

MON
595.149-115
0420
TES/MEM

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL
NA DIVISÃO DE TRABALHO EM *Apis mellifera*
LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) POR
DDRT-PCR

WALDESSE PIRAGÉ DE OLIVEIRA JR

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica, área de concentração Genética.

DIRBI/UFU



1000187156

Uberlândia – Minas Gerais – Brasil
Março de 1999

Dedicatória

Dedico carinhosamente este trabalho.....

.....Aos **meus pais, Sr. Waldesse e D. Mair**, pelo exemplo de vida, pelo amor eterno, pelo carinho e respeito e, principalmente, pelo apoio durante os momentos tristes e difíceis. Enfim, por tudo que realizaram e realizam em minha vida, para que eu possa, quem sabe um dia, tornar-me um Homem digno, como eles foram para mim.....

.....obrigado por me tornarem parte de suas vidas, Amo vocês.

.....Ao anjo que me apresentou o Amor, à minha **Princesa Jaqueline**, minha **Pititinha** que sempre esteve e está ao meu lado. Pelos momentos felizes que me proporcionou. Seu amor, sua simplicidade, carinho, suas críticas, sua paciência e disposição tornaram possível mais essa realização. Dedico essa pequena parte da minha vida ao espírito iluminado que me fez acreditar que construirei um castelo e nele viverei e morrerei feliz sabendo que fui digno, honesto e amado.....

.....Por ser forte nos meus dias de fraqueza e pelas suas lágrimas, que se juntaram às minhas nos muitos momentos, difíceis e felizes, te dou meu respeito e gratidão. És pititinha, mas sua força me faz sentir invencível. Junto de você sinto que vencerei. Por tudo isso, só tenho o meu amor para lhe pagar.....

.....Amo você.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à DEUS, por ter me dado o dom da vida e me proporcionado compartilhar essa com várias pessoas maravilhosas, como meus amigos.

Aos meus amigos Elisângela, Edivane, Junior, Kleber e Marcus, por continuarem comigo e me ajudarem em mais essa etapa.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Malcon, Prof. Dr. Luiz Ricardo e Prof. Dr. Rodolpho Satrapa, por acreditarem em mim e me conduzirem até aqui, com paciência, respeito e carinho.

Aos meus vários amigos dos Laboratórios de Genética Molecular e Genética, pela força, apoio e confiança. Em especial ao grupo do Prof. Dr. Luis Ricardo, que me receberam com carinho, paciência e me ensinaram muito do que sei.

MUITO OBRIGADO!!

COMISSÃO JULGADORA

MEMBROS TITULARES

Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo
Orientador

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Co-Orientador

Prof. Dr. Rodolpho Satrapa

MEMBROS SUPLENTES

Prof^a. Dra. Ana Maria Bonetti

Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

**Uberlândia – Minas Gerais - Brasil
Março de 1999**

ÍNDICE

ABREVIACÕES.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Apidae.....	1
1.2. A <i>Apis mellifera</i>	1
1.3. A divisão de trabalho em <i>Apis mellifera</i>	2
1.4. Genes X Comportamento.....	6
1.5. Transcrição reversa.....	7
1.6. Reação em cadeia da polimerase.....	8
1.7. Differential Display-Reverse Transcriptase-PCR (DDRT-PCR).....	9
1.8. Aplicações do DDRT-PCR e refinamento da técnica.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. Material biológico.....	15
2.2. Extração do RNA total.....	17
2.3. Eletroforese do RNA total.....	18
2.4. Tratamento do RNA total.....	19
2.5. Quantificação e qualificação do RNA total.....	19
2.6. Differential Display-Reverse Transcriptase -PCR.....	20
2.7. Análise do gel.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4. CONCLUSÕES.....	42
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

ABREVIACÕES

μ l	microlitro(s)
ABS	absorbância
MgCl ₂	cloreto de magnésio
dNTP	dexoxirribonucleotídeo(s) trifosfato
dATP	5'- desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'- desoxicitosina trifosfato
dGTP	5'- desoxiguanosina trifosfato
dTTP	5'- desoxitimidina trifosfato
RNA	ácido ribonucléico
RNA-m	ácido ribonucléico mensageiro
DNA	ácido desoxirribonucléico
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
M	molar
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
μ M	micromolar
ng	nanograma
³² P	fósforo 32 radioativo
³³ P	fósforo 33 radioativo
³⁵ S	enxofre 35 radioativo
pb	pares de base
pmol	pico-mol
rpm	rotações por minuto
U	unidade(s)
UV	ultra-violeta
V	volts
cm	centímetro(s)
mm	milímetro(s)
nm	nanômetro(s)
DEPC	Dietilpirocarbonato
KCl	Cloreto de potássio

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema mostrando a estratégia básica da técnica do DDRT-PCR.....12
- Figura 2:** Gráfico representando a distribuição de tarefas durante os 30 dias de vida adulta das operárias observadas na colmeia. Trab.= trabalho Qtde = quantidade.....24
- Figura 3:** Gráfico representando as principais tarefas desempenhadas por operárias durante os dias específicos de coleta para extração de RNA total.....26
- Figura 4:** Fotos mostrando o crescimento de bactérias das amostras tratadas ou não com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2,5%. A- Experimento completo com controle positivo e controle negativo. B- Amostras maceradas e inteiras tratadas. T= tórax. C= cabeça. 1= controle negativo sem a amostra; 2= tecidos macerados com e sem tratamento de hipoclorito; 3= material tratado com álcool; 4= controle positivo (sem tratamento); 5= tecidos macerados com e sem tratamento de álcool; 6= tecidos íntegros com e sem tratamento de álcool; 7= tecidos íntegros com e sem tratamento de hipoclorito.....27
- Figura 5:** Fotos mostrando o padrão de extração do RNA total de abelhas de 1 dia de idade em gel de agarose 2%. A, C e E- utilizou-se o protocolo descrito por Chomczynski. B, D e F-

usou-se o protocolo descrito por Klementz. M= marcador de 100 pb. Setas mostram contaminação por DNA.....28

Figura 6: Fotos mostrando padrão de extração de RNA total, utilizando-se TRIZOL REAGENT, de abelhas de 1 dia (C 1), 5 dias (A 1 e 2), 15 dias (C 2) e 25 dias (B 1). M = marcador de 100 pb.....29

Figura 7: Gel de poliacrilamida 6% não desnaturante mostrando a comparação entre os diferentes padrões de amplificação e detecção quando foi utilizado o “primer” T₁₂GC (1-3) e T₁₈VN (4-6). Diferentes “primers” arbitrários também foram utilizados: 1 e 4- OPA 05; 2 e 5- OPA 16; 3 e 6- OPA 17. 7 e 8- reações de controle negativo. M- marcador de 100 pb.....31

Figura 8: Géis de poliacrilamida mostrando diferentes padrões de bandas entre o gel desnaturante (A) e o não desnaturante (B), utilizando os “primers” arbitrários OPA 14 (1 a 6) e OPA18. M= marcador de 100pb.....32

Figura 9: Géis de poliacrilamida evidenciando os padrões de banda para: A= Gel 10 % e B= Gel 6%. M= marcador de 100 pb. Br.= branca, reação controle negativo. As setas indicam algumas bandas para comparação.....33

Figura 10: Gel de poliacrilamida 10% não desnaturante mostrando o padrão diferenciado de fragmentos da amplificação utilizando os “primers” arbitrários OPA 16 (1 a 8) e OPA 17 (9 a 16). 1 e 9= abelhas de 1 dia, 2 e 10= 5 dias, 3 e 11= 10 dias, 4 e 12= 15 dias, 5 e 13= 20 dias, 6 e 14= 25 dias, 7 e 15= 30 dias, 8 e 16= controles negativos. M= marcador de 100pb. Setas indicam fragmentos diferencialmente expressos.....34

Figura 11: Gel de poliacrilamida 10% não desnaturante mostrando o padrão diferenciado de fragmentos da amplificação utilizando os “primers” arbitrários OPA 08 (1 a 7) e OPA 12 (7 a 14). 1 e 7= abelhas de 1 dia, 8= 5 dias, 2 e 9= 10 dias, 3 e 10= 15 dias, 4 e 11= 20 dias, 5 e 12= 25 dias, 6 e 13= 30 dias, 14= controle negativo. M= marcador de 100pb. Setas indicam bandas diferenciadas.....37

Figura 12: Gel de poliacrilamida 10% não desnaturante mostrando o padrão diferenciado de fragmentos da amplificação utilizando os “primers” arbitrários OPA 14 (1 a 6) e OPA 18 (7 a 13). 1 e 7= abelhas de 1 dia, 2 e 8= 10 dias, 3 e 9= 15 dias, 4 e 10= 20 dias, 5 e 11= 25 dias, 6 e 12= 30 dias, B = controle negativo. M= marcador de 100pb. Setas indicam bandas diferenciadas.....39

RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* existem há cerca de 100 milhões de anos, sendo que a sua importância para o homem começou a ser definida em 2.400 a.C. com o início da apicultura no antigo Egito. Atualmente, as abelhas são encontradas em vários ambientes, exceto no deserto do Saara e nas geleiras dos Pólos Norte e Sul. A colônia de *Apis* é uma das realizações mais notáveis da natureza, pois é extremamente organizada e é fundamentada numa divisão de trabalho bem definida. Vários estudos foram feitos para esclarecer essa divisão, no entanto, pouco se sabe sobre os seus mecanismos de regulação molecular. A técnica Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR), descrita por Liang em 1992, é hoje a mais eficiente para identificar e isolar genes diferencialmente expressos numa determinada condição. Assim, esse trabalho visa otimizar a extração de RNA total de *Apis mellifera*, bem como otimizar o DDRT-PCR com a coloração por nitrato de prata, no que se refere à expressão gênica diferencial dessa espécie na sua divisão de trabalho. Nesse estudo, foram realizadas sessenta horas de observações para caracterizar a divisão de trabalho numa colmeia de observação. Paralelamente, foram coletadas amostras de abelhas com 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de vida adulta, para posterior extração do RNA total. Foi realizada então, a transcrição reversa e, em seguida, foi feita a amplificação do cDNA combinando um “primer” oligo d(T) com seis “primers” arbitrários OPA (10 pb). Dessa forma, foram realizados vários testes para se obter a otimização completa da técnica. Além disso, a mesma foi otimizada utilizando a marcação não radioativa por nitrato de prata. Os

resultados encontrados mostraram polimorfismos que variaram entre os grupos de idade, para cada combinação de “primers”. Os “primers” OPA 08, OPA17 e OPA18 permitiram detectar um maior número de fragmentos que os demais (OPAs 12, 14 e 16). Esses fragmentos apresentavam-se, em sua maioria, entre 100 e 900 pb e vários deles estavam presentes em idades específicas. Das bandas diferenciadas, detectadas pela presença ou ausência em determinada idade ou pela sua variação na intensidade, destacam-se: três fragmentos (100, 200 e 300 pb) que podem estar relacionados à função de nutriz ou de faxineira (1^o ao 5^o dia); um com cerca de 350 pb presente somente no 15^o dia, que pode indicar associação com produção de cera e construção de favos e um último de 600 pb, presente em todas as idades, porém apresentando maior intensidade do 5^o ao 15^o dia, pode também ter relação com a construção de favos. Isso mostrou que a técnica foi realizada com sucesso e a coloração por prata pode ser adotada como uma alternativa à marcação radioativa no DDRT-PCR.

1 - INTRODUÇÃO

1.1. Apidae

A classe Insecta representa o grupo de seres vivos dominantes na Terra, apresentando um número de indivíduos maior que a soma de todos os outros animais existentes no planeta e ocorrendo em quase todos os ambientes. Dentro dessa classe, a superfamília Apoidea, com 9 famílias, destaca-se por apresentar espécies com comportamentos sociais de diferentes níveis e por suas múltiplas relações com plantas e animais (OLIVEIRA, 1998).

As abelhas são encontradas em vários ambientes, exceto nos lugares onde as temperaturas são extremas, como no deserto do Saara e nas geleiras dos Pólos Sul e Norte. A grande concentração de espécies está entre os trópicos (WINSTON, 1992). Os Apidae estão subdivididos em quatro sub-famílias: abelhas com comportamento eusocial como as melíferas (Apinae) e as sem ferrão (Meliponinae); as primitivas *Bombus* sociais (Bombinae) e as que apresentam comportamento parasocial ou solitário (Euglossinae) (KERR, 1969; MICHENER, 1990).

1.2. A *Apis mellifera*

Dentro do grupo dos Apinae, recebem maior destaque as abelhas *Apis mellifera*, por sua grande capacidade de adaptação (RIBBANDS, 1953; WINSTON, 1992), além de sua alta produtividade de mel e pólen que são importantes economicamente para o homem.

As abelhas *Apis mellifera* existem na Terra há cerca de 100 milhões de anos, surgindo junto com as primeiras plantas e insetos (PURVES *et al.*, 1995).

Sua importância para a sociedade humana começou a ser definida em 2.400 a.C., com o início da Apicultura no antigo Egito.

