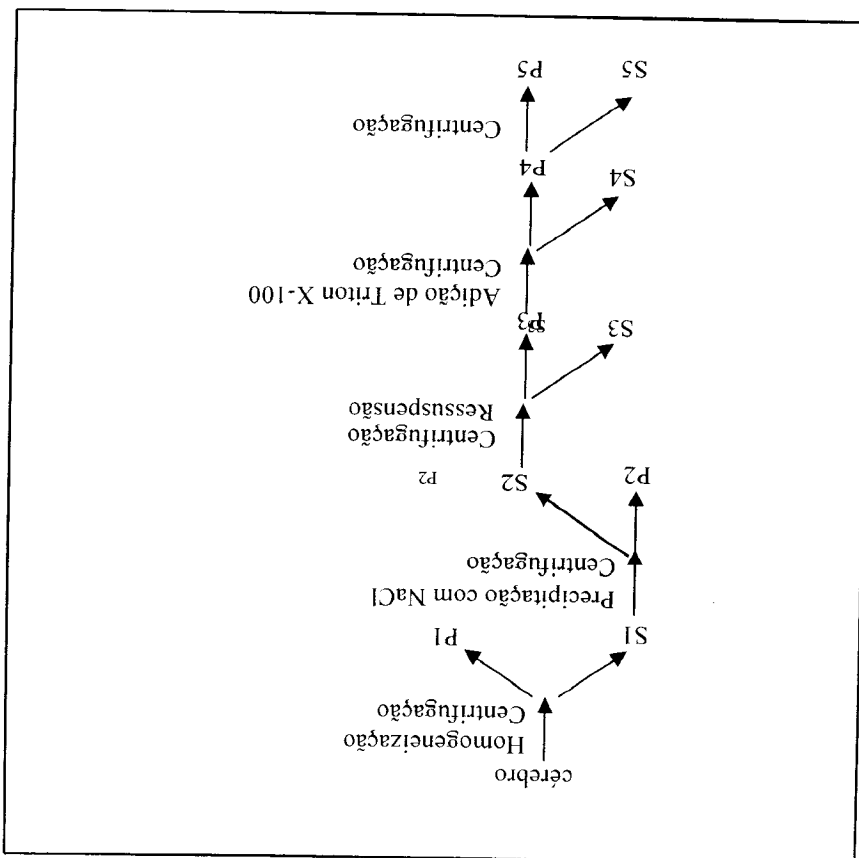
A fração enriquecida em membrana (P<sub>2</sub>) foi obtida de acordo com o protocolo de ensaio de motilidade modificado (Evans et al., 1998). As amostras de sobrenadante de cérebro de rato (S<sub>1</sub>) obtidas de acordo com o protocolo descrito acima para coelho foram incubadas com NaCl 0.6 M por 1 hora, em gelo, e posteriormente submetidas à centrifugação por 40 minutos a 40.000 xG, 4°C. O sobrenadante (S<sub>2</sub>) foi desprezado e o sedimento (P<sub>2</sub>) foi ressuspensão em tampão de vesícula. Retirou-se uma alíquota de 5 µL para a dosagem de proteína total e ao volume restante adicionou-se TA 10x [ ]. Essas amostras foram fervidas à 100°C e estocadas a -20°C.

### 3.3.7 Preparação de fração S<sub>5</sub> de cérebro de pintainho

A fração S<sub>5</sub> foi preparada de acordo com o protocolo de purificação de MV descrito por Cheney et al. (1993), com algumas modificações. Em cada preparação foram utilizados, em média, 15 cérebros de pintainho. Os animais foram sacrificados por decapitação e os cérebros rapidamente removidos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados no ultrarrefreezer a -80°C. Todos os passos subsequentes foram realizados a 4°C ou em gelo, a não ser quando especificados de outra maneira. Todos os tampões utilizados durante a preparação continham os seguintes inibidores de proteases: PMSF 0,3 mM, Aprotinina 2,0 µg/mL e Benzamidina 1 mM.

Os cérebros foram homogeneizados em tampão de extração (Hepes 40 mM pH 7,7, EDTA 10 mM, ATP 5 mM, DTT 2 mM), utilizando-se homogeneizador Ommimacro. O homogeneizado total foi centrifugado a 40.000 xG por 40 minutos e o precipitado descartado. Incubou-se o sobrenadante (S<sub>1</sub>) por 1 hora com NaCl 6M para a obtenção de uma concentração final de 600 mM. Em seguida, procedeu-se nova centrifugação a 40.000 xG por 40 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado (P<sub>2</sub>) em 30 ml de tampão Hepes 25 mM pH 7,2, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM e DTT 2 mM, utilizando-se um homogeneizador do tipo *potter* (teflon-vidro). Adicionou-se Triton X-100 à amostra para uma concentração final de 1%, aquecendo-a em banho-maria a 37°C por 2 minutos, seguido de nova homogeneização e centrifugação a 40.000 xG por 30 minutos. O precipitado (P<sub>3</sub>) foi ressuspensão em 10 mL do tampão Hepes 25 mM pH 7,2, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM e DTT 2 mM, homogeneizado e centrifugado a 40.000 xG por 30 minutos para remover o excesso de Triton X-100. O precipitado obtido (P<sub>4</sub>) foi ressuspensão em 8 mL tampão de solubilização (Hepes 25 mM pH 8,0, NaCl 600 mM, EGTA 2 mM, ATP 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM e DTT 2 mM) e centrifugado a 60.000 xG por 60 minutos, obtendo-se a fração sobrenadante (S<sub>5</sub>). Retirou-se uma alíquota de 5 µL para a dosagem de proteína total e ao volume restante adicionou-se TA 10x [ ]. Essas amostras foram fervidas à 100°C e estocadas a -20°C.

Tabela 01: Esquema da preparação da fração S<sub>5</sub> de cérebro de pintainho.



### 3.3.8 Teste dos anticorpos anti-MV nas frações obtidas de cérebro de abelha

(S<sub>1</sub>, coelho (S<sub>1</sub>), rato (P<sub>2</sub>) e pintainho (S<sub>2</sub>))

Todas as frações obtidas de cérebro de abelha (S<sub>1</sub>), coelho (S<sub>1</sub>), rato (P<sub>2</sub>) e pintainho (S<sub>2</sub>) foram submetidas a SDS-PAGE e analisadas por *Western blot* para a detecção de miosina V.

Todos os anticorpos listados foram testados na diluição de 1:500 com o intuito de verificar os melhores anticorpos para imunodeteção de miosina V de cérebro de vertebrados e invertibrados. A lista dos anticorpos testados segue em anexo.

### 3.3.9 Dosagem de proteína

A concentração de proteína total de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão a concentração protéica de soro albumina bovina (BSA). As amostras foram feitas em duplicatas e a absorbância quantificada a 595 nm. Construiu-se uma curva padrão de BSA em concentrações crescentes variando de 2 a 20 µg (tabela 02). A concentração final de proteína total em µg/µl foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva padrão, utilizando-se o programa EXCEL (Microsoft Office 97).

**Tabela 02: Distribuição dos pontos da curva-padrão para determinação da concentração protéica da amostra pelo método de BRADFORD (1976).**

Pontos	Água (µL)	BSA 0,1 mg/mL	Amostra (µL)	Reagente Bradford (mL)
Branco	200	0	0	3
2	180	20	0	3
4	160	40	0	3
8	120	80	0	3
12	80	120	0	3
16	40	160	0	3
20	0	200	0	3

(µL)

### 3.3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

A eletroforese procedeu-se de acordo com o sistema de tampão descontínuo descrito por LAEMMLI & FAVRE (1973). Utilizaram-se géis gradiente de acrilamida 5 a 16% no gel de separação e 3% no gel de empilhamento. Os géis de separação foram preparados com glicérol 0.7%, 360 mM tampão de separação pH 8.8 (Tris-base 45.38%, HCl 6 N 10%), SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida 0.144% (30:0.8) nas devidas concentrações, TEMED 0.003% e PSA 0.0128%. O gel de empilhamento foi preparado com tampão de empilhamento 124 mM

pH 6,8 (Tris-base 15,32% e HCl 12 N 10%), SDS 0,12%, acrilamida/bisacrilamida 3% (30:1.6), TEMED 0,006% e PSA 0,150%.

A eletroforese foi realizada utilizando-se tampão eletrodo (Tris 100 mM, EDTA 7,8 mM, glicina 770 mM, SDS 3% pH 8,3) e corrente constante de 45 mA. Amostras de 20 e 10 µg/µL foram aplicadas em cada "gel lane". Após a corrida, o gel foi corado em solução corante (Coomassie Brilliant Blue R 0,125%, metanol 50% e ácido acético 9%) por 20 minutos e descorado em solução descorante (metanol 5% e ácido acético 9%). Os géis foram armazenados em ácido acético 4% (Weber & Osbourne, 1969).

### 3.3.11 Transferência eletroforética do gel para a membrana de nitrocelulose - "Western-Blot"

As amostras separadas por eletroforese foram transferidas para membrana de nitrocelulose em corrente constante de 80 mA "overnight", utilizando-se tampão eletrodo (NaHCO<sub>3</sub> 10 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ânidro) 3 mM, SDS 0,01% e álcool metílico 20%) (Towbin et al., 1979). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau 0,5% (Ponceau 0,2% em ácido tricloroacético 3%) por 5 minutos para visualização das bandas e descoradas com água destilada.

### 3.3.12 Imunodeteção por fosfatase alcalina

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de bloqueio (leite desnatado 5%, PBS acrescido de Tween 20 (PBS-T) e azida sódica 0,03%) por 03 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas em PBS-T, 3 vezes de 5 minutos e incubadas com o anticorpo primário anti-miosina V (sondas para os domínios cabeça e cauda medial) diluído em PBS-T e acrescido de azida sódica 0,03%. Incubou-se as membranas *overnight* à temperatura ambiente e sob agitação. As membranas foram novamente lavadas em PBS-T, 3 vezes de 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG rabbit conjugado com fosfatase alcalina diluído em PBS-T e acrescido de azida sódica 0,03% por 3 horas.

A reatividade dos anticorpos foi detectada pelo sistema cromogênico NBT/BCIP, segundo o protocolo do fabricante (PROMEGA) (Walker, 1996). Em seguida, em câmara

escura, as membranas foram incubadas com solução de detecção por 30 minutos. A reação foi interrompida com água deionizada.

### 3.3.13 Imunodetecção por quimioluminescência

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de bloqueio (leite desnatado 5% em TBS acrescido de Tween 20 0,1% (TBS-T)) por 12 horas à 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBS-T, 4 vezes de 5 minutos e incubadas com o anticorpo primário anti-fosfoserina (1:50) e anti-fosforeonina (1:500) diluído em TBS-T. Incubou-se as membranas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. As membranas foram novamente lavadas em TBS-T, 4 vezes de 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG mouse conjugado com peroxidase (1:1000) diluído em TBS-T por 1 hora. A reatividade dos anticorpos foi detectada pelo sistema de quimioluminescência Kit ECL (Amersham Biosciences), segundo o protocolo do fabricante. Em seguida, em câmara escura, misturou-se volumes iguais das duas soluções de detecção possibilitando um volume suficiente para cobrir a membrana. Incubou-se a membrana com a solução de detecção por 1 minuto à temperatura ambiente.

A membrana foi colocada no cassete de raio-X e o filme autoradiográfico posicionado sobre ela. Fechou-se o cassete, expondo a membrana por 1 minuto. Removeu-se o filme, colocando outro e expondo por 5 minutos. O tempo de exposição do filme variou entre 1 e 20 minutos.

Os filmes retirados do cassete de raio-X foram colocados em uma máquina reveladora (KODAK), onde procedeu-se a revelação das bandas.

### 3.3.14 Aquisição e Análise de imagens

Os géis foram colocados entre duas transparências (3 mm). As imagens digitalizadas dos géis e dos imublots foram adquiridas por equipamento Genius scannermaker ligado a um computador 300 MHz e processadas no formato ".TIF"(Tagged Image Format).

### 3.4 Preparação de sinaptosomas em gradiente de Percoll-sacarose – (Dunkley et al., 1998)

Todos os passos foram realizados em gelo e as centrifugações a 4°C. Cerebros de rato foram homogeneizados em tampão (pH 7.4) contendo glicose 10 mM, NaCl 200 mM, KCl 5.4 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.8 mM, HEPES 25 mM, PMSF 0.5 mM e benzamidina 1 mM, utilizando-se um homogeneizador (potter-Elvehjem) a 800 rpm, 10 vezes com intervalo de 1 minuto a cada cinco homogeneizações. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 1000 xG por 10 minutos. A fração sedimentada (P<sub>1</sub>) foi descartada e o sobrenadante (S<sub>1</sub>) submetido ao gradiente descontínuo de Percoll para o isolamento de sinaptosomas. As diluições para confecção do gradiente de Percoll-sacarose ocorreram a partir de uma solução de Percoll-sacarose 23% e 0.25 mM de concentração final. Foram realizadas diluições com tampão (sacarose 0.32 mM, EDTA 1 mM, DTT 0.25 mM) pH 7.4, ajustado com NaOH.

O gradiente foi montado em tubo de policarbonato com capacidade para 15 mL. Utilizamos 2 mL de cada concentração das soluções de Percoll-sacarose resultando em gradientes nas concentrações de 23%, 15%, 10% e 3%. Aproximadamente 2 mL da fração S<sub>1</sub> foi aplicada sobre o gradiente de Percoll-sacarose. O tubo foi centrifugado a 32.500 xG por 5 minutos. As frações separadas no gradiente foram coletadas utilizando-se pipetas Pauster de ponta fina. Acrescentou-se tampão de homogeneização às frações coletadas e estas foram lavadas por centrifugação a 15.000 xG por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso no mesmo tampão de homogeneização. Retirou-se uma alíquota de 5 µL para a dosagem de proteína total e ao volume restante adicionou-se TA 10x [ ]. Essas amostras foram fervidas à 100°C e estocadas a -20°C.

### 3.4.1 Incubação das preparações sinaptosomais com cálcio e KCl - (Casaletti, 2002)

As frações coletadas do gradiente de Percoll-sacarose foram incubadas com CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, EGTA 2.5 mM e KCl 50mM por 30 minutos à temperatura ambiente no agitador rotatório. A reação foi interrompida pela adição de TA 10x [ ]. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE e analisadas por *Western blot*.



### 3.5 Cortes de cérebro de rato em criostato - (Bi et al., 1998)

Ratos Wistar foram anestesiados com clorofórmio e o cérebro removido rapidamente utilizando-se material adequado. O cérebro foi envolto com gaze umedecida em soro fisiológico e colocado sobre o gelo. O material foi levado para o criostato onde foram feitos cortes frontais seriados de 5µm, sendo que em cada lâmina foram colocados 4 cortes um sobre o outro, somando 20µm. As lâminas foram armazenadas a - 80°C por um período máximo de uma semana.

Para o teste de padronização da técnica, as lâminas foram retiradas do ultrafreezer (-80°C) e colocadas numa câmara úmida para o descongelamento. Os cortes foram removidos da lâmina e homogeneizados a 800 rpm, 5 vezes com intervalo de 1 minuto a cada homogeneização, em gelo, utilizando-se um homogeneizador (potter-Elvehjem).

Os homogeneizados foram preparados de três maneiras diferentes. As fatias foram removidas de cada lâmina com auxílio de lamínulas e homogeneizadas:

1) em tampão de extração de miosina V contendo Hepes 40 mM pH 7.7, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, ATP 5 mM, DTT 2 mM, benzamida 1 mM e PMSF 0.5 mM (Cheney *et al.*, 1993). Em seguida, retirou-se uma alíquota para dosagem protéica e ao volume restante adicionou-se TA 10x [ ];

2) em TCA 10%, sendo que posteriormente procedeu-se uma centrifugação a 12.000 xG por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em tampão da amostra contendo tris-glicina (TATG [IX]) (SDS 75%, sacarose 20%, tampão de equilíbrio 31 mM, β - mercaptoetanol 19%, EGTA-K 11 mM, bromofenol blue e Tris-glicina 2 mM). Vale ressaltar que nesta preparação não é possível retirar alíquota para dosagem protéica;

3) em tampão de extração de miosina V contendo Hepes 40 mM pH 7.7, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, ATP 5 mM, DTT 2 mM, benzamida 1 mM e PMSF 0.5 mM (Cheney *et al.*, 1993). Em seguida, retirou-se uma alíquota para dosagem protéica e o volume restante foi incubado com TCA 10% por 15 minutos no gelo e, posteriormente, procedeu-se uma centrifugação a 12.000 xG por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em TATG 1x [ ]. A seguir, todas as amostras foram fervidas a 100°C e estocadas a -20°C (Peixoto, 2002).

### 3.5.1 Incubação das fatias de cérebro de rato com cálcio e KCl - (Bi *et al.*, 1998)

As fatias foram incubadas com as soluções listadas abaixo (1-6) por 30 minutos à temperatura ambiente na câmara úmida.

1. Tris-HCl 100 mM pH 7.4 e EGTA 2.5 mM;
2. Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EGTA 2.5 mM e KCl 50 mM;
3. Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EGTA 2.5 mM, KCl 50 mM e Tween 20 0.05%;
4. Tris-HCl 100 mM pH 7.4 e CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM;
5. Tris-HCl 100 mM pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM e KCl 50 mM;
6. Tris-HCl 100 mM pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, KCl 50 mM e Tween 20 0.05%.

As fatias foram removidas da lâmina com o auxílio de lamínulas e homogeneizadas em tampão de extração de miosina-V (CHENEY *et al.*, 1993). Vale ressaltar que as soluções de incubação foram desprezadas. Adicionou-se TA 10x [ ] às amostras. Em seguida, estas foram fervidas à 100°C e estocadas a -20°C para posterior análise por *Western blot*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1) Imunodeteção de miosina V na fração S<sub>1</sub>

A miosina V (MV), com massa molecular relativa (Mr – subunidade da cadeia pesada) de 190 kDa, foi imunodetectada na fração sobrenadante (S<sub>1</sub>) de cérebro de abelha operária campeira, demonstrando a presença deste motor molecular no cérebro da *Apis mellifera* (Fig. 01).

Da mesma forma, as miosinas V e VI foram imunodetectadas nas regiões do cérebro desta abelha e em fração sinaptoosomal (Peixoto, 2002; Silva, 2003). Moraes (2003) imunodetectou MV, CAMK-II e outras proteínas de transdução de sinal em frações enriquecidas em membrana de cérebro de abelha *Apis mellifera* e Calábria (2004) imunodetectou a MV em fração sobrenadante de cérebro de abelha operária nutridora, rainha e zangão.