Em 1839 essas abelhas chegaram ao Brasil. Algumas sub-espécies européias foram trazidas para o Rio de Janeiro, pelos jesuítas, a pedido do imperador Dom Pedro II. Várias regiões do país, principalmente São Paulo e Rio Grande do Sul, receberam abelhas do gênero *Apis* e essas foram sendo instaladas em outros locais, de acordo com o interesse dos imigrantes (WIESE, 1995).

Já a popularmente conhecida abelha africana, chegou ao país trazida pelo Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, em 1956, a mando do governo brasileiro, para fins de melhoramento, com o objetivo de obter linhagens que aliassem sua boa produtividade à mansidão das melhores linhagens italianas. A sua instalação foi em Rio Claro-SP onde, devido a um acidente em 1957, algumas abelhas rainhas conseguiram escapar (KERR, 1967; PARDO, 1979). Graças a esse fato, a abelha africana ocupou toda a América do Sul e, também, grande parte da América do Norte (WINSTON, 1992). Essa ocupação aconteceu devido à grande capacidade de adaptação e à maior eficiência reprodutiva das espécies de abelhas africanas (STORT e GONÇALVES, 1979; RINDERER *et al.*, 1993).

Dessa forma, surgiu a abelha “brasileira”, chamada de africanizada, pois é fruto do cruzamento das abelhas africanas, principalmente *Apis mellifera scutellata*, com as abelhas européias já existentes no país. Essa abelha africanizada, ao longo dos anos, se mostrou excelente produtora o que motivou sua utilização na apicultura (PARDO, 1979).

1.3. A divisão de trabalho em *Apis mellifera*

A colônia de *Apis* é uma das realizações mais notáveis da evolução. As rainhas de *Apis*, apresentam morfologia e fisiologia desenvolvidas para reprodução; todas as outras tarefas dentro e fora da colmeia são realizadas por operárias morfologicamente diferentes da rainha. Muitos observadores

registraram as atividades dessas operárias, de diferentes idades, e verificaram que os indivíduos não desenvolviam tarefas particulares, mas que cada um realiza uma variedade de tarefas, sendo que a tarefa desempenhada tende a mudar à medida que ele se torna mais velho (FREE, 1980).

Segundo ZUCCHI (1973), a divisão de trabalho dentro das castas foi o que permitiu o aumento populacional da colônia, por torná-la independente das variações na quantidade de alimento disponível na natureza, graças à sua capacidade de armazenamento. A divisão de tarefas é fundamental para a organização das sociedades de insetos e constitui-se num dos principais fatores para o seu sucesso ecológico (WILSON, 1984). Essa divisão é caracterizada por dois fatores: (1) diferentes atividades são realizadas simultaneamente por (2) grupos de indivíduos especializados, sendo isso mais eficiente do que se essas tarefas fossem feitas por indivíduos não especializados (JEANNE, 1986).

Um estudo pioneiro foi realizado por RÖSCH, em 1925, utilizando uma colônia de observação com 6 quadros, nos quais as abelhas podiam realizar todas as atividades, exceto construir favos. Ele acreditava que cada abelha desempenhava todas as tarefas dentro da colmeia numa determinada seqüência. A partir desse trabalho, postulou-se que as operárias de *Apis* nos primeiros três dias de vida adulta dedicavam-se à limpeza do corpo e dos alvéolos. Após isso, a seqüência de tarefas divide-se em: alimentação de cria (3 a 11 dias de idade); recepção de néctar das forrageiras (8 a 14 dias); limpeza da colônia (10 a 23 dias); construção do favo (2 a 52 dias) e vôos de reconhecimento fora da colmeia (5 a 15 dias). RÖSCH admitiu que havia certa flexibilidade no desempenho dessas tarefas, podendo abelhas de mesma idade alternarem suas funções.

Acreditava-se que todas as operárias herdavam a mesma programação quanto à seqüência das atividades e que a flexibilidade era dada pela variação na duração das respostas às condições da colmeia (COSTA-LEONARDO e CRUZ-LANDIN, 1985).

Segundo LINDAUER (1953), há flexibilidade na distribuição de trabalhos por faixa etária e que a seqüência de tarefas dentro do quadro da divisão de trabalho entre as operárias é válida para um grupo, mas pode mostrar falhas quando analisada em um único indivíduo. Já foi verificado que um indivíduo pode mostrar superposição de tarefas num mesmo dia (SAKAGAMI 1953, *in* COSTA-LEONARDO e CRUZ-LANDIN, 1985). Outros autores estudaram o assunto (RIBBANDS, 1953; MICHENER, 1974) e reafirmaram a flexibilidade na distribuição das tarefas por faixa etária, contradizendo também as idéias de RÖSCH.

A plasticidade na divisão de trabalho é uma característica chave no sucesso da colônia, contribuindo para o desenvolvimento e crescimento adequado da população (ROBINSON, 1992).

Baseado nos vários estudos (RÖSCH, 1925; RIBBANDS, 1953; SAKAGAMI, 1953), FREE (1980) estabeleceu um padrão de comportamento quanto à divisão de trabalho em *Apis mellifera*, onde as abelhas empreendem quatro séries superpostas de atividades como segue: limpeza de célula; alimentação de larvas e construção de favos; recepção de néctar, acondicionamento de pólen, limpeza de células, remoção de entulhos e guarda; e coleta (FREE, 1980). Os sistemas glandulares das abelhas, que estão associados à produção de alimento larval e de cera, desenvolvem-se e regridem de acordo com as mudanças na sua preferência pelas várias tarefas dentro do ninho.

BROWERS (1982) realizou estudos *in vitro* para verificar a atividade das glândulas hipofaríngeas e constatou um aumento na atividade dessas quando se iniciou a primavera, ou seja, o período onde as abelhas nutrem as crias com maior freqüência. Outras experiências, como as de RUTZ *et al.* (1974 e 1976) mostraram que o aumento na concentração de hormônio juvenil (HJ) é responsável pela redução no tamanho das glândulas hipofaríngeas em abelhas mais velhas. Já as abelhas jovens apresentavam glândulas totalmente desenvolvidas e concentrações baixas ou intermediárias de HJ.

COSTA-LEONARDO (1985), mostrou outra relação importante nas atividades dentro da colmeia. Ela descobriu que a presença de uma rainha em uma pequena colmeia afeta o tamanho da glândula mandibular das operárias. Essas, na falta da rainha, podem desenvolver seus ovários e iniciar um comportamento de postura, o que afeta todo o equilíbrio da colônia. Feromônios produzidos pela rainha garantem o desenvolvimento normal das glândulas mandibulares das operárias e diminuem a longevidade das mesmas.

A divisão de trabalho está, então, fundamentada na capacitação do indivíduo para exercer uma determinada tarefa, sendo essa alcançada pela maturação fisiológica para seu desempenho, adquirida por etapas, com o avanço da idade (COSTA-LEONARDO e CRUZ-LANDIN, 1985).

Vários outros trabalhos de comportamento têm sido realizados na tentativa de elucidar os mecanismos de controle dessa divisão de trabalho. WHIFFLER *et al.* (1988) mostraram que a defensividade na colmeia de *Apis mellifera scutellata* está relacionada com o equilíbrio e o número de indivíduos de uma colmeia. Quando essa era populosa, apresentava boa quantidade de cria e pólen, a divisão de trabalho era bem caracterizada e um grande número de abelhas desenvolviam atividade de guarda, o que aumentava o poder defensivo da colônia. As colmeias fracas e pouco populosas mostraram resultados inversos. HUANG e ROBINSON (1992), estudaram a relação operária-operária e concluíram que a integração entre as operárias promove a troca de várias informações. Essas são mediadas pela troca de feromônios e alimento, por trofaláxis. Assim, o desenvolvimento fisiológico dessas operárias pode ser regulado de acordo com a necessidade da colmeia e a divisão de trabalho segue um padrão flexível, de acordo com o desenvolvimento e as necessidades da colônia.

Um estudo importante na caracterização dos mecanismos genéticos que controlam comportamentos sociais foi realizado por ROSS (1998), onde foi descoberto que o gene Gp-9 está relacionado ao comportamento social em

formigas *Solenopsis invicta*. O polimorfismo nesse gene gera alterações fisiológicas que determinam mudanças no comportamento de ovoposição da rainha, definindo o aceite ou não da mesma no ninho. No entanto, apesar dos trabalhos já realizados, pouco se sabe sobre a regulação dos diversos comportamentos sociais em nível molecular, principalmente no que tange à regulação na expressão gênica relacionada com a divisão de trabalho.

SEVERSON *et al.* (1989) realizaram um estudo pioneiro no qual foi feita a tradução *in vitro* do mRNA para examinar mudanças específicas de casta na transcrição de *Apis mellifera*. Foi observado que haviam diferenças, na quantidade de proteínas, entre pupas e larvas. Esses resultados foram os primeiros a mostrar que as alterações relacionadas à diferenciação específica de casta, nas fêmeas de abelhas, são associadas com mudanças na atividade transcricional.

Assim, pode-se supor que a divisão de trabalho em *Apis mellifera* está intimamente relacionada com a expressão gênica. Dessa forma, estudos envolvendo a análise da expressão gênica podem fornecer informações importantes para a melhor compreensão dos eventos que ocorrem em uma colmeia, bem como sua organização.

1.4. Genes X Comportamentos

Alguns trabalhos já foram realizados para determinar quais os componentes genéticos estão envolvidos no comportamento dos animais. Várias relações já foram estabelecidas, entretanto, muito ainda pode ser feito com as diversas técnicas da Biologia Molecular.

PLOMIN (1990), realizou uma revisão dos diversos mecanismos genéticos de controle do comportamento. Ele afirma que vários genes são responsáveis por determinado comportamento. Mutações, deleções e outros fatores relacionados com a expressão gênica podem modificar os mecanismos

fisiológicos que determinam um padrão comportamental e essas alterações são passadas aos descendentes. Para provar isso, existem vários exemplos como o da *Drosophila melanogaster* cacofônica, descrito por PEIXOTO e HALL (1998), onde uma mutação no gene do canal de cálcio causa anormalidades sensíveis à temperatura, convulsões, que afetam o comportamento de corte da *Drosophila*.

Um outro exemplo, dado por JUNG e SCHELLER (1991), mostra que alterações nos genes do molusco *Aplysia californica* podem afetar o seu comportamento de postura. Esse comportamento está associado a uma série de peptídeos que são produzidos por um mecanismo secretor neuronal. Quando ocorrem alterações gênicas, há produção de diferentes peptídeos que modificam o comportamento de postura desses seres.

Vários estudos foram feitos para determinar a relação genes X comportamento. Porém, com o avanço de fisiologia molecular, técnicas como RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) e hibridização *in situ* podem ajudar a esclarecer a fisiologia e regulação dos comportamentos (PLORIN, 1990).

1.5. Transcrição reversa

A transcrição reversa consiste na síntese de moléculas de DNA (cDNA) a partir de RNA. A primeira descrição dessa técnica ocorreu em 1987 (VERES *et al.*, 1987), quando foram realizados estudos sobre mutações de ponto no gene da ornitina carbamilase, usando subclones derivados de uma amplificação de segmentos de RNA. Para que isso fosse possível foi necessário utilizar a enzima de retrovírus transcriptase reversa, para catalisar a síntese do cDNA.

1.6.Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Um marco na história da Genética foi o desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) por Kary Mullis, em 1985 (INNIS e GELFAND, 1990; HOY, 1994).

A PCR é um método que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA , usando-se “primers” que hibridizam com as fitas opostas em regiões que “flanqueiam” o segmento a ser amplificado (PASSAGLIA e ZAHA., 1996). A reação de amplificação envolve a combinação de uma pequena amostra de DNA (molde), com dois oligonucleotídeos (“primers”), dNTPs e uma DNA polimerase em um tampão.

Cada ciclo de PCR envolve 3 passos: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA molde é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho da seqüência do “primer” utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada “primer” com as seqüências complementares que “flanqueiam” a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada porção terminal 3’ dos “primers”. Essa extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo (FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1998).

Vários ciclos repetidos de desnaturação do DNA molde, anelamento dos “primers” e extensão desse pela DNA polimerase permitem a amplificação do fragmento, cujo tamanho é limitado pelos “primers” (porção 5’) (WHITE *et al.*, 1989). Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial da seqüência alvo (FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1998).

No início, assim que foi descrita, a PCR usava o fragmento de Klenow da DNA polimerase de *E. coli* para produzir cópias do DNA molde (SAIKI *et al.*, 1985), sendo que essa era adicionada ao final de cada desnaturação. Posteriormente, passou-se a utilizar a DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-polimerase) e, sendo essa termoestável, não há necessidade de adicioná-la após cada ciclo de desnaturação (SAIKI *et al.*, 1988).

As condições iniciais para a amplificação, tais como concentrações de MgCl₂, Taq e de “primers” e a temperatura de hibridização, devem ser definidas para cada par de “primers” (PASSAGLIA e ZAHA., 1996).

A partir de sua descrição, a PCR já foi citada em mais de 1000 publicações (entre 1985 e 1989) e em 1993 Kary Mullis recebeu o Prêmio Nobel de Química por sua descoberta (HOY, 1994). Além disso, o avanço dessa técnica, aliada ao crescimento tecnológico, permitiram o desenvolvimento de novas metodologias para o estudo do DNA, como o “Differential Display”.