### 4.2) Incubação das frações P<sub>2</sub> com cálcio e calpaina

A análise do perfil eletroforético das proteínas da fração P<sub>2</sub> revelou que na presença de calpaina ocorre uma mudança no padrão de proteína, evidenciando uma banda polipeptídica de aproximadamente 116 kDa. Entretanto, quando o cálcio ou o EGTA esta presente juntamente com a calpaina não há a presença deste polipeptídeo. Além disso, o cálcio e o EGTA sem a calpaina não alteram o perfil eletroforético das proteínas (Fig. 02). Em tecidos de mamíferos, a degradação intracelular de proteínas é mediada por três sistemas de proteólise, uma protease ácida lisossomal (pH 5.0 – 6.0), um complexo de protease multicatalítica (pH 7.0 – 9.0) e uma protease neutra cálcio-dependente, o sistema calpaina (pH 7.0 – 7.5) (Sazonova, 1999). Espindola *et al.* (1992) mostraram que a calpaina, uma cisteína protease ativada por cálcio, digere a MV por proteólise limitada gerando um fragmento contendo o domínio cabeça de 65kDa que cosedimenta com F-actina ATP-sensível e um fragmento cauda de 80 kDa que não interage com F-actina. Esse fragmento de 80 kDa é resultante da clivagem por

Nas frações P<sub>2</sub> e P<sub>2</sub>TX foram imunodetectadas as proteínas fosforiladas nos resíduos de serina e treonina, respectivamente. Observou-se que a incubação da fração P<sub>2</sub> com EGTA e cálcio não alterou o padrão de fosforilação no resíduo serina das proteínas. Entretanto, na fração P<sub>2</sub> incubada com calpaina observou-se a fosforilação de uma proteína, de aproximadamente 84 kDa, que não apresentava-se fosforilada na presença de cálcio e EGTA. Além disso, quando há presença de cálcio e calpaina observou-se que houve a fosforilação desta proteína (84 kDa) e de duas outras de aproximadamente 36 e 54 kDa

#### **4.4) Fosforilação das frações P<sub>2</sub> e P<sub>2</sub>TX com cálcio e calpaina**

Os inibidores de calpaina como a leupeptina exercem efeito protetor em injúrias neurais causadas por hipóxia e isquemia. A glicina é uma substância que induz uma específica inativação desta protease cálcio-dependente, sem interferir nas serinas e aspartato proteases, prevenindo desta forma injúrias causadas especificamente por este componente do sistema proteolítico da célula (Sazontova, 1999).

O sistema calpaina é ativado de acordo com as concentrações de cálcio intracelular (maior que 0.85 mM, concentrações normais de cálcio intracelular: 0.2 - 0.8 mM). Deste modo, uma excessiva ativação deste sistema induzido pelo aumento da concentração intracelular de cálcio combinado com a ativação de processos de formação de radicais livres e fatores de danos à célula podem levar ao desenvolvimento de estados patológicos (Sazontova, 1999).

No perfil eletroforético das proteínas da fração P<sub>2</sub>TX observou-se que a incubação com EGTA (quelante de cálcio) e calpaina alterou o padrão das proteínas, evidenciando uma banda proteica de aproximadamente 116 kDa. Entretanto, o cálcio na presença ou ausência de calpaina e o EGTA na ausência de calpaina não alteram o perfil proteico (Fig. 03).

#### **4.3) Incubação das frações P<sub>2</sub>TX com cálcio e calpaina**

calpaina presente em muitas proteínas).

calpaina em um resíduo de aminoácido após a região PEST (motivo alvo de clivagem por

A incubação por 30 minutos à temperatura ambiente não demonstrou diferença no padrão de detecção do polipeptídeo. Além disso, observou-se que não houve, visivelmente, diferença de expressão significativa entre as frações 3% incubadas com EGTA 2.5 mM (c.

de 130 kDa. Em dois fragmentos, sendo um de 80 kDa (correspondente a região C-terminal) e um outro clivada pela calpaina na sequência PEST (entre os aminoácidos 1140 e 1141) resultando Espectro e colaboradores (1992) mostraram que a MV, na presença de cálcio, é apresentado-se degradado em dois fragmentos de Mr 130 e 63 kDa.

molecular relativa (Mr) 190 kDa foi imunodetectada (Fig. 07a), entretanto este polipeptídeo No *immunoblot* da fração 3% do gradiente de Percoll-sacarose, a MV, com massa (HINTON *et al.*, 1996).

sacarose, através de centrifugação, separa as organelas por um gradiente de densidade gradiente e concentrar-se na fração de fundo. Isso acontece porque o gradiente de Percoll- No fracionamento subcelular as organelas mais pesadas tendem a passar pelo 10%, 15% e 23% (Fig. 06).

observou-se que não houve diferença no perfil eletroforético das proteínas nas frações 3%, No gel do fracionamento subcelular das organelas do cérebro de rato *Wistar*

#### 4.5) Sinaptosoma de cérebro de rato

Destá forma, o sistema calpaina regula a função do citoesqueleto no cérebro. proteína quinase calcio-calmodulina dependente ligada a actomioisina a ao citoesqueleto. apresenta a maioria dos sítios de fosforilação. A fosforilação desta porção é mediada pela da MV em preparação de actina de cérebro de vertebrado, sendo que este fragmento Coelho e Larson (1993) mostraram que a calpaina hidrolisa o fragmento C-terminal substratos para a calpaina (Frangioni, 1993).

humanas, a fosfotirosina fosfatase IB e a tirosina quinase de membrana e citosólica são variedade de proteínas e para a transmissão de sinais dentro da célula. Em plaquetas A calpaina gera uma circunstância propícia para a fosforilação de uma grande aproximadamente 116 kDa quando há presença de EGTA e calpaina (Fig. 05). (Fig. 04). Na fração P<sub>2</sub>TX observou-se que houve a fosforilação de apenas uma proteína de

e) e  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM (d, f) instantaneamente, ou por 30 minutos à temperatura ambiente (Fig. 07).

Por outro lado, Coelho e Larson (1993) evidenciaram a clivagem da MV utilizando a fração P<sub>2</sub> incubada com  $\text{CaCl}_2$  0.6 mM por 20 minutos, e reconheceram os polipeptídeos de Mr 130 e 65kDa através de sondagem com anticorpo anti-cabeça MV.

Nos ensaios realizados na presença de KCl 50 mM observou-se a variação no padrão de expressão do polipeptídeo, uma vez que na presença de EGTA 2.5 mM detectou-se três fragmentos 190, 130 e 63 kDa, sendo que grande parte da proteína apresentou-se clivada (63 kDa), e na presença de  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM visualizou-se somente uma banda de Mr 63 kDa, um indicativo da clivagem total da proteína (Fig. 07g e h, respectivamente).

Vital dos Santos e colaboradores (1999) clivando *in vitro* o fragmento de 130 kDa verificaram a origem de fragmentos de 70 e 63 kDa. Os fragmentos de 130 e 63 kDa foram reconhecidos pelo anticorpo anti-cabeça MV, enquanto que o fragmento de 80 kDa foi reconhecido pelo anticorpo anti-cauda MV.

Em experimento *in vivo* com a fração sináptica despoliarizada de córtex cerebral de rato na presença de  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM, Casalotti e colaboradores (2003) mostraram a proteólise intracelular da MV.

Provavelmente, a presença dos produtos de degradação na fração controle deve-se a algum problema na metodologia como, por exemplo, os inibidores de proteases utilizados, o tempo e as condições de incubação das frações sináptossomais. Sugere-se utilizar inibidores específicos de cisteína-protease para melhor proteger a preparação contra degradação proteica, uma vez que a calpaina atua sobre a essas enzimas clivando-as (Wang *et al.*, 1994).

A MV foi imunodetectada na fração 15% do gradiente de Percoll-sacarose (Fig. 08). Comparando-se a adição instantânea e a incubação com EGTA 2.5 mM e  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM por 30 minutos à temperatura ambiente não observou-se diferença no padrão de expressão. Além disso, verificou-se que, ao contrário da fração 3%, não houve diferença quando os ensaios foram realizados na presença de KCl 50 mM, uma vez que o polipeptídeo de Mr 190 kDa foi imunodetectado em todos os casos. Entretanto, a intensidade da marcação referente à MV visualmente diminuiu, indicando que esta proteína foi degradada e que, por

algum problema no sistema de detecção, os produtos de degradação não foram visualizados.

#### 4.6) Cortes de cérebro de rato em criostato

O perfil eletroforético das fatias de cérebro de rato preparadas de três maneiras diferentes pode ser observado na figura 9. Neste caso, observou-se que não houve alteração no perfil proteico independentemente do tampão utilizado para homogeneização dos tecidos.

O estudo de cortes de cérebro em criostato, homogeneizados e submetidos a uma bateria de condições é um método útil no entendimento dos aspectos de alteração sináptica e formação de memória. Teyler (1999) mostrou que a diversidade de métodos utilizados na preparação de cortes de cérebro pode refletir nos resultados finais, como por exemplo, as condições de incubação das fatias, dos aparelhos utilizados para obtenção dos cortes e a alteração na temperatura.

Por *immunoblot* detectou-se o fragmento de Mr 190 kDa referente à MV em fatias de cérebro de rato (Fig. 10). As fatias foram preparadas de três maneiras diferentes, em que a utilização somente de TCA proporcionou uma fraca visualização da banda polipeptídica quando comparada com a imunodeteção deste polipeptídeo utilizando-se o tampão de extração de MV ou quando se adicionou TCA a este. Assim, concluiu-se que a homogeneização do tecido diretamente no tampão de extração de MV mostrou-se mais eficiente devido à rapidez na homogeneização, evitando a degradação de proteínas; e quanto à especificidade do tampão de extração e purificação para MV, utilizado desde 1993 por Cheney e colaboradores.

A utilização deste tampão possibilitou uma melhor visualização da marcação correspondente à MV. Por outro lado, Bi e colaboradores (1998), na busca de imunodetectar o receptor NMDA em homogeneizados de fatias de telencéfalo de rato, utilizaram o tampão Tris-acetato contendo EGTA 0.1 mM e obtiveram resultados consistentes.

No *immunoblotting* das fatias de cérebro de rato incubadas com diferentes soluções observou-se que a MV foi imunodetectada em todos os casos (Fig. 11). Entretanto, a

Análises genômicas de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Cuenorhabditis elegans* revelaram que o primeiro apresenta duas classes V de miosina, enquanto que *C. elegans* pintainho pelo Laboratório de Bioquímica desta Universidade.

em cérebro de abelha. Já o anticorpo D foi obtido a partir da proteína nativa contra S<sub>5</sub> de imunodetectar MV em fração sináptica de abelha e Calábria (2004) imunolocalizar MV de maltose por Espreafico *et al.* (1992). Este mesmo anticorpo possibilitou Silva (2002) O anticorpo A foi produzido contra soro de coelho pelo método de proteína de fusão anticorpos A e D.

para detecção da MV, independentemente do animal a ser testado, foram os F; para coelho, A, B, D, E e K. Deste modo, podemos concluir que os melhores anticorpos em anexo): para abelha, A, B, D, J, K e L; para pintainho, A, D, E, F e L; para rato, A, D e Os anticorpos que melhor detectaram a MV foram (conforme a lista de anticorpos polipeptídeo, indicando ser os produtos de degradação das preparações.