1.7. Differential Display - Reverse Transcriptase – PCR (DDRT-PCR)

Os organismos superiores contêm cerca de 100.000 genes diferentes, dos quais somente uma pequena fração, cerca de 10.000 a 15.000, são expressos em qualquer célula. A escolha de quais genes são expressos é que determina os processos da vida: desenvolvimento; homeostase; resposta a estímulos; regulação celular; idade, etc. (MANNIATIS *et al.*, 1987). Assim, comparações da expressão gênica em diferentes tipos celulares ou tecidos fornecem informações úteis na compreensão dos processos biológicos que controlam a vida.

Um problema é encontrar meios de identificar e isolar esses genes que estão expressos diferencialmente nas várias células ou sob condições alteradas. As atividades dos genes são refletidas nos tipos e quantidades de suas espécies de mRNAs e proteínas (LIANG *et al.*, 1995).

De acordo com LIANG *et al.* (1995) alguns critérios são importantes em uma metodologia que vise caracterizar a expressão gênica: (1) a maioria dos 15.000 mRNAs numa célula deve ser visualizada; (2) a reprodutibilidade deve ser alta; (3) deve permitir a comparação de mRNA de diferentes fontes; (4) as diferenças encontradas devem ser úteis para identificar e isolar os genes correspondentes, mRNA ou cDNAs, tornando-a uma técnica mais potente que as análises de proteínas em gel, onde há dificuldade em obter proteína suficiente para a caracterização molecular e (5) deve ser rápida e fácil.

Vários métodos utilizados para distinguir mRNAs, em estudos comparativos, estão associados com técnicas de hibridização subtrativa ou diferencial (LIANG e PARDEE, 1992). Entretanto, essas técnicas são pouco sensíveis e apresentam dificuldade em identificar mRNAs raros; essa metodologia também recupera genes de forma incompleta, é trabalhosa e demorada.

A técnica "Differential Display" foi descrita por LIANG e PARDEE (1992), LIANG *et al.* (1992, 1993) para identificar genes diferencialmente expressos entre as 15.000 espécies de mRNAs, em duas populações de células mamárias. Posteriormente, foi nomeada DDRT-PCR de acordo com a terminologia da reação em cadeia de polimerase – PCR (BAUER *et al.*, 1993). Esse método é direcionado para a identificação de genes, em duas ou mais situações, detectando espécies individuais de mRNA que são mudadas em diferentes células eucarióticas e também permite recuperar e clonar o seu DNA.

A estratégia do método consiste de três passos básicos e dois opcionais (WARTHOE *et al.* 1995): 1- transcrição reversa em frações usando um grupo de "primers" 3' ancorados T₁₂VN (onde V= A, C ou G e N= A, C, G ou T) que se anelam na porção 3' do mRNA (cauda de poli(A)); 2- amplificação das espécies de cDNA de cada fração, usando um grupo de "primers" 5' arbitrários (20 a 26 diferentes) e "primers" 3' ancorados; 3- separação por

eletroforese dos fragmentos resultantes; 4- reamplificação dos fragmentos que são diferentes entre as duas situações em estudo, clonagem e sequenciamento; 5- confirmação da expressão diferencial por uma técnica de análise de RNA (Northern blotting, Rnase protection e/ou nuclear run-on). O esquema geral do processo encontra-se representado na Figura 1.

Os "primers" arbitrários de 10 pb já haviam sido utilizados por WILLIAMS *et al.* (1990) e WELSH e MACCLELLAND (1990) para amplificar polimorfismos no DNA e mais recentemente para obter mRNAs alvos de genes diferencialmente expressados (WELSH *et al.*, 1992).

1.8. Aplicações do DDRT-PCR e refinamento da técnica

Essa técnica tem sido amplamente utilizada, com sucesso, por vários grupos, para isolar genes expressados diferencialmente em várias situações biológicas, incluindo câncer, diabetes, embriogênese, desenvolvimento cerebral e outros (WARTHOF *et al.*, 1995).

Em 1992, LIANG *et al.*, utilizaram o DDRT-PCR para comparar mRNAs de células epiteliais mamárias humanas normais e tumorais e descobriu que o gene S1 pode estar relacionado com o controle do crescimento normal dessas células do câncer de mama. Também ficou provado no seu trabalho que a técnica é eficiente e totalmente aplicável na análise da expressão gênica em eucariotos.

ADATI *et al.* (1995), verificaram que o gene XK endo B se expressou diferencialmente e está relacionado com o desenvolvimento embrionário de *Xenopus laevis*. HELPS *et al.* (1995), utilizaram o DDRT-PCR em *Drosophila melanogaster* para caracterizar e isolar o gene homólogo ao gene BRC1 humano, sendo esse diferencialmente expresso em tumor de mama.

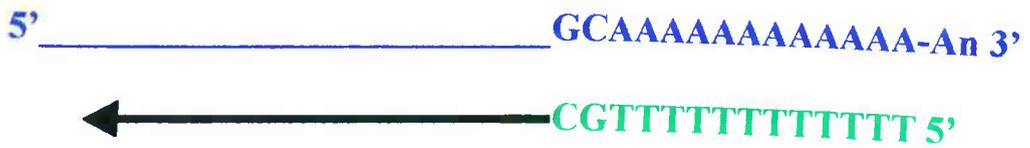
Outros estudos, realizados por KANG *et al.* (1995; 1996), analisaram o sistema imune de *Trichoplusia ni* pela alteração na expressão gênica após

injeção da bactéria *Enterobacter cloacae* β 12 e conseguiram isolar genes relacionados à cecropina A, lisozima e atacina, essa mostrou grande homologia com a atacina ácida de *Hyalophora cecropia*.

Espécies de RNAs mensageiros 5' _____ GCAAAAAAAAAAAAAA-An 3'
 TAAAAAAAAAAAAA-An
 GAAAAAAAAAAAAA-An

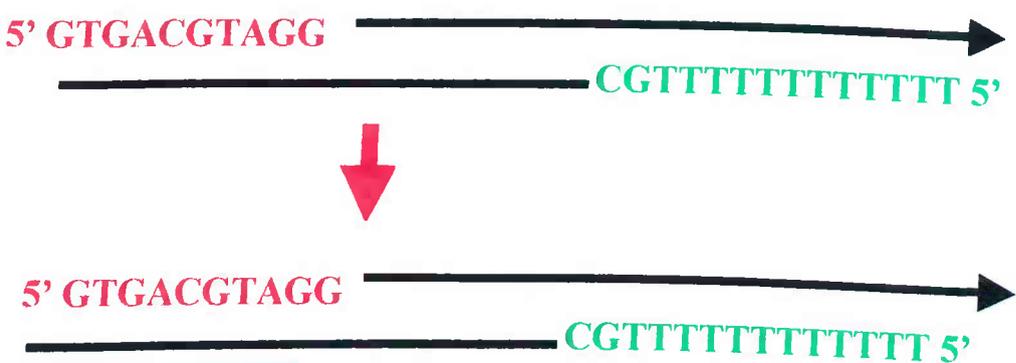
1-TRANSCRIÇÃO REVERSA

5'-TTTTTTTTTTTTTGC-3' (T₁₂GC)
 dNTPs
 MMLV transcriptase reversa



2- AMPLIFICAÇÃO POR PCR

5'-TTTTTTTTTTTTTGC-3' (T₁₂GC)
 dNTPs
 Taq DNA Polimerase
 5'-GTGACGTAGG-3' (OPA 08)



Gel de poliacrilamida não desnaturante

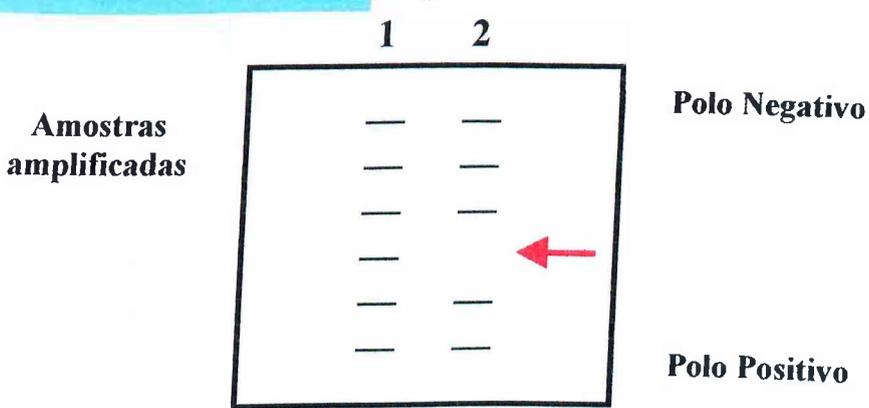


Figura 1: Esquema da estratégia básica da técnica do DDRT-PCR.

MOMIYAMA *et al.* (1995), verificaram o padrão de expressão gênica durante a embriogênese somática precoce em sementes de *Solanum melongena* L., isolando e sequenciando vários genes relacionados a esse processo. CUNNINGHAM *et al.* (1996), estudaram o desenvolvimento de suínos e descobriram, via DDRT-PCR, um aumento na expressão de produtos de PCR específicos durante a rápida elongação trofoblástica, o que ajudou a esclarecer alguns pontos no desenvolvimento desses animais.

DONADELLI *et al.* (1996), submeteram células endoteliais ao estresse de descamação por fluxo laminar e verificaram alterações na expressão gênica, para melhor compreender suas propriedades estruturais e funcionais. Seus resultados mostraram que o gene SS-1 foi diferencialmente expresso quando ocorreu o estresse e esse gene codificava uma proteína não descrita até o momento.

DIMOPOULOS *et al.* (1996), detectaram cDNAs relacionados com maltase, uma subunidade da V-ATPase, uma proteína ligante de GTP, duas lecitinas diferentes em *Anopheles gambiae*, esclarecendo diversos pontos da relação desse parasita com seus hospedeiros.

HIRAI (1998), descobriu quatro novos cDNAs relacionados com o hormônio juvenil em corpos gordurosos de *Riptortus clavatus*.

Alguns trabalhos foram realizados com o intuito de melhorar a técnica, tais como BAUER *et al.* (1993) que mostraram a eficiência de géis não desnaturantes na análise do DDRT-PCR.

MOU *et al.* (1994), encontraram que os “primers” ancorados com no mínimo uma base G foram mais eficientes que os com uma base C, e que os “primers” terminados em A ou T (porção 3’) foram os menos eficientes na amplificação de mRNAs originados de fibroblastos e tecidos cardíacos de ratos.

GUIMARÃES *et al.* (1995) conseguiram provar que, contrariamente à maioria dos trabalhos já realizados, o DDRT-PCR pode ser realizado utilizando somente um “primer”. Ele utilizou o “primer” T12MC (onde M = A, C ou G)

com sucesso, mostrando que pode ser possível realizar o DDRT-PCR com um número pequeno de combinações de "primers".

HADMANN *et al.* (1995) e TRENTMANN *et al.* (1995), utilizaram o ^{32}P como uma alternativa ao uso do ^{35}S na marcação dos produtos amplificados. LIANG *et al.* (1993), provaram que o número de "primers" ancorados pode ser reduzido de 12 para 4 "primers" degenerados na penúltima base (T_{12}MA , T_{12}MG , T_{12}MC e T_{12}MT). MOTLIK *et al.* (1998), mostraram que o corante infravermelho IRD4 é uma alternativa ao uso da marcação radioativa por ^{33}P . WANG (1995), utilizou "primers" com uma adição de 9 pb a mais que os convencionais 10 pb e realizou o sequenciamento direto dos fragmentos isolados por DDRT-PCR. AN *et al.* (1996), utilizaram "primers" ancorados marcados com biotina (porção 5'), evitando os radioisótopos, em estudos de câncer de próstata e provou que essa marcação é eficaz e é uma boa alternativa ao uso de elementos radioativos.

Centenas de outros trabalhos utilizando a técnica do DDRT-PCR foram e estão sendo realizados em diversos organismos, e mostram que a técnica têm se tornado cada vez mais eficaz e, com certeza, a mais utilizada no momento para isolar e caracterizar genes diferencialmente expressos. Isso deve-se à sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade e baixa necessidade de RNA (LIANG *et al.*, 1992; BAUER *et al.*, 1993; ZIMMERMANN e SCHULTZ, 1994; XINKANG *et al.*, 1995).

A partir dos conhecimentos relatados aqui, mostrando a eficiência do DDRT-PCR, o presente trabalho visou otimizar a técnica para *Apis mellifera*; no que se refere à análise da expressão gênica diferencial na divisão de trabalho dessa espécie, utilizando a marcação não radioativa por nitrato de prata. Foi também objetivo desse trabalho, verificar a diferenciação na expressão gênica, por DDRT-PCR, em grupos de indivíduos de diferentes idades e relacionar com a tarefa desempenhada pelas abelhas, bem como, comparar três protocolos de extração de RNA total.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido nos Laboratórios de Genética e Genética Molecular, ambos do Departamento de Genética e Bioquímica (DEGEB) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

2.1. Material Biológico

2.1.1. Montagem da caixa de observação

Foi montada uma caixa de observação de *Apis mellifera*, onde haviam dois quadros com pupas, larvas, mel, pólen e cerca de cinco mil abelhas adultas. Esses quadros se originaram de um ninho recém estabelecido no Campus Umuarama da UFU. Foram tomados alguns cuidados para que a rainha fosse transportada com segurança. A partir daí as abelhas foram alimentadas, periodicamente, com mel para melhor se adaptarem às novas condições e para que a colônia se estabilizasse. A colmeia foi instalada no Laboratório de Comportamento Animal da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Campus Umuarama.