13, 14, 15). Além disso, observou-se que todos os anticorpos detectaram mais de um apresentam diferença na especificidade de reação de acordo com o animal testado (Figs. 12, homogêneos de cérebro de abelha, pintainho, rato e coelho revelaram que os anticorpos acervo do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular realizados contra Os testes da reação cruzada dos anticorpos anti-cabeça MV que fazem parte do

#### 4.5) Teste da reação cruzada dos anticorpos

correspondente a porção C-terminal da cauda deste motor molecular (Casalotti, 2003). cálcio, proteólisa a MV localizada na região sináptica gerando um fragmento de 80 kDa. Outros experimentos sugerem que a calpaína endógena, ativada pelo influxo de

experimentos onde a concentração de cálcio foi diminuída pela adição de EGTA. observou-se que houve uma diminuição ou uma não detecção deste polipeptídeo em polipeptídeo de 80 kDa imunodetectado pelo anticorpo anti-cauda de MV. Além disso, presença de cálcio resulta, de acordo com o tempo de incubação, no aparecimento de um Casalotti (2003) mostrou que a despolarização de sinaptossomas com KCl 50 mM na padrão de detecção.

presença ou ausência de cálcio juntamente com a presença de KCl e Tween não alterou o



possui somente uma classe V de miosina de cadeia pesada. Em vertebrados, existem pelo menos três subclasses distintas de miosina. As três seqüências mais relacionadas da cadeia pesada de miosina, miosina de cérebro de galinha, gene *dilute* de camundongo e a miosina humana foram classificadas como MVa (Reck-Peterson, 2000).

A comparação das seqüências de RNA mensageiro e da expressão de proteínas para MVa, b e c demonstrou que as três isoformas de MV são expressas diferentemente (Mercer, 1991; Espreafico, 1992).

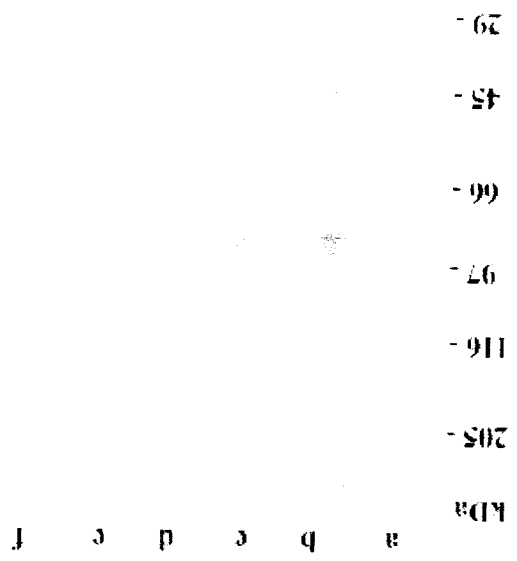
O domínio motor da MV e o primeiro motivo IQ são geralmente conservados entre a classe V de miosinas, enquanto que o domínio cauda globular é bastante divergente. Tal fato pode ser observado quando se compara o percentual de homologia entre a MVa *dilute* e o domínio motor, o primeiro motivo IQ e a cauda globular. Observou-se que há em *Drosophila* uma homologia de 54 % em relação ao domínio motor; 22% em relação ao primeiro motivo IQ e 24% em relação à cauda globular (Reck-Peterson, 2000).

Deste modo, a MV é uma proteína conservada de levedura a vertebrados e apresenta diferença de homologia entre vertebrados e invertebrados, portanto um anticorpo que detecta esta proteína em um animal pode detectá-la mais fracamente ou não detectá-la em um outro animal mais distante filogeneticamente.

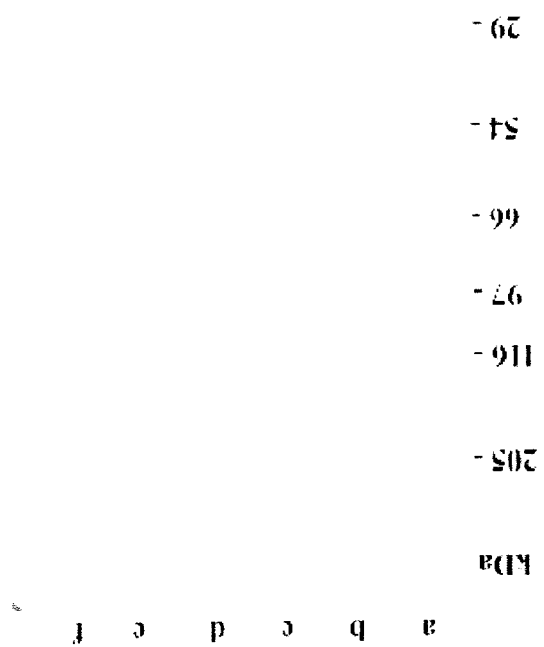
Fig. 01: Imunodeteccção de um polipeptídeo de 190 kDa correspondente a MV na fração sobrenadante (S1) de cérebro de abelha *Apis mellifera*, utilizando o anticorpo anti-cabeça de MV produzido contra proteína nativa de pintainho.

190 kDa - MV

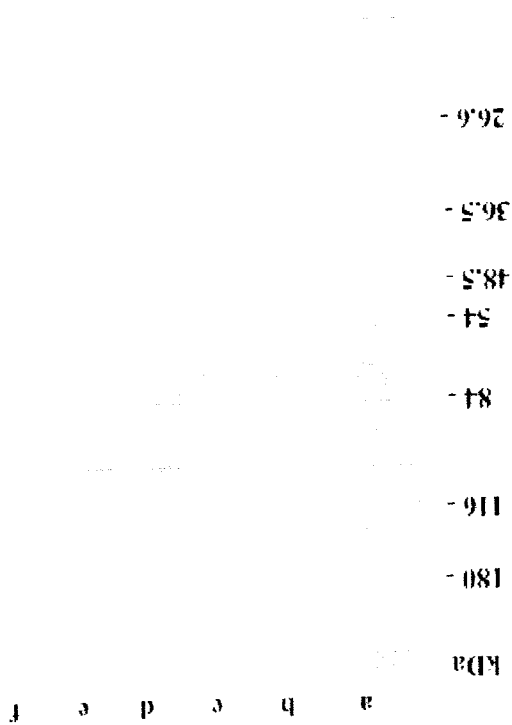
**Fig. 02: Perfil eletroforético das frações P<sub>2</sub> de cérebro de abelha *Apis mellifera* incubadas por 30 minutos com EGTA, cálcio e calpaina. a- fração P<sub>2</sub> controle; b- P<sub>2</sub> + EGTA 5 mM; c- P<sub>2</sub> + CaCl<sub>2</sub> 5 mM; d- P<sub>2</sub> + Calpaina 0.4 mg/mL; e- P<sub>2</sub> + EGTA 5 mM + Calpaina 0.4 mg/mL; f- P<sub>2</sub> + CaCl<sub>2</sub> 5 mM + Calpaina 0.4 mg/mL.**



**Fig. 03: Perfil eletroforético das frações P<sub>2</sub>TX de cérebro de abelha *Apis mellifera* incubadas por 30 minutos com EGTA, cálcio e calpaína. a- fração P<sub>2</sub>TX controle; b- P<sub>2</sub>TX + EGTA 5 mM; c- P<sub>2</sub>TX + CaCl<sub>2</sub> 5 mM; d- P<sub>2</sub>TX + Calpaína 0.4 mg/mL; e- P<sub>2</sub>TX + EGTA 5 mM + Calpaína 0.4 mg/mL; f- P<sub>2</sub>TX + CaCl<sub>2</sub> 5 mM + Calpaína 0.4 mg/mL.**



**Fig. 04: Imunodeteção na tração P<sub>2</sub> de proteínas do cérebro de abelha fosforiladas no resíduo serina, utilizando-se o anticorpo anti-fosferina. a- tração P<sub>2</sub> controle; b- P<sub>2</sub> + EGTA 5 mM; c- P<sub>2</sub> + CaCl<sub>2</sub> 5 mM; d- P<sub>2</sub> + Calpaína 0.4 mg/mL; e- P<sub>2</sub> + EGTA 5 mM + Calpaína 0.4 mg/mL; f- P<sub>2</sub> + CaCl<sub>2</sub> 5 mM + Calpaína 0.4 mg/mL.**



**Fig.05: Imunodeteccção na fração P<sub>2</sub>TX de proteínas do cérebro de abelha fosforiladas no resíduo treonina, utilizando-se o anticorpo anti-fosfotreonina. a- fração P<sub>2</sub>TX controle; b- P<sub>2</sub>TX + EGTA 5 mM; c- P<sub>2</sub>TX + CaCl<sub>2</sub> 5 mM; d- P<sub>2</sub>TX + Calpaína 0.4 mg/mL; e- P<sub>2</sub>TX + EGTA 5 mM + Calpaína 0.4 mg/mL; f- P<sub>2</sub>TX + CaCl<sub>2</sub> 5 mM + Calpaína 0.4 mg/mL.**

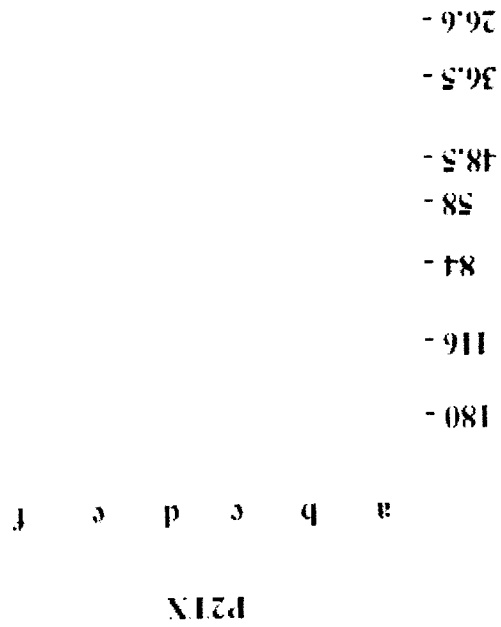
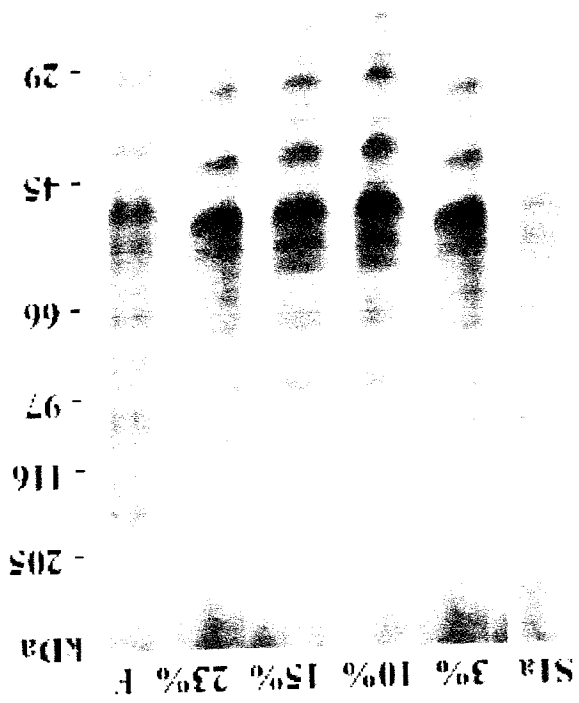
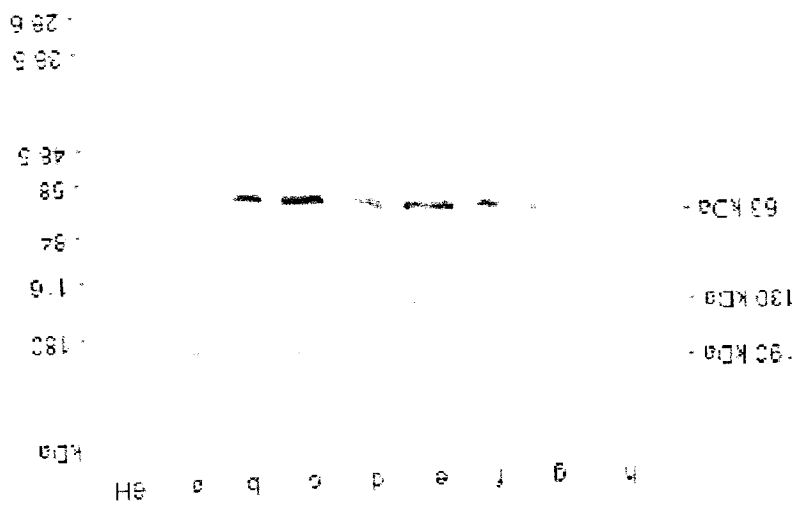


Fig. 06: Perfil eletroforético das frações sinaptossomais de cérebro de rato. S1a - Sobrenadante de cérebro de rato aplicado sobre o gradiente de Percoll-sacarose; 3%, 10%, 15%, 23% - frações coletadas do gradiente de Percoll-sacarose após centrifugação, F - fração de fundo coletada do gradiente de Percoll-sacarose após centrifugação.

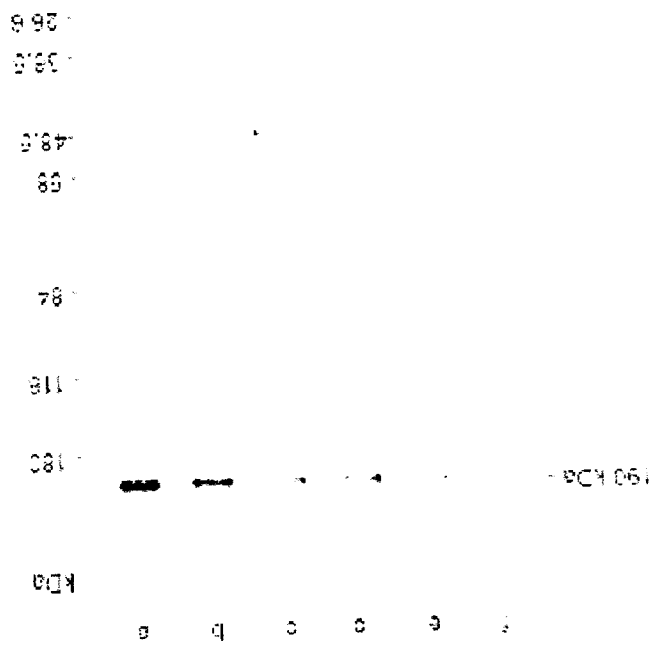


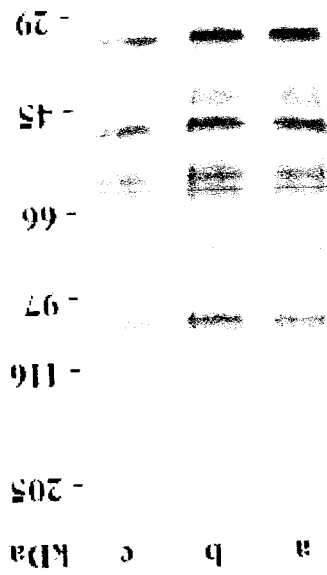
**Fig. 07: Imunodeteção da miosina V na fração 3% do gradiente de Percoll-sacarose, utilizando anticorpo anti-cabeça de MV produzido contra proteína nativa de pintainho. a- Fração 3% intacta; b- Fração 3% + EGTA 2.5mM; c- Fração 3% + CaCl<sub>2</sub> 2.5mM; essas amostras foram homogeneizadas instantaneamente após a preparação; d- Fração 3% controle; e- Fração 3% + EGTA 2.5mM; f- Fração 3% + CaCl<sub>2</sub> 2.5mM; g- Fração 3% + EGTA 2.5mM + KCl 50mM e h- Fração 3% + CaCl<sub>2</sub> 2.5mM + KCl 50mM, essas amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. 7B - Padrão de massa molecular relativa.**





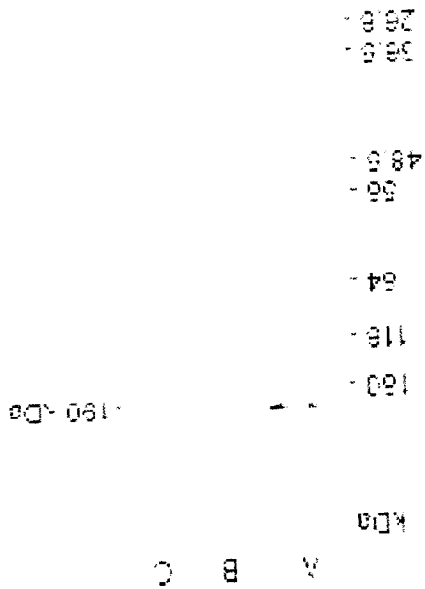
**Fig. 08: Imunodeteção da miosina V na fração 15% do gradiente de Percoll-sacarose, utilizando anticorpo anti-cabeça de MV produzido contra proteína nativa de pintainho. a- Fração 15% + EGTA 2.5mM; b- Fração 15% + CaCl<sub>2</sub> 2.5mM, essas amostras foram homogeneizadas instantaneamente após a preparação; c- Fração 15% + EGTA 2.5mM; d- Fração 15% + CaCl<sub>2</sub> 2.5mM; e- Fração 15% + EGTA 2.5mM + KCl 50mM; f- Fração 15% + CaCl<sub>2</sub> 2.5mM + KCl 50mM, essas amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente.**





**Fig. 09: Gel de eletroforese das fatias de cérebro de rato cortadas em crosstato. a- Homogeneização do tecido em tampão de extração de miosina-Va; b- Homogeneização das fatias em TCA 10%, seguida por centrifugação; c- Homogeneização do tecido em tampão de extração de miosina-Va e posterior precipitação com TCA 10%, seguida por centrifugação.**

**Fig. 10: Imunodeteccção da miosina V (190 kDa) nas fatias de cérebro de rato, utilizando anticorpo anti-cabeça de MV produzido contra proteína nativa de pintainho. a- Homogeneização do tecido em tampão de extração de miosina-Va; b- Homogeneização das fatias em TCA 10%, seguida por centrifugação; c- Homogeneização do tecido em tampão de extração de miosina-Va e posterior precipitação com TCA 10%, seguida por centrifugação.**



**Fig. 11: Imunodeteccção da miosina V em fatias de cérebro de rato incubadas com diversas soluções, utilizando o anticorpo anti-cabeça de MV produzido contra proteína nativa de pintainho. Seis fatias de cérebro de 20 µm foram incubadas respectivamente com as seguintes soluções: a- Tris-HCl 100 mM + EGTA 2.5 mM; b- Tris-HCl 100 mM + EGTA 2.5 mM + KCl 50mM; c- Tris-HCl 100 mM + EGTA 2.5mM + KCl 50 mM + Tween 20 0.05%; d- Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 2.5mM; e- Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM + KCl 50mM; f- Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 2.5mM + KCl 50mM + Tween 20 0.05%.**