2.1.2. Coleta e marcação das abelhas

Após cerca de cinquenta dias, a caixa de observação encontrava-se estabilizada, com bom número de crias novas, milhares de abelhas adultas, mel e pólen em quantidades suficientes para a demanda da colmeia. Dos dois quadros, aquele com mais cria operculada foi retirado e colocado em uma outra caixa lacrada (maternidade), enquanto o outro foi deixado na colmeia de observação.

A maternidade foi colocada em uma estufa regulada a 32°C, o que é essencial para o desenvolvimento normal das abelhas. A maternidade foi aberta várias vezes por dia e as abelhas recém-nascidas foram coletadas durante um período de três dias. Após a coleta, elas foram marcadas com etiquetas de papel ou cola colorida (não tóxica). As cores de cada marcação eram diferentes para indicarem o dia em que cada grupo nasceu.

2.1.3. Inserção das abelhas na colmeia e observação do comportamento

Terminada a marcação das abelhas (cerca de 700 indivíduos), as mesmas foram introduzidas de volta à colmeia de observação. A partir daí, foram realizadas observações, para estabelecer o comportamento dessas abelhas dentro do ninho com relação à divisão de trabalho. Essas observações foram realizadas durante trinta dias, sendo duas horas por dia, uma no período da manhã e uma à tarde; perfazendo um total de sessenta horas. Foram observadas as principais tarefas realizadas pelo grupo de indivíduos marcados em cada dia de vida, dispendo-se de uma lupa manual e de uma lanterna com luz vermelha para não interferir na normalidade da colmeia. Os dados coletados foram anotados em planilhas para posterior análise.

2.1.4. Coleta e preparação das amostras para extração de RNA total

Após o período de observações, mais abelhas, filhas da mesma rainha, foram marcadas e inseridas na colmeia (cerca de 500) do mesmo modo que as anteriores e essas mesmas foram coletadas e preparadas para extrair o RNA total. As abelhas foram coletadas em intervalos de cinco dias, do 1º ao 30º dia de vida dos adultos, perfazendo um total de sete classes de idade (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias) e com 10 amostras por classe. Essas idades foram correlacionadas

com as tarefas desempenhadas pelo grupo anterior de abelhas para se obter um padrão das tarefas realizadas por cada classe de idade.

Logo após serem coletadas, realizaram-se testes nos quais as abelhas foram tratadas com álcool 70% ou com hipoclorito de sódio 2,5%, para eliminar as bactérias do trato digestório e das partes externas das abelhas. Em seguida, foram feitos esfregaços da cabeça, do tórax e dessas estruturas maceradas em placas com meio LB sólido (SAMBROOK *et al.*, 1987) e deixadas a 37°C. Isso foi necessário para verificar o crescimento de bactérias e fungos e, assim, determinar qual o reagente mais eficaz na eliminação de contaminantes bacterianos. As amostras foram, em seguida, mergulhadas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C para preservar o RNA.

2.2. Extração do RNA total

Primeiramente, o RNA total foi extraído de larvas para se otimizar a extração, pois essas são mais fáceis de macerar e possuem menos impurezas. Para isso, utilizaram-se três protocolos: o descrito por CHOMCZINSKI E SACCHI (1987) usando isotiocianato de guanidina; o de KLEMENTZ *et al.* (1985) por meio de fenol:clorofórmio e finalmente o que utiliza TRIZOL Reagent (GIBCO - BRL).

Após a otimização do protocolo de extração de RNA total, utilizando TRIZOL Reagent (GIBCO - BRL), foram feitas extrações das amostras correspondentes a cada grupo de idade, tomando-se os devidos cuidados para evitar a contaminação com RNases. A extração foi realizada somente de tecidos do tórax e cabeça; as patas, asas e abdômen das abelhas foram retirados para evitar contaminação com bactérias e outras impurezas. Cada amostra era composta por dez abelhas, que compunham um "pool" de RNA total. Isso foi necessário para se evitar a detecção de diferenças na expressão gênica

individual, pois o que interessa a esse trabalho é caracterizar grupos de operárias.

Cada grupo de abelhas foi macerado em nitrogênio líquido, pesado e transferido para um microtubo (estéril e novo) de 2 ml. Para cada 100 mg de tecido macerado foi adicionado 1ml de TRIZOL Reagent (GIBCO-BRL). A solução ficou reagindo por 5 minutos e, logo em seguida, adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio. O tubo foi agitado por 15 segundos e deixado por 3 minutos em repouso. Após esse tempo, a solução foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos à 4°C e, então, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde adicionou-se 0,5 ml de isopropanol. A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 10 a 30 minutos e centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" ressuscitado em 1 ml de etanol 100%. O material foi centrifugado a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado brevemente à temperatura ambiente para secar o "pellet" e, finalmente, esse foi ressuscitado em água tratada com DEPC 0,1%.

Todo o material utilizado (pinças, microtubos, cadinhos, lâminas, etc.) e os reagentes foram devidamente tratados com DEPC eliminando todo tipo de RNases. Os materiais de laboratório, como as ponteiras e microtubos eram novos e foram incubados em estufa a 65°C, por no mínimo três dias, para evitar a atuação de RNases que degradariam o RNA (SAMBROOK *et al.*, 1989). As luvas também eram novas e descartadas freqüentemente durante todo o manuseio do material.

2.3. Eletroforese do RNA total

Após a extração, foi feita a verificação da qualidade do RNA pela eletroforese de 2 a 3 µl de RNA total em gel de agarose 2%, em tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5X conforme SAMBROOK *et al.* (1989) e sob uma

corrente constante de 120 V. Antes de ser aplicado no gel, o RNA foi diluído em 1:10 partes de formamida e 4 a 10 µl de tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61M, xileno cianol 4,64M, sacarose 1,17M e EDTA 0,1M pH8,0) (GODING, 1998). A diluição em formamida foi para proteger o RNA de degradação (CHOMCZINSKI, 1992). Foi utilizado o corante brometo de etídio diluído no gel a uma concentração de 0,5 µg/ml de gel. As amostras foram visualizadas em transiluminador UV e fotografado em VDS Image System-Pharmacia, usando filtro laranja; com tempo de exposição, contraste e fator de correção da câmera variados.

2.4. Tratamento do RNA total

Terminada a extração e eletroforese do RNA total, as amostras foram tratadas com RNase-free DNase I (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante (1U/100 µg de DNA). Após esse tratamento, o RNA foi precipitado adicionando-se o dobro do volume de cloreto de lítio 6M e permaneceu reagindo durante a noite, a -20°C. Em seguida, a solução foi centrifugada a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C e o "pellet" ressuscitado em água tratada com DEPC. Todo o material extraído foi armazenado a -80°C para proteger o RNA de degradação por RNases.

2.5. Quantificação e qualificação do RNA

O RNA foi quantificado por absorvância a 260 nm em espectrofotômetro Hitach U-2000. Uma alíquota de 5 µl foi diluída 200 vezes em água ultrapura para a leitura. As concentrações de cada amostra foram calculadas pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = \text{ABS}_{(260)} \times 40 \times \text{Fator de diluição (200)},$$

e diluídas para uma concentração de 200 ng/µl.

Uma pequena alíquota (2 a 3 μ l) de RNA foi corrida novamente em gel de agarose 2%, como descrito anteriormente, para verificar a qualidade do RNA e eficiência do tratamento com RNase-free DNase I.

2.6. Differential Display – Reverse Transcriptase – PCR (DDRT-PCR)

A técnica do DDRT-PCR foi desenvolvida de acordo com LIANG e PARDEE (1992) e adotando os melhoramentos e refinamentos descritos por LIANG *et al.* (1993 e 1995) e BAUER *et al.* (1993).

2.6.1. Transcrição reversa

Primeiramente, foram realizados experimentos com RNA de larvas e adultos para otimizar o protocolo correto e assim obter uma transcrição reversa com a maior eficiência possível, uma vez que, esta é uma etapa fundamental no desenvolvimento do DDRT-PCR.

Na otimização variou-se, inicialmente, a quantidade de RNA em cada reação (200, 500 e 1000 ng). Em seguida, outros testes foram feitos variando a quantidade de “primer” degenerado (reconhece todas bases nitrogenadas) T₁₈VN (10, 20 e 40 pmoles), a concentração de dNTPs (10, 20 e 200 μ M) e o tipo de tampão da enzima transcriptase reversa (com ou sem BSA).

No decorrer desses testes, o “primer” T₁₈VN foi substituído pelo “primer” 3' ancorado T₁₂GC. Assim, após tudo otimizado, foram utilizados 200 ng de RNA de tecido dos adultos, de cada grupo de idade, os quais foram transcritos reversamente na presença de 200 U de transcriptase reversa MMLV-RT, 20 μ M de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 20 pmoles “primer” T₁₂GC, 20 U de Rnasin (GIBCO-BRL), 4 μ l de tampão 5X (Tris-Cl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) e completou-se com água até um volume final de 20 μ l. A reação foi incubada por 10 minutos a 65°C, 60 minutos a 37°C

e 5 minutos a 95°C (LIANG, 1995). A MMLV-RT foi adicionada após 10 minutos de incubação a 37°C para aumentar a eficiência na síntese do cDNA (LIANG, 1995). A temperatura final de 95°C foi utilizada para inativar a transcriptase reversa, pois esta inibe a atuação da Taq DNA polimerase na amplificação do cDNA (SELLNER *et al.*, 1992; FEHLMANN *et al.*, 1993).

2.6.2. Amplificação do cDNA

A amplificação ocorreu via PCR, onde foram feitos diferentes ensaios para otimizar as concentrações de “primers”, MgCl₂, dNTPs, Taq DNA polimerase e cDNA. Também foram realizados experimentos utilizando os “primers” T₁₈VN e T₁₂GC para verificar sua eficiência. Após a etapa de otimização, foram selecionados seis “primers” curtos de 10 pb, com seqüências arbitrárias e ricos em G e C (cerca de 50 a 60%), da OPERON Technology (Tabela 1). Em cada reação de amplificação foram utilizados 2 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmoles de “primer” ancorado T₁₂GC, 1 U de Taq DNA Polimerase, 4 pmoles de “primer” arbitrário de 10 pb, 2 µl de tampão 10 X (Tris-Cl 100 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 1,5 mM) e 4,0 µl de cDNA. O volume final foi completado com água ultrapura até 20 µl. Cada grupo de reações apresentava um controle negativo (branco), com todos os componentes da amplificação, exceto o DNA molde. Isso foi feito para verificar o nível de contaminação dos reagentes.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-150 MiniCycler™, em 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 40°C por 2 minutos, 72°C por 30 segundos e uma temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos, conforme LIANG *et al.* (1995).

30 minutos em ácido acético 10%, lavado 2 vezes com água ultrapura por 2 minutos, corado por 20 minutos em solução composta de 100 mg de nitrato de prata, 150 µl de formaldeído e 100 ml de água. Após corado, o gel foi lavado 2 vezes com água por 30 segundos e, finalmente, revelado em solução gelada composta de 3 gramas de carbonato de sódio, 150 µl de formaldeído, 20 µl de tiosulfato de sódio e 100 ml de água. O tempo de revelação foi variado pois, assim que as bandas se tornavam visíveis, a reação era interrompida com ácido acético 10%.

2.7. Análise do gel

Após o gel ter sido corado por nitrato de prata, ele foi colocado para secar em bastidores de madeira com papel celofane. Quando seco, o gel foi copiado por “scanner” e a partir daí analisado em computador para verificar possíveis polimorfismos entres as amostras.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados obtidos da análise do comportamento das abelhas inseridas na colmeia, foi possível elaborar o etograma da divisão de trabalho. Esses dados foram plotados em gráficos para facilitar a análise (Figuras 2 e 3).

A Figura 2 representa o padrão médio da distribuição de tarefas das abelhas inseridas na colmeia (aproximadamente 700). Esse padrão foi obtido a partir das observações, onde foi estimado um número de operárias que estavam realizando determinada tarefa em cada dia de vida adulta.