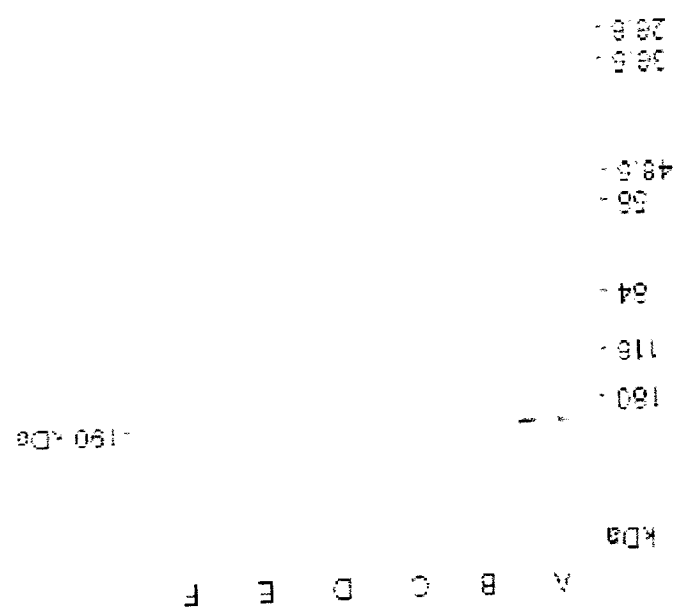
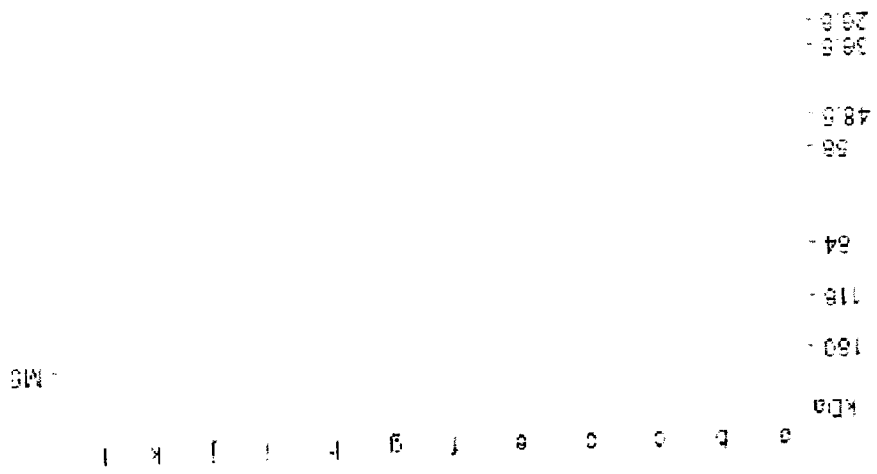
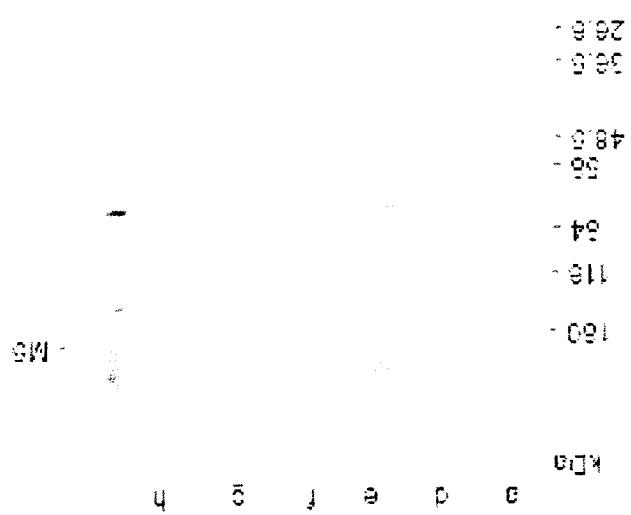


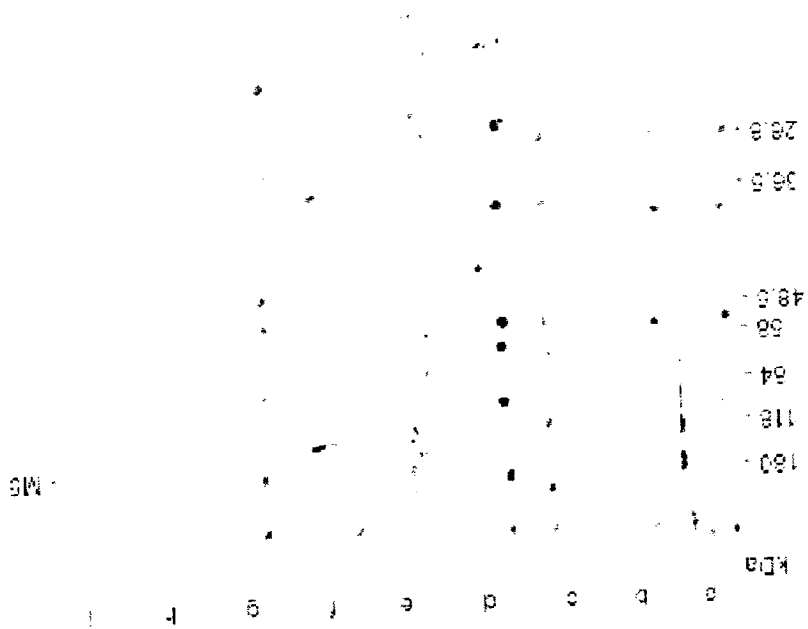
Fig. 12: Imunodeteccção de miosina V (MS) (190 kDa) em amostra de SI de cérebro de abelha *Apis mellifera* utilizando-se diferentes tipos de anticorpos anti-cabeça de miosina V. a- 200 µg/µl; b- 188 µg/µl; c- 373 µg/ml; d- α-head; e- α-head M; f- 254 µg/ml; g- Rato 289 µg/ml; h- Rato 118 µg/ml; i- α-MBP 1.25 µg/ml; j- ROY 106 µg/ml; k- Coluna 400 µg/ml; l- 265 µg/ml. Todos os anticorpos foram testados numa diluição de 1:500. À esquerda, padrão de massa molecular relativa.



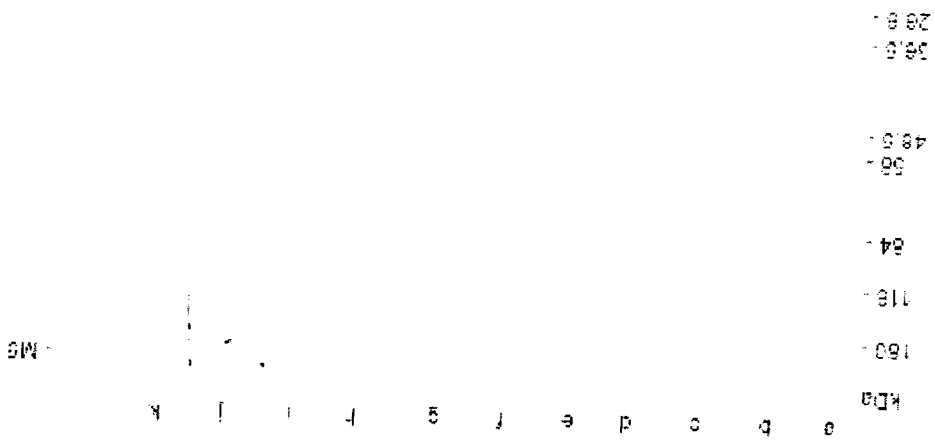
**Fig. 13: Immunodeteção de miosina V (190 kDa) em amostra de S5 de cérebro de pintainho utilizando-se diferentes tipos de anticorpos anti-cabeça de miosina V. A- 200 µg/µl; D-α-head; E-α-head M; F- 254 µg/ml; G- Rato 289 µg/ml; H- Rato 118 µg/ml; I- α-MBP 1.25 µg/ml. Todos os anticorpos foram testados numa diluição de 1:500. À esquerda, padrão de massa molecular relativa.**



**Fig. 14: Imunodeteção de miosina V (190 kDa) em amostra de P2 de cérebro de rato *Wistar* utilizando-se diferentes tipos de anticorpos anti-cabeça de miosina V. A- 200 µg/µl; B- 188 µg/µl; C- 373 µg/ml; D- α-head; E- α-head M; F- 254 µg/ml; G- Rato 289 µg/ml; H- Rato 118 µg/ml; I- α-MBP 1.25 µg/ml. Todos os anticorpos foram testados numa diluição de 1:500. À esquerda, padrão de massa molecular relativa.**



**Fig. 15: Imunodetección de miosina V (190 kDa) em amostra de SI de cérebro de coelho utilizando-se diferentes tipos de anticorpos anti-cabeça de miosina V. A- 200 µg/µl; B- 188 µg/µl; C- 373 µg/ml; D- α-head; E- α-head M; F- 254 µg/ml; G- Rato 289 µg/ml; H- Rato 118 µg/ml; I- α-MBP 1.25 µg/ml; J- ROY 106 µg/ml; K- Coluna 400 µg/ml; L- 265 µg/ml. Todos os anticorpos foram testados numa diluição de 1:500. À esquerda, padrão de massa molecular relativa.**





**Tabela 03: Lista dos antígenos de laboratório testados contra tecido nervoso de abelha, pintainho, rato e coelho.**

Anticorpo	Identificação	Fonte	Animal	Identificação no laboratório
Anti-cabeça de MV 200 µg/µl	A	Proteína de fusão ligante de maltose – 2ª coluna	coelho	Verde
Anti-cabeça de MV 188 µg/µl	B	Proteína de fusão ligante de maltose – 2ª coluna	coelho	Azul
Anti-cabeça de MV 373 µg/ml	C	Proteína de fusão ligante de maltose (Yale) – 2ª coluna	coelho	Vermelho
Anti-cabeça de MV [X] µg/µl	D	Proteína nativa	pintainho	α-head tinta azul
Anti-cabeça de MV [X] µg/µl	E	Proteína de fusão ligante de maltose – 2ª coluna	coelho	α-head M tubo grande
Anti-cabeça de MV 254 µg/ml	F	Proteína de fusão ligante de maltose – 2ª coluna	coelho	α-head M5 254 µg/ml
Anti-cabeça de MV 289 µg/ml	G	Proteína de fusão ligante de maltose – 2ª coluna	rato	Anti-head M5 rato 289 µg/ml
Anti-cabeça de MV 118 µg/ml	H	Proteína de fusão ligante de maltose – 2ª coluna	rato	Anti-head M5 rato 118 µg/ml
Anti-cabeça de MV (α-MBP) 1.25 µg/ml	I	Proteína de fusão ligante de maltose – 1ª coluna	coelho	α-MBP-head 1.25 µg/ml
Anti-cabeça de MV 106 µg/ml	J	Proteína nativa	pintainho	α-head M5 106 µg/ml rótulo azul
Anti-cabeça de MV 400 µg/ml	K	Proteína nativa	pintainho	α-head M5 400 µg/ml coluna
Anti-cabeça de MV 265 µg/ml	L	Proteína de fusão ligante de maltose – 2ª coluna	coelho	α-head M5 265 µg/ml

## 5. CONCLUSÃO

- A obtenção de frações enriquecidas em membranas ( $P_2$  e  $P_2TX$ ) de cérebro de abelha *Apis mellifera*;
- A análise do perfil eletroforético das proteínas da fração  $P_2$  mostrou que a calpaina modifica o padrão de proteínas do cérebro da abelha *Apis mellifera*, já na fração  $P_2TX$  essa alteração no perfil eletroforético só ocorre na presença de calpaina e EGTA;
- A análise do da fração revelou que modifica o padrão de proteínas do cérebro da abelha *Apis mellifera*;
- O cálcio, calpaina e EGTA influenciam na fosforilação do resíduo serina de proteínas da fração  $P_2$ , abrindo perspectivas para a identificação destas proteínas fosforiladas, enquanto que na fração  $P_2TX$  as proteínas fosforiladas no resíduo treonina não são influenciadas pela presença de EGTA e calpaina;
- A obtenção de sinaptosomas de cérebro de rato a partir do protocolo de Dunkley (1987), gerando possibilidades de aprofundamento no estudo de sinaptosomas de cérebro de rato, assim como a obtenção de sinaptosomas de outros animais;
- A padronização da preparação de fatias de cérebro de rato por congelamento para a imunodeteção da MV;
- A implantação de uma nova técnica no laboratório que poderá abrir perspectivas de estudos *in situ*;
- A identificação dos melhores anticorpos contra MV para cada animal experimental utilizado no Laboratório auxiliará na realização de vários experimentos que utilizam os anticorpos anti-MV possibilitando a obtenção de resultados mais rápidos e precisos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANKSTER, Y.; HUIZING, M.; ANDERSON, P.D.; FITZPATRICK, D.L.; KTLAR, A.; GROSS-KIESELSTEIN, E.; BERKUN, Y.; SHAZBERG, G.; GAHL, W.A.; HURVITZ, H. Evidence that Griscelli syndrome with neurological involvement is caused by mutations in RAB27A, not MYO5A. *American Journal Human Genetics*. v. 71. p. 1237-1238. 2002.
- ARIYOSHI, H.; SHIBA, E.; KAMBAVASHI, J.; SAKON, M.; KAWASAKI, T.; YOSHIDA, K.; MORI, T. Stimulation of human platelet  $Ca^{2+}$ -ATPase and  $Ca^{2+}$  restoration by calpain. *Cell Calcium*. v. 14. p. 455-463. 1993.
- AUGUSTINE, J.R. Immunocytochemical staining of GABA in the insular lobe of the savanna baboon: a light microscopic study. *Brain Research*. v. 424. p. 352-360. 1987.
- BI, X.; RONG, Y.; CHEN, J.; DANG, S.; WANG, Z.; BAUDRY, M. Calpain-mediated regulation of NMDA receptor structure and function. *Brain Research*. v. 790. p. 245-253. 1998.
- BLANCHARD, H.; GROSCHULSKI, P.; LI, Y.; ARTHUR, J.S.C.; DAVIES, P.L.; ELCE, J.S.; CYLER, M. Structure of a calpain  $Ca^{2+}$ -binding domain reveals a novel EF-hand and  $Ca^{2+}$ -induced conformational changes. *Natural Structural Biology*. v. 4. p. 532-538. 1997.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analyses Biochemical*. v. 72. p. 248-254. 1976.
- CALABRIA, L.K. *Análise bioquímica e morfológica do cérebro da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) com enfoque na miosina V*. 2004. f. 89. Monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Uberlândia, 2004.
- CAMMAROTA, M.; BEVILÁQUA, L.R.; VIOLA, H.; KERR, D.S.; REICHMANN, B.; TEIXEIRA, V.; BULLA, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Participation of CaMK-II in neuronal plasticity and memory formation. *Cell Molecular Neurobiology*. v. 3. p. 259-267. 2002.

- CAPALDI, E. A.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. (1999) Neuroethology of spatial learning: the birds and the bees. *Annu. Ver. Psychol.*, 50:651-682.
- CASALETTI, L. **Caracterização da participação da miosina V e de proteínas associadas em eventos sinápticos**. 2002. f. 93. Tese (Doutorado em Morfologia – Biologia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2002.
- CASALETTI, L.; TAVUHATA, S.; MOREIRA, J.; LARSON, R. Myosin – Va proteolysis by  $Ca^{2+}$ /calpain in depolarized nerve endings from rat brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, p.159-164, 2003.
- CAYRE, M. (1998) Adult insect mushroom body neurons in primary culture: cell morphology and characterization of potassium channels. *Cell Tissue Res.*, 291:537-547.
- CHENEY, R.E.; O'SHEA, M.K.; HEUSER, J.E.; COELHO, M.V.; WOLENSKI, J.S. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell*, v. 75, p.13-23, 1993.
- CHEUNG, W. Y. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*, v. 207, p. 19-27, 1980.
- COELHO, M.V.; LARSON, R.E.  $Ca^{2+}$ -dependent phosphorylation of the tail domain of myosin V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v. 26, p. 465-472, 1993.
- COLBRAN, R.J. Inactivation of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II by basal autophosphorylation. **Journal Biological Chemistry**, v. 268, p. 7163-7170, 1993.
- COSTA, M.C.R.; SANTORO, JR., W.; ESPREAFICO, E.M AND LARSON, R.E. Brain myosin-V binds to calmodulin-dependent protein kinase-II and activates its phosphorylating activity. *Molecular Biology of the Cell*, 7 (supplement):373a, 1996.

- COSTA, M. C. R.; MANI, F.; SANTORO, JR. W.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, R. E. Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity. *J. Mol. Hem.*, 274:15811-15819, 1999.
- CROALL, D.E.; DEMARTINO, G.N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiology Review*. v. 71. p. 813-847. 1991.
- DOMANSKA-JANIK, K.; ZABLOCKA, B.; ZALEWSKA, T.; ZAJAC, H. Phosphorylation of protein kinase C substrate proteins in rat hippocampal slices – effect of calpain inhibition. *Acta Neurobiological Experiments*. v. 58. p. 247-252. 1998.
- DUNKLEY, P.R.; HATH, J.W.; HARRISON, S.S.; JOARVIE, P.E.; GLENFIELD, P.J.; ROSTAS, A.P. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S<sub>1</sub> fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Research*. v. 441. p. 59-71. 1998.
- EDELMANN, L., P.I. HANSON, E.R. CHAPMAN, AND R. JAHN. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.)* 1. 14: 224-23. 1995.
- ESPINDOLA, F. S.; ESPREAFICO, E. M.; COELHO, M. V.; MARTINS, A. R.; COSTA, F. R. C.; MOOSEKER, M. S.; LARSON, R. E. (1992) Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin binding myosin. *Journal Cell Biol.* 118:359-368.
- ESPINDOLA, F. S.; SUTE, D. M.; PARTATA, L. B. E.; CAO, T.; WOLENSKI, J. S.; CHENEY, R. E.; KING, S. M.; MOOSEKER, M. S. (2000) The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulina, myosin-II essential light chains, and 8 kDa dynein light chain/PIN. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 47:269-281.
- ESPREAFICO, E.M.; CHENEY, R.E.; MATTEOLI, M.; NASCIMENTO, A.A.C.; DE CAMILLI, P.V.; LARSON, R.E.; MOOSEKER, M.S. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-v (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *Journal Cell Biology*. v. 119. p. 1541-1557. 1992.

- EVANS, L. L.; HAMMER, J.; BRIDGMAN, P. C. (1997) Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from *dilute-lethal* neurons. *J. Cell Science*, 110:439-449.
- EVANS, J. D.; WHEELER, D. E. (1998) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:5575-5580.
- EVENÄS, J.; MALMENDAL, A.; FÖRSEN, S. Calcium. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.2, p.293-302.1998.
- FENT, K.; WEHNER, R. (1985) Ocelli : A celestial compass in the desert ant *Cataglyphis*. *Science*, 228:192-194.
- FRAGIONI, J.; ODA, A.; SMITH, M.; SALZMAN, E.; NEEL, B. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTB-1B) in human platelets. **EMBO Journal**. v. 12, p. 4843-4856. 1993.
- GIURFA, M. (2003) Cognitive neuroethology: dissecting non-elementar learning in a honeybee brain. *Curr. Neurobiol.*, 13:726-735.
- GOLDBERG, J.; NAIRN, A.C.; KURIYAN, J. Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. **Cell**. v. 84, p. 875-887. 1996.
- GRÜNBAUM, L.; MÜLLER, U. (1998) Induction of a specific olfactory memory leads in a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J. Neuroscience*, 18:4384-4392.
- HINTON, R.H. & MULLOCK, B.M. Isolation of subcellular fractions. In: **Subcellular Fractionation – A practical approach**. GRAHAM, J.M. & RICKWOOD, D. v.173, p.339. Oxford University Press. ISBN: 0-19-963494-7. 1996.