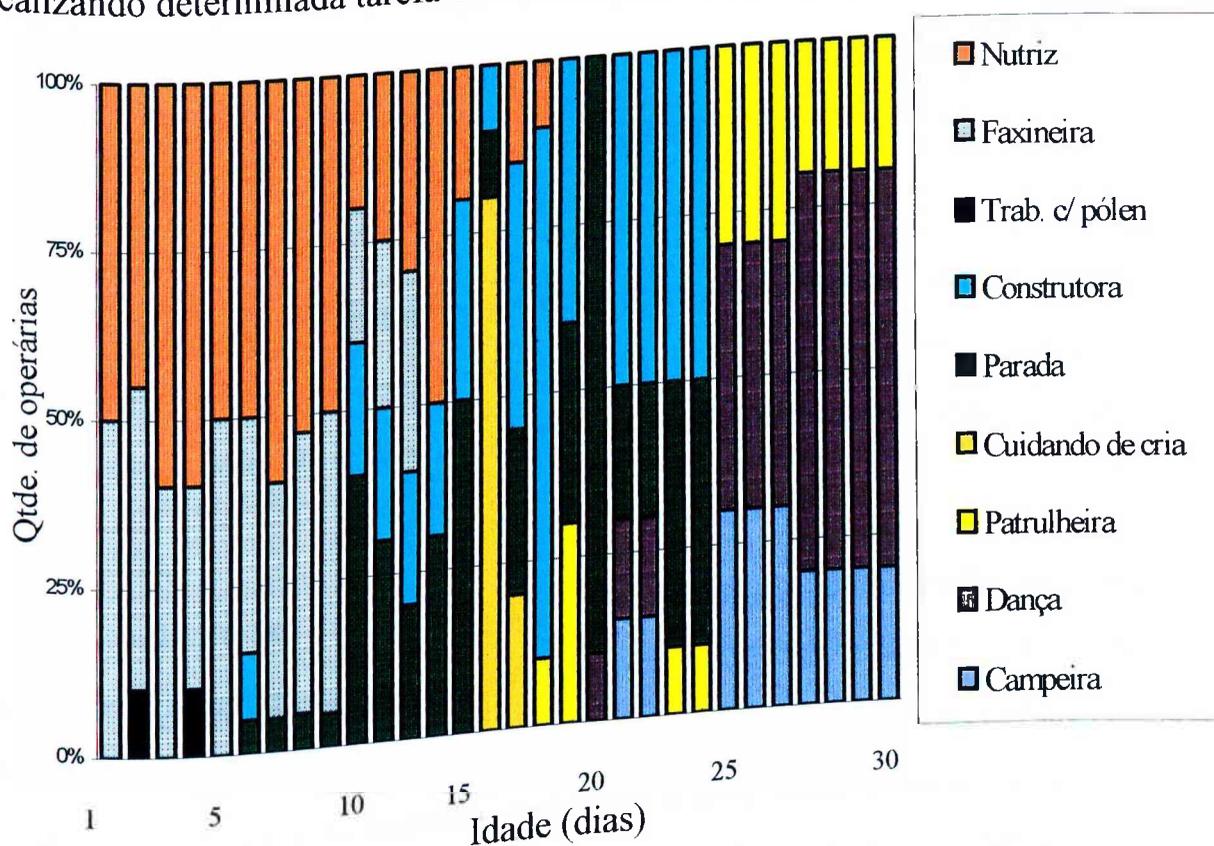


Figura 2: Distribuição de tarefas durante os 30 dias de vida adulta das operárias observadas na colmeia.

Ao analisar a Figura 2, verificou-se que há uma seqüência de tarefas bem nítida e diferenciada, como já descrito por RÖSCH (1925), RIBBANDS (1953) SAKAGAMI (1953) e FREE (1980). Entretanto, a relação idade-tarefa encontrada mostrou-se diferente da descrita por esses autores evidenciando a

plasticidade no desempenho dessas tarefas. Essa flexibilidade é que promove a grande capacidade de adaptação dessa espécie, de acordo com as exigências do meio. Vale lembrar que as operárias observadas nos estudos anteriores diferem geneticamente das estudadas nesse trabalho, podendo isso influenciar nos diferentes padrões de comportamento.

Os dados da Figura 2 também permitem visualizar um aumento no grau de complexidade dos comportamentos relativos à divisão de trabalho. A partir do 10º dia de vida, as operárias passaram a desempenhar um maior número de tarefas numa mesma idade. Isso pode ser explicado, de acordo com COSTA-LEONARDO e CRUZ-LANDIN (1985), pelo desenvolvimento fisiológico que ocorre nesses indivíduos com o avanço da idade, tornando-os aptos a realizar trabalhos mais complexos, como o de produzir cera, atividade de vôo para forrageamento e o de dança.

A Figura 3 mostra também a distribuição de tarefas dentro da colmeia, porém enfatizando as tarefas realizadas nos dias específicos em que foram realizadas as coletas de amostras, de mesmas idades, para a extração de RNA total.

Na Figura 3, fica evidente a realização de determinadas tarefas pelas operárias. Observou-se que nos primeiros dias de vida adulta (1º ao 5º dia) as tarefas desempenhadas foram as de faxineira e de nutriz. As tarefas começaram a variar no 10º dia e as operárias passaram a ficar mais imóveis, possivelmente produzindo cera. Iniciou-se a tarefa de construir favos do 10º ao 20º dia e no 15º dia observou-se a atividade de cuidados com a cria (limpeza e manutenção dos alvéolos). Notou-se ainda que a partir do 20º dia começaram a ser desempenhados trabalhos mais elaborados, como dança, forrageamento (campeira) e patrulhamento para troca e manipulação do alimento vindo do campo. Essas últimas tarefas ocorreram até o final dos dias de vida das

operárias, onde as abelhas marcadas não foram mais observadas. Isso aconteceu no 30^o, 31^o dia de vida adulta.

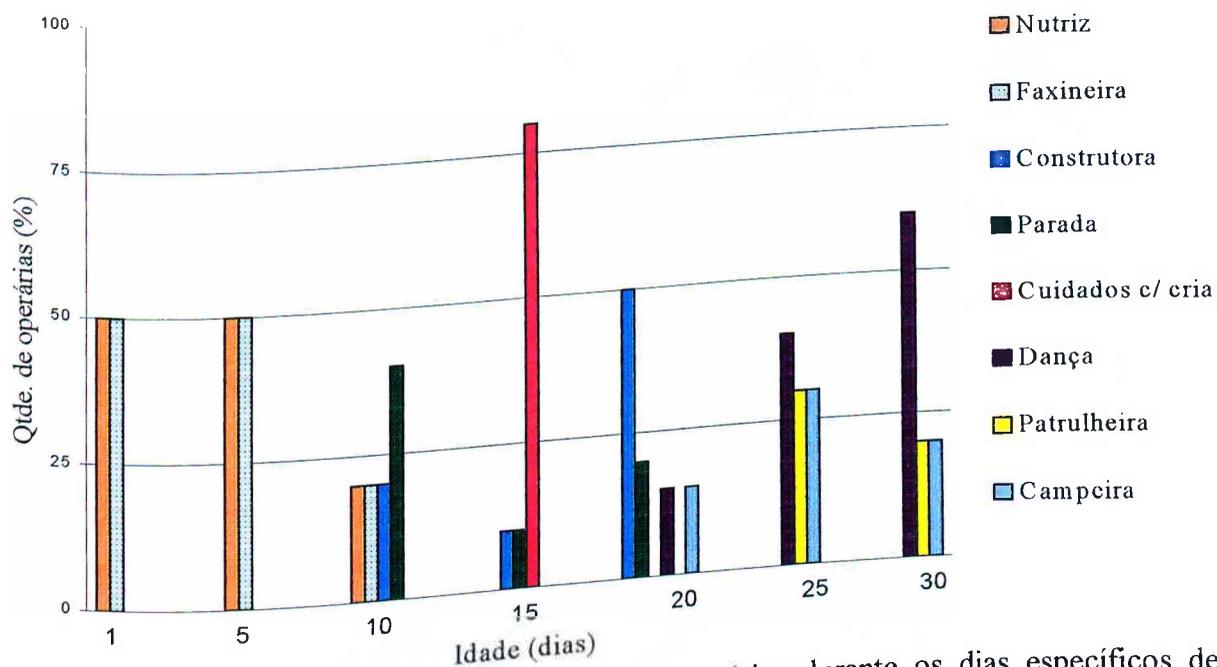


Figura 3: Principais tarefas desempenhadas por operárias durante os dias específicos de coleta para extração de RNA total.

A extração do RNA total, íntegro e livre de impurezas, foi um dos pontos críticos para o desenvolvimento desse trabalho. Os testes com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2,5% mostraram que esse último foi o mais eficaz no tratamento para se evitar contaminantes bacterianos (Figura 4). Além de ser eficaz, o hipoclorito de sódio 2,5% não afetou a integridade do RNA total das abelhas.

A Figura 4 mostra os experimentos feitos com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2,5%, onde notou-se o crescimento acentuado de bactérias quando foi utilizado somente o álcool. Já o hipoclorito de sódio, inibiu totalmente o crescimento de qualquer microorganismo. O controle positivo (sem tratamento) mostrou que há presença de bactérias no tórax e na cabeça das abelhas. O meio de cultura estava estéril e isso foi provado pelo controle

negativo (sem amostra). Os tecidos macerados mostraram também a presença de bactérias e que, também, foram eliminadas com hipoclorito de sódio 2,5%.

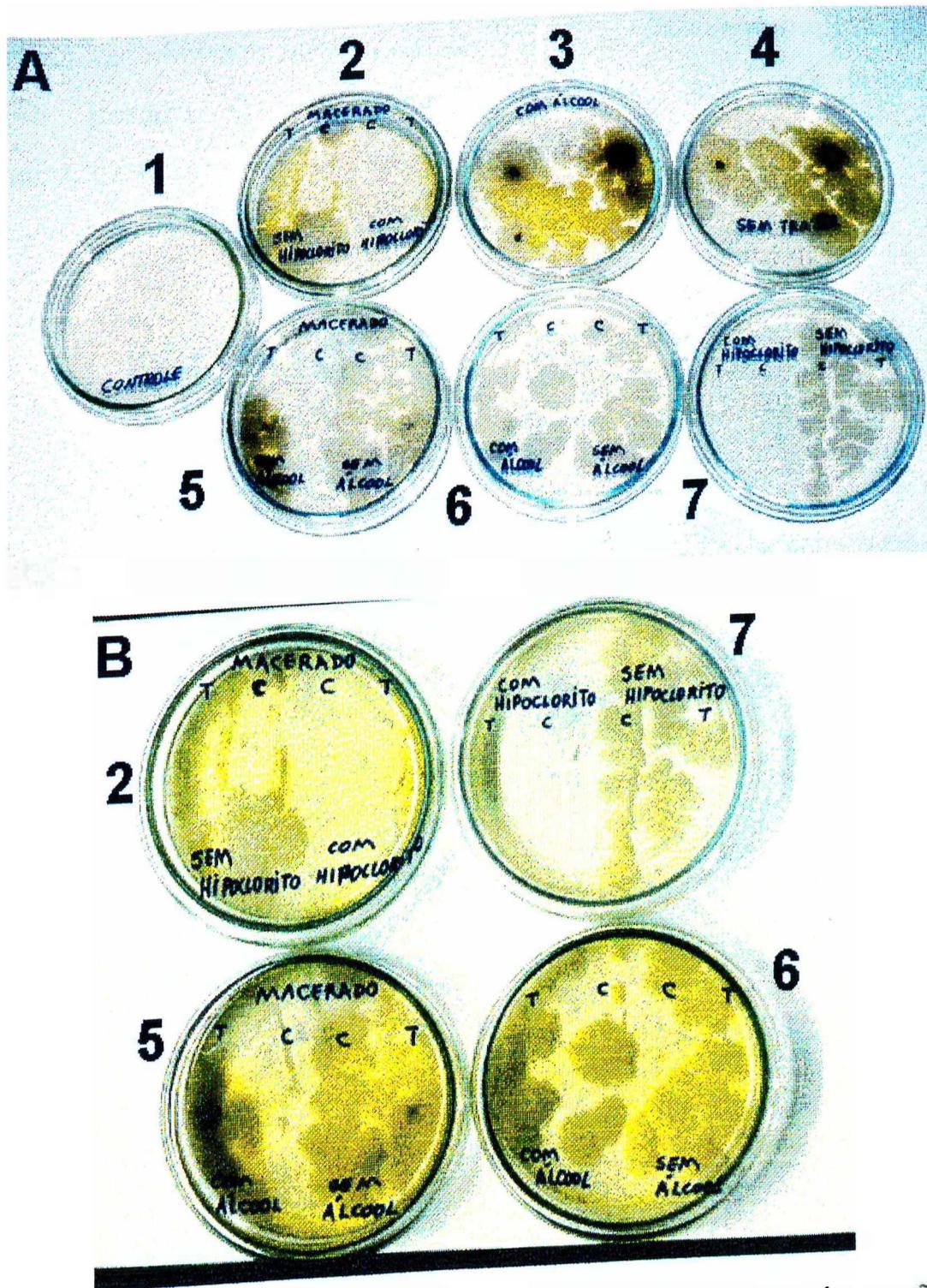


Figura 4 : Fotos mostrando o crescimento de bactérias das amostras tratadas ou não com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2,5%. A- Experimento completo com controle positivo e álcool 70% e hipoclorito de sódio 2,5%. B- Amostras maceradas e inteiras tratadas. T= tórax. C= cabeça. 1= controle negativo. B- Amostras maceradas e inteiras tratadas. T= tórax. C= cabeça. 1= controle negativo sem a amostra; 2= tecidos macerados com e sem tratamento de hipoclorito; 3= material tratado com álcool; 4= controle positivo (sem tratamento); 5= tecidos macerados com e sem tratamento de álcool; 6= tecidos íntegros com e sem tratamento de álcool; 7= tecidos íntegros com e sem tratamento de hipoclorito.