- KAMIKOUCHI, A.; TAKEUCHI, H.; SAWATA, M. NATORI, S.; KUBO, T. (2000) Concentrated expression of Ca<sup>++</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in Mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.*, 417:501-510.
- KANDEL, E.R.; ABRAMS, T.; BERNIER, L.; CAREW, T.J.; HAWKINS, R.D.; SCHWARTZ, J.H. Classical conditioning and sensitization share aspects of the same molecular cascade in *Aplysia*. *Cold Spring Harb Symposium Biology*. v. 48. p. 821-830. 1983.
- KUO, W.; GANESAN, U.; WALBEY, D.; DABIS, D.; ALLEN, K.; MCCALL, L. Modulation of the activity of calpain II by phosphorylation-changes in the proteolysis of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Applied Theoretic Electrophoresis*. v. 3. p. 317-320. 1993.
- LAEMMLI, U.K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Journal Molecular Biology*. v. 80. p. 575-599. 1973.
- LANGFORD, G.M.; MOLYNEAUX, B.J. Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Research Reviews*. v. 28. p. 1-8. 1998.
- LARSON, R. E., ESPINDOLA, F. S., AND ESPREAFICO, E. M. Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neurochem*. 54, 1288-1294. 1990.
- LISMAN, J.; SCHULMAN, H.; CLINE, H. The molecular basis of CaMK-II function in synaptic and behavioural memory. *Nature Review Neuroscience*. v. 3. p. 175-190. 2002.
- LUKAS, T.J.; HAIECH, J.; LAU, W.; CRAIG, T.A.; ZIMMER, W.E.; SHATTUCK, R.L.; SHOEMAKER, M.O.; WATTERSON, D.M. Calmodulin and calmodulin-regulated protein kinases as transducers of intracellular calcium signals. *Cold Spring Harb Symposium Biology*. v. 53. p. 185-193. 1988.
- LYNCH, G.; BAUDRY, M. The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science*. v. 224. p. 1057-1063. 1984.

- MANI, F.; ESPREAFICO, E.M.; LARSON, R.E. Myosin-V is present in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, v. 27, p. 2639-2643, 1994.
- MCINTOSH, T.K.; SAATMAN, K.E.; RAGHUPATHI, R. Calcium and the pathogenesis of traumatic CNS injury: cellular and molecular mechanisms. *Neuroscientist*, v. 3, p. 169-175, 1997.
- MELLGRÉN, R.L. Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *Journal FASEB*, v. 2, p. 110-115, 1987.
- MELLONI, E.; SALAMINO, F.; SPARATORE, B. The calpain-calpastatin system in mammalian cells properties and possible functions. *Biochemistry*, v. 67, p. 217-223, 1992.
- MENZEL, R.; GIURFA, M. (2001) Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn. Sci.*, 5:62-71.
- MERCER, J. A.; SEPERACK, P. K.; STROBEL, M. C.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A. (1991) Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*, 349:709-713.
- MORAES, V. R. A., CALABRIA, L. K., TEIXEIRA, R. R., ESPINDOLA, F. S. Brain myosin V and CamK-II identification in the honeybee *Apis mellifera* and comparative analysis with vertebrates In: **Encontro Anual de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia da UFMG**, 2003, Belo Horizonte/MG, p.35 – 36.
- MURACHI, T. Calpain and Calpastatin. *Tibs. May*, p. 167-169, 1983.
- NASCIMENTO, A.A.C.; CHENEY, R.E.; THAUATA, S.B.F.; LARSON, R.E.; MOOSERKER, M.S. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin V. *Journal Biological Chemistry*, v. 132, p. 1053-1060, 1996.
- NÄSSEL, D. R.; HOLMÖVIST, M.H.; HARDIE, R.C.; HAKANSON, R.; SUNDLER, F. Histamine-like immunoreactivity in photoreceptors of the compound eyes and ocelli of the flies *Calliphora erythrocephala* and *Musca domestica*. *Cell Tissue Research*, v. 253, p. 639-646, 1987.



- NÄSSEL, D. R.; HELGEE, A.; SIVASUBRAMANIAN, P. (1986) Development of axon paths of motoneurons after removal of target muscles in holometabolous insect. *Brain Res*, 391:211-219.
- NÄSSEL, D. R. (1993) Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell Tissue Res*, 273:1-29.
- NUNES, F.M.; VALENTE, V.; SOUSA, J.F.; CUNHA, M.A.; PINHEIRO, D.G.; MAIA, R.M.; ARAUJO, D.D.; COSTA, M.C.; MARTINS, W.K.; CARVALHO, A.F.; MONESI, N.; NASCIMENTO, A.M.; PEIXOTO, P.M.; SILVA, M.F.; RAMOS, R.G.; REIS, L.F.; DIAS-NETO, E.; SOUZA, S.J.; SIMPSON, A.J.; ZAGO, M.A.; SOARES, A.E.; BITONDI, M.M.; ESPREAFICO, E.M.; ESPINDOLA, F.S.; PACO-LARSON, M.L.; SIMOES, Z.L.; HARTFELDER, K.; SILVA, W.A. J. The use of Open Reading frame ESTs (ORFESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. **BMC Genomics**, v. 5, p. 1-84, 2004.
- OHYAMA, A.; KOMIYA, Y and IGARASHI, M. (2001) Globular tail of myosin V is bound to vamp/synaptobrevin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280:988-991.
- OLESKEVICH S.; CLEMENTS J. D. SRINIVASAN, M. V. J. (1997) Long-term synaptic plasticity in the honeybee. *J. Neurophysiol.*, 78:528-32.
- PEIXOTO, P. M. V. (2002) Localização de miosina-V e cadeia leve de dineína em diferentes regiões do cérebro de *Apis mellifera*. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG.
- PEIXOTO, P.M.V. **Localização de miosina V e cadeia leve de dineína em diferentes regiões do cérebro de *Apis mellifera***. 2002. f. 58. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, 2002.
- PEREZ-TERZIC, C.; JACONI, M.; CLAPHAM, D. Nuclear calcium and the regulation of the nuclear pore complex. **Bioessays**, v. 19, p. 787-792, 1997.
- PREKERIS, R.; TERRIAN, D.M. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: Evidence for a Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *Journal Cell of Biology*, v. 137, p. 1589-1601, 1997.

- RECK-PETERSON, S. L.; PROVANCE, D. W.; MOOSEKER, M. S.; MERCER, J. A. (2000) Class V myosins. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1:36-51.
- SAZONTOVA, T.G.; MATSKEVICH, A.A.; ARKHIPENKO, Y.V. Calpains: physiological and pathophysiological significance. *Pathophysiology*. v.6. p.91-102. 1999.
- SILVA, M. F. R.; DINIZ, A. A. S.; MARTINS, A. R.; CALÁBRIA, L. K.; TEIXEIRA, R. R.; Peixoto, P.M.V.; ESPINDOLA, F. S. Myosins V and VI localization in brain tissue and synaptosomes fractions of the honeybee *Apis mellifera*. In: **42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting**, 2002, San Francisco, CA.
- SILVA, M. F. R. (2003) Cérebro e sistema sensorial de *Apis mellifera*. Localização de miosina VI e preparação de uma fração enriquecida em sinaptosomas. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG.
- SNODGRASS, R. E. (1956) in *Anatomy of the honey bee*. (Comstock Publ. Ass. N. Y., USA).
- SODERLING, T.R. Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains. *Journal Biological Chemistry*. v. 265. p. 1823-1826. 1990.
- SPYRACOPOULOS, L.; LI, M.X.; SIA, S.K.; GAGNES, S.M.; CHANDRA, M.; SOLARO, R.L.; SYKES, B.D. Calcium-induced structural transition in the regulatory domain of human cardiac troponin C. *Biochemistry*. v. 36. p. 12138-12146. 1997.
- SUZUKI, H. Calcium activated neutral protease: domain structure and activity regulation. *Tibs*. v. 12. p. 105-107. 1987.
- TAN, S.E.; LIANG, K.C. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain Research*. v. 711. p. 234-240. 1996.
- TEYLER, T.J. Use of brain slices to study long-term potentiation and depression as examples of synaptic plasticity. *Methods: A companion to methods in Enzymology*. v.18. p.109-116. 1999.

- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Protocol National Academic Science, USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- VALE, R. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, v.112, p.467-480, 2003.
- VITAL DOS SANTOS, D.; TAUHATA, S.B.F.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J. & LARSON, R.E. Determination of the second calpain cleavage site in brain myosin-V. **In: Resumos XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, v.04, p. 121, 1999.
- WANG, K.K.; VILLALOBO, A.; ROUFOGALIS, B.D. Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Journal of Biochemistry*, v. 262, p. 693-706, 1989.
- WANG, K.K.W.; YUEN, P.W. Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends Pharmacological Science*, v. 15, p.412-419,1994.
- WALKER, J.M. **The Protein Protocols Handbook**. Humana Press Inc. USA, 1996. ISBN 0-89603-339-2.
- WAXMAN, L.; KREBS, E.G. Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *Journal Biology Chemistry*, v. 253, p. 5888-5891, 1978.
- WEBER, K.; OSBORN, The Reability of molecular weight determinations by doceily sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal Biological Chemistry*, v.244, p.4406-4412, 1969.
- WHITFIELD, C.W.; BAND, M.R.; BONALDO, M.F.; KUMAR, C.G.; LIU, L.; PARDINAS, J.R.; ROBERTSON, H.M.; SOARES, M.B.; ROBINSON, G.E. Annotated expressed sequence tags and

cDNA microarrays for studies of brain and behavior in the honey bee. **Genome Research**. v. 4. p. 555-566. 2002.

WINSTON, M. L. (1987) in *The Biology of the Honey Bee* (Harvard Univ. Press, Cambridge):

WOLFMAN, C.; FIN, C.; DIAS, M.; BIANCHIN, M.; DA SILVA, R.C.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Intrahippocampal or intramygdala infusion of KN62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. **Behavioural Neural Biology**. v. 61. p. 203-205. 1994.