Observou-se, durante a otimização da extração de RNA, que os protocolos descritos por CHOMCZINSKI (1987) e por KLEMENTZ *et al.* (1985) não se mostraram tão eficientes na extração de RNA de abelhas quanto o que utilizou TRIZOL Reagent. Os dois primeiros protocolos, apesar de largamente utilizados, mostraram-se trabalhosos, demorados e o RNA extraído apresentava muitas impurezas além de contaminação com DNA genômico. (Figura 5).

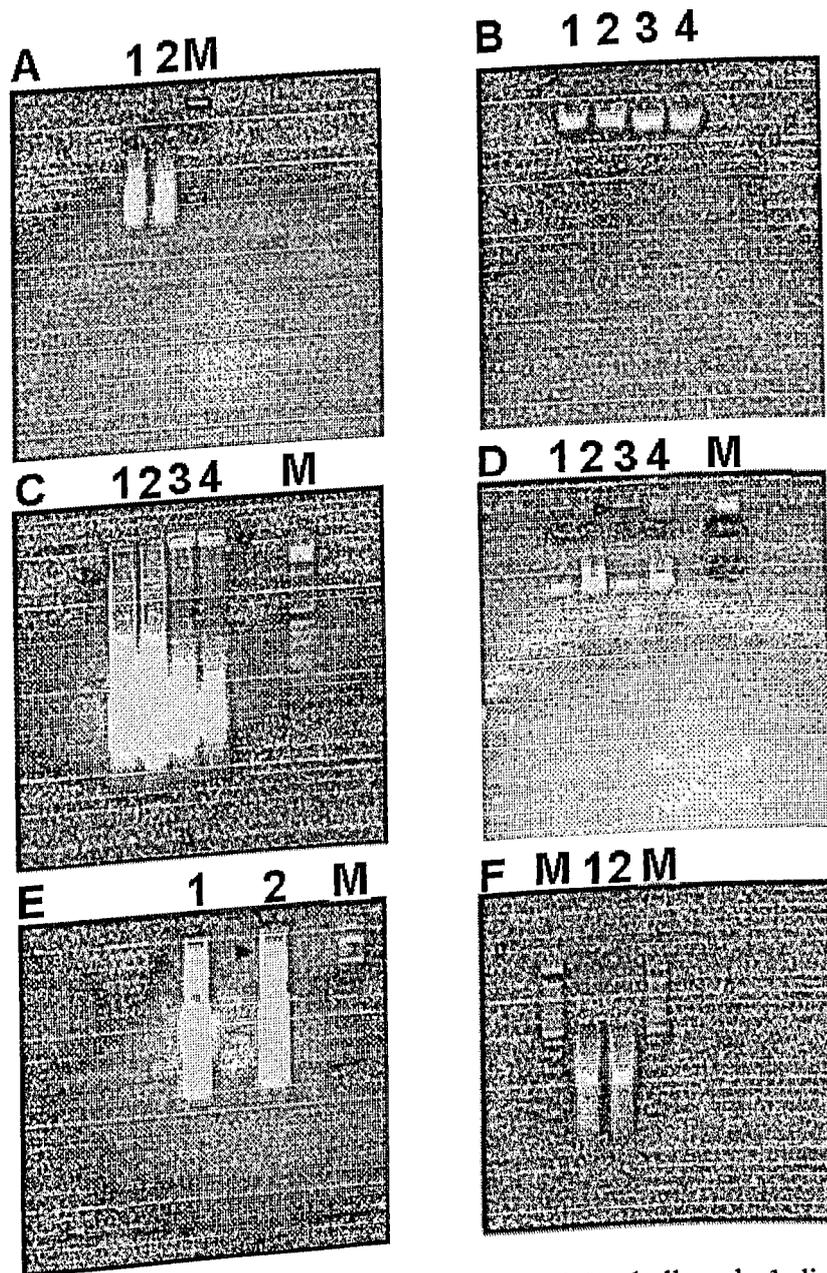


Figura 5: Padrão eletroforético da extração do RNA total de abelhas de 1 dia de idade em gel de agarose 2%. A, C e E- utilizou-se o protocolo descrito por Chomczynski. B, D e F- usou-se o protocolo descrito por Klementz. M= marcador de 100 pb. Setas mostram contaminação por DNA.

Já o protocolo utilizando TRIZOL Reagent, permitiu uma extração de boa qualidade, além de ser rápido e prático, o que é extremamente vantajoso pois o RNA deve ser extraído rapidamente para evitar sua degradação. Na Figura 6, está representado o padrão do RNA obtido a partir deste protocolo, onde percebe-se a boa qualidade da extração pela presença de várias bandas, as quais representam mRNAs intactos, de acordo com Prof. Dr. José Edson Fonseca Figueira (comunicação pessoal), e com baixa contaminação por DNA.

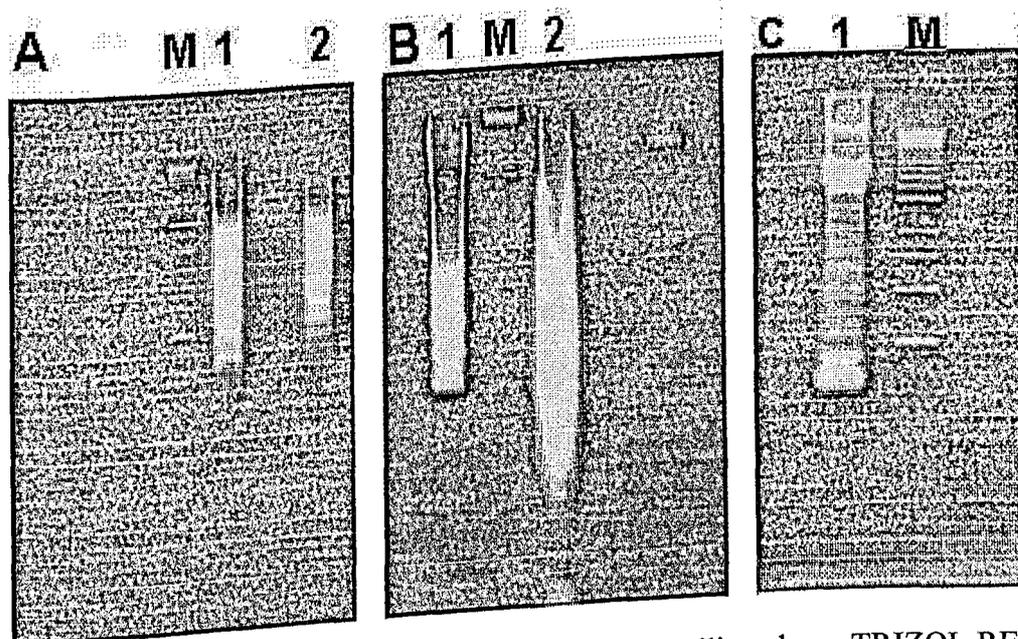


Figura 6: Padrão eletroforético da extração de RNA total, utilizando-se TRIZOL REAGENT, de abelhas de 1 dia (A 1), 5 dias (B 1 e 2), 15 dias (A 2) e 25 dias (C 1). M = marcador de 100 pb.

A extração do RNA total de um “pool” de 10 abelhas foi importante para evitar que a variação na expressão gênica de cada operária pudesse interferir nos resultados.

A otimização da técnica DDRT-PCR foi ponto central no desenvolvimento desse trabalho e também o que exigiu mais tempo. Vários ensaios foram realizados para melhor compreender a técnica e adequá-la às condições disponíveis no laboratório. Um dos resultados mais interessantes

foram os relacionados à comparação dos “primers” ancorados T₁₈VN e T₁₂GC. O primeiro “primer” utilizado foi o T₁₈VN, o qual não mostrou resultados satisfatórios durante a otimização, e o padrão de bandas conseguido não permitiu obter qualquer tipo de conclusão, mesmo variando as condições de reação. Isso despertou o interesse em utilizar outros tipos de marcação, além da marcação com nitrato de prata. Ensaio utilizando dATP marcado com biotina e dCTP marcado com ³⁵S foram realizados e também não mostraram resultados significativos para o “primer” T₁₈VN.

A partir desses resultados, levantou-se a hipótese de que ocorreram alterações com o “primer” T₁₈VN, uma vez que, os outros componentes da reação estavam todos de acordo com o descrito na literatura (LIANG e PARDEE, 1992; BAUER *et al.*, 1993; LIANG *et al.*, 1995). Assim foram feitos outros experimentos, utilizando-se o “primer” T₁₂GC, sob as mesmas condições que o T₁₈VN. A Figura 7 ilustra um desses experimentos, onde fica evidente a diferenciação no padrão de amplificação dos dois “primers” quando submetidos às mesmas condições.

Uma possível explicação para esse resultado pode estar no fato do “primer” T₁₈VN ser degenerado e assim ao realizar a transcrição reversa o mesmo não apresenta grande especificidade e acaba selecionando um grande conjunto de mRNAs. Esse conjunto, apesar de possuir vários mRNAs, apresenta quantidade pouco representativa de cada espécie de mRNA levando a uma amplificação de baixa resolução. Já o “primer” T₁₂GC apresenta especificidade na sua porção 3' (ancorado), nas suas duas últimas bases (GC), o que permite ao mesmo se anelar às espécies de mRNAs que apresentem a cauda de poli(A) seguida das bases CG. Isso promove uma seleção mais eficiente por parte do T₁₂GC, permitindo a

experimento. A Figura 8 mostra dois géis, um desnaturante e o outro não desnaturante, onde foram aplicadas as mesmas amostras.

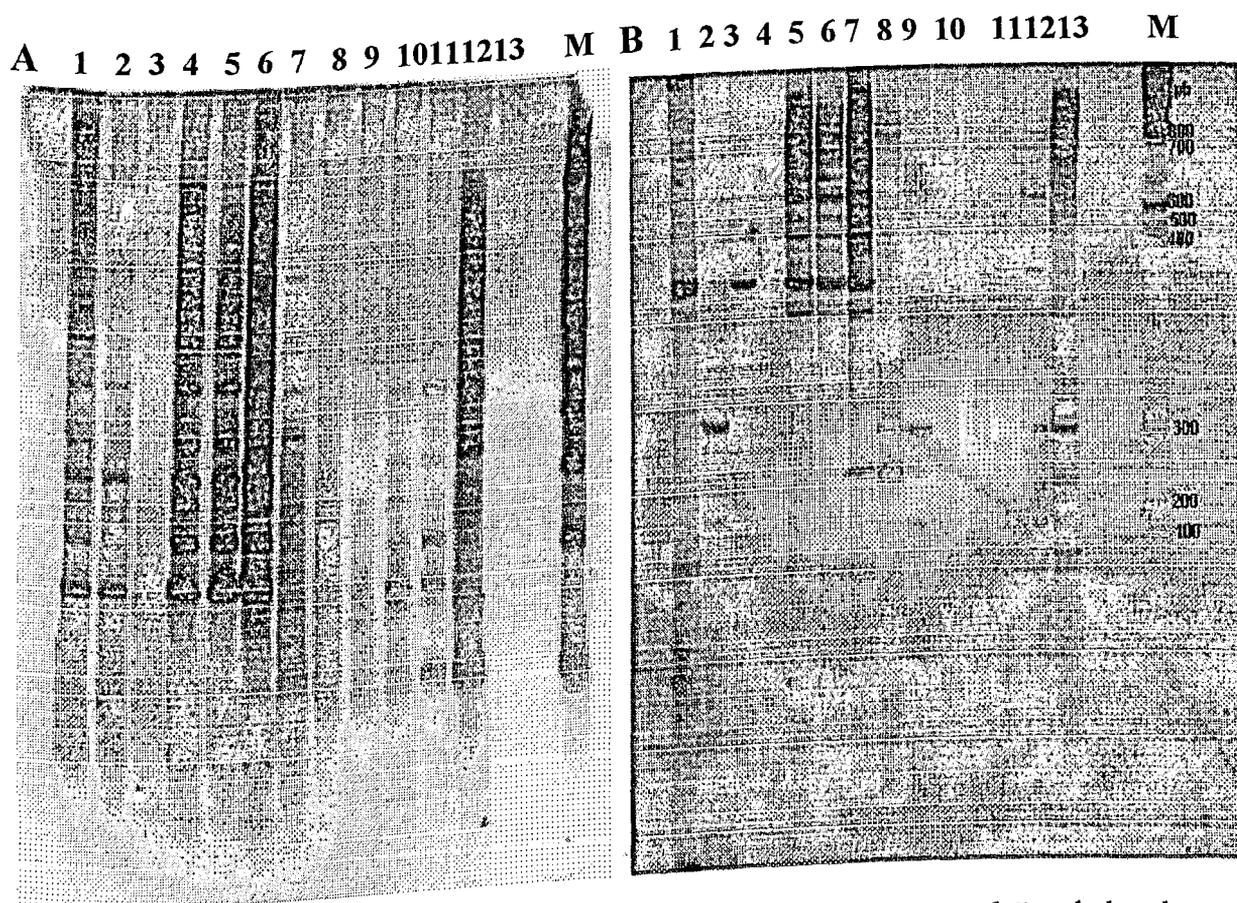


Figura 8: Perfil eletroforético em PAGE 6% comparando os diferentes padrões de bandas nos géis, desnaturante (A) e não desnaturante (B), utilizando os “primers” arbitrários OPA 14 (1 a 6) e OPA18 (7 a 13). M= marcador de 100pb

A comparação entre os fragmentos obtidos nos dois tipos de géis não pôde ser estabelecida, uma vez que, no gel não desnaturante o DNA “corre” em fita dupla e no desnaturante o mesmo “corre” em fita simples. Como nesse trabalho foram adotados os géis não desnaturantes, o padrão de bandas mostrado na Figura 8, bem como os polimorfismos detectados serão analisados posteriormente em gel não desnaturante (Figura 11).

De acordo com o descrito por LIANG e PARDEE (1992) e LIANG *et al.* (1993) o gel desnaturante mostra um maior número de bandas, enquanto o gel não desnaturante fornece um número menor. De acordo com BAUER *et al.*

(1993), o gel desnaturante é mais prático e fornece um bom padrão de bandas, o que se nota na Figura 8. Porém, como um dos objetivos desse trabalho foi o de otimizar a técnica para *Apis mellifera*, o gel não desnaturante mostrou-se eficaz.

Outros acréscimos foram os ensaios feitos para comparar a eficiência dos géis de poliacrilamida 6 e 10% no DDRT-PCR, corado por nitrato de prata. A Figura 9 evidencia a diferença na resolução das bandas de uma mesma condição submetida a diferentes géis.

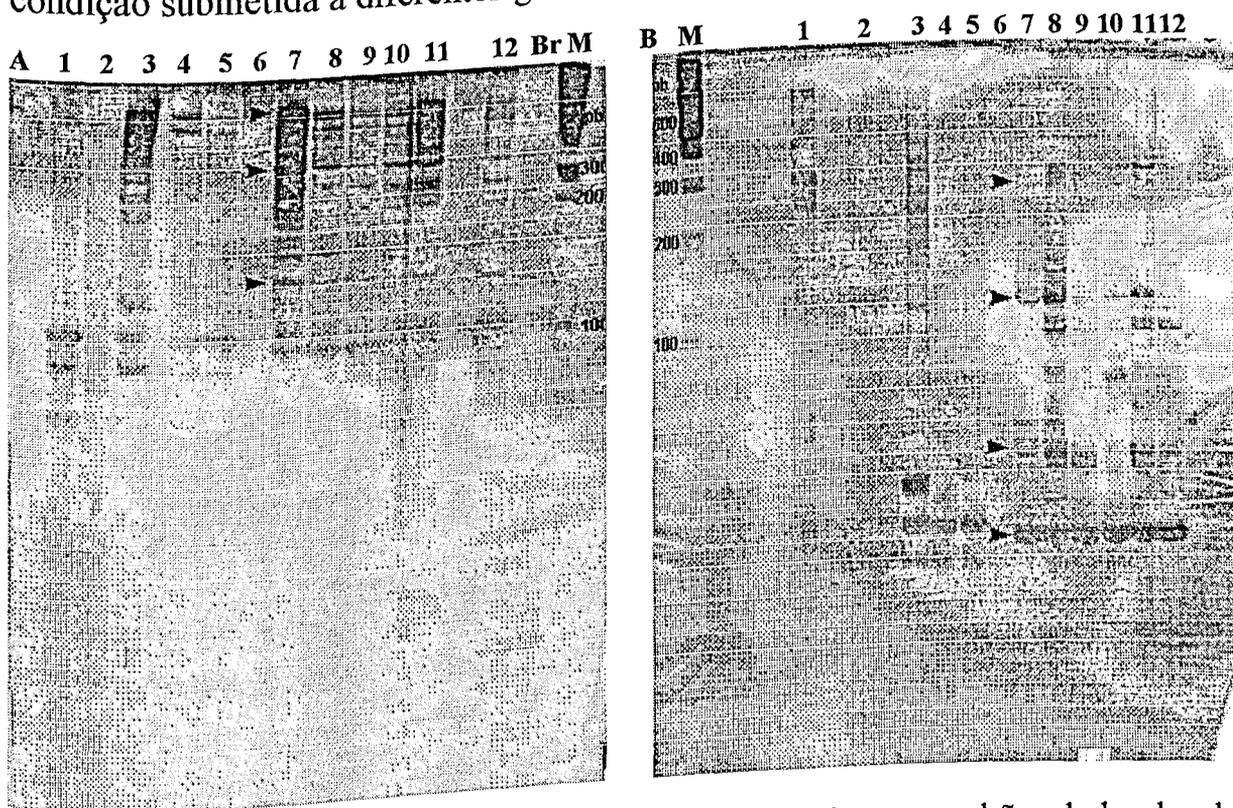


Figura 9: Perfil eletroforético em PAGE comparando os diferentes padrões de bandas dos géis 10 % (A) e 6% (B). M= marcador de 100 pb. Br.= branco, reação controle negativo. As setas indicam algumas bandas para comparação.

Ao analisar a Figura 9, notou-se que o gel de poliacrilamida 10% mostra um padrão onde as bandas estão mais bem definidas, e o gel nessa concentração é mais fácil de manusear. Já o gel 6%, também mostrou um bom padrão de bandas, porém notou-se que as bandas ficam difusas, além de apresentar alguns borrões o que dificulta visualizar a separação das bandas. As setas indicam algumas bandas que foram comparadas para comprovar o padrão

mais definido apresentado pelo gel 10%. Outra questão importante, é que o gel 6% é muito difícil de se manipular, fragmentando-se facilmente.

Quanto aos resultados do DDRT-PCR na divisão de trabalho de *Apis*, as Figuras 10, 11 e 12 mostram os padrões de bandas dos “primers” arbitrários selecionados combinados ao “primer” T₁₂GC, nas diversas idades estudadas.

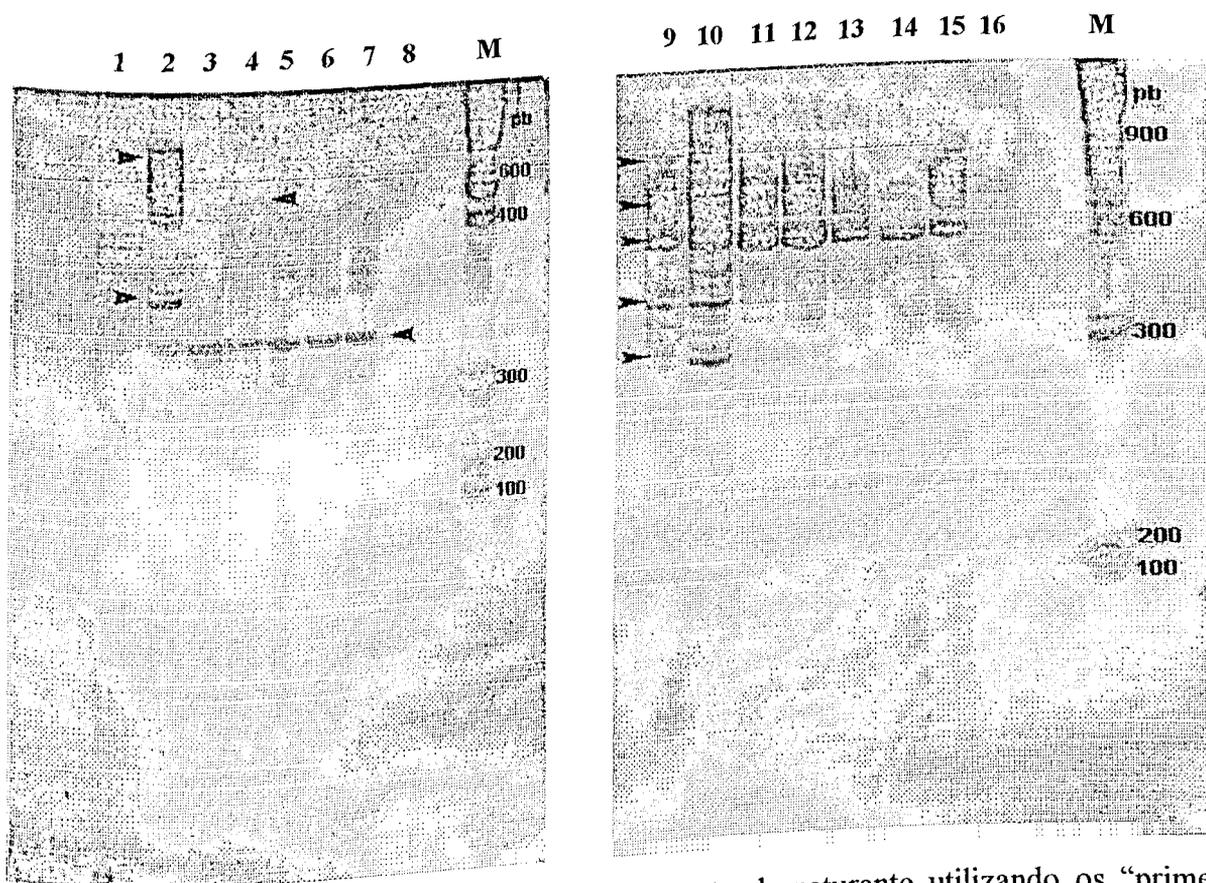


Figura 10: Perfil eletroforético em PAGE 10% não desnaturante utilizando os “primers” arbitrários OPA 16 (1 a 8) e OPA 17 (9 a 16). 1 e 9= abelhas de 1 dia, 2 e 10= 5 dias, 3 e 11= 10 dias, 4 e 12= 15 dias, 5 e 13= 20 dias, 6 e 14= 25 dias, 7 e 15= 30 dias, 8 e 16= controles negativos. M= marcador de 100pb. Setas indicam fragmentos diferencialmente expressos.

Analisando a Figura 10 nota-se que há várias bandas diferenciadas (setas), originadas da utilização dos “primers” OPAs 16 e 17. Essa diferenciação foi identificada pela ausência ou presença das bandas em determinados dias de vida ou pela maior ou menor intensidade das mesmas. Nas canaletas 2, 9 e 10 notou-se um número maior de bandas, com algumas ocorrendo somente no 5º dia. Esses fragmentos, que estão entre 300 a 500 e 600 a 900 pb (canaletas 2 e 10) expressos no 5º dia de idade, podem estar relacionados com as tarefas de

nutriz e/ou faxineira, pois tais funções foram desempenhadas por abelhas com 5 dias de idade na colmeia estudada (Figura 3). Então, esses fragmentos podem estar relacionados com a alta atividade das glândulas faríngeas, altamente desenvolvidas nessa fase.

Notou-se também, que um fragmento de aproximadamente 350 pb aparece do 5º ao 30º dia (canaletas 2 a 7), entretanto, este é fracamente visível no 5º dia e ausente no 1º. Isso pode indicar alguma expressão associada a um produto constitutivo cuja expressão se iniciou no 5º dia, que provavelmente possa estar associado à maturação da operária quanto ao seu sistema sensorial, ou seja, ao desenvolvimento de sua percepção.

Outro fragmento, de aproximadamente 600 pb, foi detectado nas canaletas 9 a 15, porém, com maior intensidade nas canaletas 10 a 12. Esse pico de maior intensidade pode estar relacionado a um ou mais fatores referentes a mecanismos fisiológicos envolvidos na preparação das operárias para desempenhar atividades de construção ou produção de cera.

Na mesma Figura 10 há ainda um fragmento, com cerca de 600 pb, representado fracamente na canaleta 4 (seta) e também detectado aos 5 dias (canaleta 2), estando ausente nos demais. O fato desse fragmento voltar a aparecer no 15º dia (canaletas 4 e 12) pode sugerir alguma associação com a tarefa de cuidar da cria. Essa tarefa foi desempenhada no 15º dia por um grande número de operárias (Figura 3). Ou então, pode estar relacionada com a diminuição na atividade de nutriz, que foi extinta a partir do 18º dia de vida. Assim, esse fragmento poderia ter uma relação com a regressão das glândulas hipofaríngeas.

Mais um fragmento que pode estar relacionado à regressão dessas glândulas é o detectado entre 1 a 15 dias (canaletas 9 a 12) e que apresenta aproximadamente 700 pb. Tal fragmento foi detectado somente nessas idades,

sendo com mais intensidade nos dias 5 e 10 (canaletas 10 e 11). Isso pode mostrar relações com a diminuição no desempenho da tarefa de nutriz que começa a decrescer nesse período (Figuras 2 e 3).

Na Figura 11 (OPAs 08 e 12) notou-se grande número de bandas nas canaletas 4, 5 e 6, com várias bandas específicas presentes somente nessas canaletas (20, 25 e 30 dias). Um fragmento de aproximadamente 370 pb mostrou-se presente nas canaletas 1 a 6, podendo ser um produto constitutivo, como já foi mencionado anteriormente. Outros dois fragmentos, um menor que 100 pb e o outro com aproximadamente 350 pb, foram detectados nas canaletas 1, 4, 5 e 6 estando ausentes nas canaletas 2 e 3, mostrando uma súbita parada na sua expressão, 10 e 15 dias. Pode-se supor que essa variação na expressão esteja relacionada como a flexibilidade na divisão de tarefas. Assim, as abelhas mais velhas, 20 a 30 dias, podem estar expressando cDNAs relacionados com as tarefas desempenhadas nos primeiros dias de vida.

A maior quantidade de bandas encontradas somente do 20^o ao 30^o dia podem significar cDNAs relacionados aos comportamentos mais elaborados que ocorrem nos últimos dias de vida (campeira, dança e patrulheira). Esses comportamentos estão associados com um maior grau de desenvolvimento cerebral e sensorial. Sendo assim, vários produtos são expressos nesse período, como descreveu PAIVA e CONTEL (1995) ao encontrar um padrão enzimático maior nos períodos onde as abelhas desempenham atividade de vôo (campeiras).

Quando se analisam as canaletas 7 a 13 (Figura 11) verifica-se maior expressividade de bandas no 30^o dia (canaleta 13), que também podem estar determinando fatores relacionados com o comportamento de forrageamento (campeira, patrulheira e dança). Um outro fragmento com cerca de 300 pb foi detectado somente nos dias 1 e 5 (canaletas 7 e 8) e, como os já tratados aqui, podem estar relacionados com as atividades de faxineira e nutriz. Por fim, dois

fragmentos se mostraram presentes no 5º dia (canaleta 8); um de aproximadamente 100 pb e outro de 200 pb. Esses fragmentos, sendo exclusivos do 5º dia, também podem sugerir cDNAs relacionados com a função de nutriz.

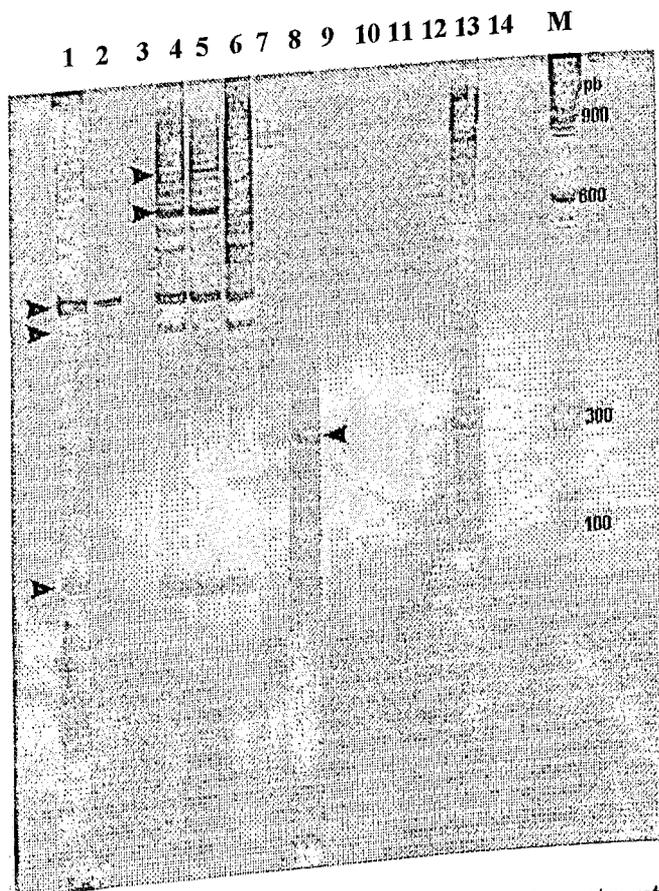


Figura 11: Perfil eletroforético em PAGE 10% não desnaturante utilizando os “primers” arbitrários OPA 08 (1 a 7) e OPA 12 (7 a 14). 1 e 7= abelhas de 1 dia, 8= 5 dias, 2 e 9= 10 dias, 3 e 10= 15 dias, 4 e 11= 20 dias, 5 e 12= 25 dias, 6 e 13= 30 dias, 14= controle negativo. M= marcador de 100pb. Setas indicam bandas diferenciadas.

Notou-se também, ainda na Figura 11, que nos dias 10 e 15 não ocorreram bandas (canaletas 3, 9 e 10), provavelmente, por um erro de pipetagem durante o processo do DDRT-PCR. Outra explicação poderia ser, realmente, a falta de cDNAs específicos para os “primers” OPAs 08 e 12 se anelarem. Essa última razão parece pouco provável, pois ambos são “primers” pequenos e fáceis de hibridizar com o cDNA molde, como foi comprovado nas outras amostras.

O material referente ao 5º dia e ao “primer” OPA 08, não foi aplicado nesse gel, pois houve degradação do RNA referente a essa idade e não haviam mais amostras amplificadas.

A Figura 12 evidencia o padrão de bandas conseguido pelo uso dos “primers” OPA 14 e 18. As amostras das canaletas 1 a 6, referentes ao “primer” OPA 14, mostraram poucas bandas, sendo que dessas, destacam-se os vários fragmentos (500 a 900 pb) que aparecem aos 15 dias de idade (canaleta 3). Provavelmente, como já foi discutido, esses fragmentos podem estar relacionados à produção de cera ou à construção de favos. Pôde-se ainda detectar três fragmentos, um de aproximadamente 200 pb, outro de 280 pb e um de 320 pb que aparecem em todos os dias, exceto no 10º e 30º (canaletas 2 e 6). Esse último não apresentou banda detectável, talvez por motivo de erro de pipetagem. A ausência desses fragmentos no 10º dia pode ser devido ao grande período em que as operárias estão imóveis, talvez produzindo cera, com a expressão de alguns genes parada e apresentando metabolismo basal.

Foi também verificado um fragmento com aproximadamente 350 pb presente no 15º dia (canaletas 3 e 9), podendo estar associado à tarefa de construção de favos ou produção de cera. Esse, pode ainda sugerir alguma associação com a tarefa de cuidados com a cria, pois essa é desempenhada de forma acentuada nesse dia de vida.

Ainda na Figura 12, quanto ao padrão de bandas obtido para o “primer” OPA 18, pode-se afirmar que foi o “primer” que apresentou melhor definição quando comparado com os outros OPAs. Foram encontrados fragmentos presentes de 1 a 30 dias de idade (canaletas 7 a 12). Essas bandas (com aproximadamente 600, 700, 900 e 1000 pb) estão destacadas por setas. Nota-se que esses fragmentos estão mais intensos na canaleta 7 (1 dia), diminuindo de intensidade nas canaletas 9 e 10 (15 e 20 dias) e aumentando

novamente no 25º dia (canaleta 11). Isso pode sugerir algum mecanismo de controle relacionado ao seu metabolismo, que permitem às operárias desempenhar cuidados com a cria. O aumento dessa atividade no 15º dia (Figura 3) associado à diminuição na intensidade dessas bandas (canaleta 9) é o maior indicativo disso. Talvez, a baixa na expressão desses fragmentos tenha influenciado, de alguma maneira, o desempenho acentuado dessa tarefa.

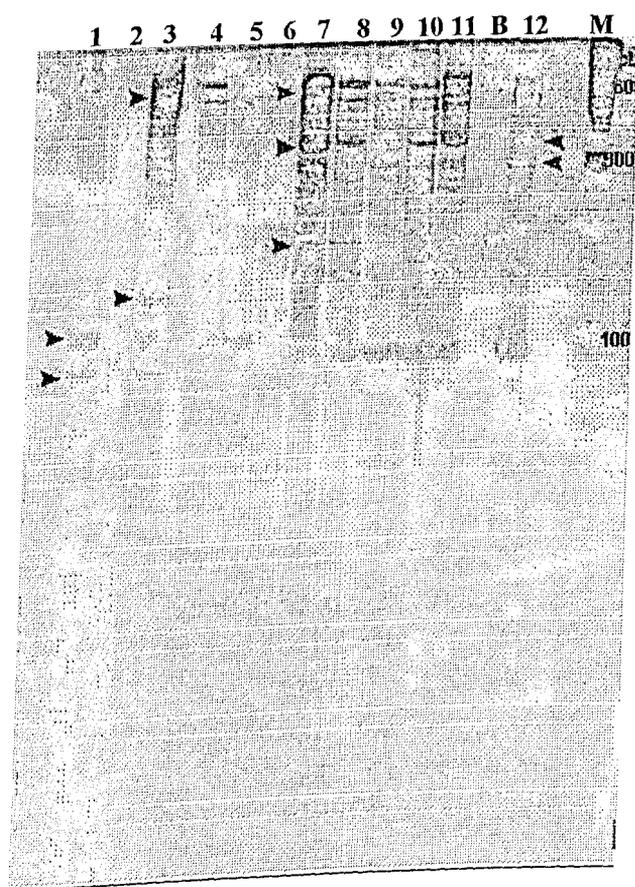


Figura 12: Padrão diferenciado de fragmentos da amplificação em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante utilizando os "primers" arbitrários OPA 14 (1 a 6) e OPA 18 (7 a 12). 1 e 7= abelhas de 1 dia, 2 e 8= 10 dias, 3 e 9= 15 dias, 4 e 10= 20 dias, 5 e 11= 25 dias, 6 e 12= 30 dias, B = controle negativo. M= marcador de 100pb. . Setas indicam bandas diferenciadas

Merecem também destaque dois outros produtos de amplificação, cDNAs, um com cerca de 400 pb e outro 450 pb. O primeiro mostrou uma expressão semelhante aos citados acima, podendo também sugerir a mesma relação com tarefa de cuidar da cria. Já o de 450 pb, esteve presente somente no 1º e 10º dia de vida (canaleta 7 e 8) mostrando-se ausente nos demais. Esse fato, pode apresentar uma relação com as tarefas de ninho (nutrição e limpeza) pois,

como já foi discutido anteriormente, essas são desempenhadas com mais frequência no intervalo de 1 a 10 dias (Figura 3).

Os "primers" OPAs aqui utilizados, quando comparados entre si, mostraram um padrão variado de bandas para cada idade. Por exemplo, o "primer" OPA 08 mostrou um padrão de bandas maior nos últimos dias de vida (20 a 30) (Figura 11), enquanto o OPA 17, ao contrário, evidenciou uma maior expressão nos primeiros dias após a emergência (1 a 10) (Figura 10). Assim, esse padrão variado de fragmentos comprova a necessidade de se usar vários "primers" arbitrários, em combinação com oligo d(T), para "varrer" toda expressão gênica numa determinada condição, como já descrito por LIANG e PARDEE (1992).

Outro resultado interessante foi obtido com a coloração por prata. Os fragmentos que foram melhor evidenciados, no geral, estavam entre 100 a 900 pb. Os fragmentos que eram menores ou maiores que esse intervalo não apresentaram padrão qualificado para análise. Ainda quanto à coloração por prata, AN *et al.* (1996) descreveu que essa fornece poucas bandas por reação, e que seus resultados são difíceis de controlar e inconsistentes, e que a sensibilidade é muito inferior à dos radioisótopos. Por outro lado, DOSS (1996) apresentou várias vantagens em se usar a prata: custo inferior aos radioisótopos; simplicidade e praticidade; resolução de fragmentos maiores que os detectados por ^{32}P . Entretanto, apesar dos testes com ^{35}S não fornecerem resultados conclusivos, constatou-se nesse trabalho que muitas outras bandas, não analisadas aqui, aparecem fracamente quando se utiliza a prata, o que reforça a idéia de novos testes para melhorar essa técnica. Por isso, e a partir das diferenças encontradas na expressão gênica da divisão de trabalho de *Apis*, novos estudos serão realizados para isolar, clonar e sequenciar os fragmentos polimórficos aqui descritos. Isso esclarecerá ainda mais o desenvolvimento das abelhas

4 - CONCLUSÕES

- A divisão de trabalho, observada na colmeia, está de acordo com o padrão de uma colmeia normal. Isso sugere que a sequência de tarefas foi executada de acordo com o desenvolvimento fisiológico normal das operárias, que ocorreu com o avanço da idade
- O tratamento com hipoclorito de sódio (2,5 %) foi o mais eficiente na eliminação de contaminantes bacterianos.
- A extração de RNA total de *Apis mellifera* foi otimizada com sucesso. O protocolo mais eficaz foi o que utilizou TRIZOL Reagent. Esse protocolo mostrou-se mais rápido, prático e com custo final inferior aos demais protocolos testados.
- A técnica DDRT-PCR, associada a coloração por nitrato de prata, foi otimizada para *Apis mellifera* mostrando ser uma técnica aplicável em estudos com abelhas e podendo ser utilizada como um método alternativo ao uso de radioisótopos.

- O DDRT-PCR associado à marcação por nitrato de prata mostrou-se eficaz em detectar, com facilidade, fragmentos de cDNA que correspondem a mRNAs altamente expressados e, conseqüentemente, com maior quantidade de produto amplificado.
- Das bandas diferenciadas, detectadas pela presença ou ausência em determinada idade ou pela sua variação na intensidade, destacam-se: três fragmentos (100, 200 e 300 pb) que podem estar relacionados à função de nutriz ou de faxineira (1^o ao 5^o dia); um com cerca de 350 pb presente somente no 15^o dia, que pode indicar associação com produção de cera e construção de favos e um último de 600 pb, presente em todas as idades, porém apresentando maior intensidade do 5^o ao 15^o dia, pode também ter relação com a construção de favos.
- O gel desnaturante poderá ser utilizado com maior eficiência para trabalhos futuros, onde visem o isolamento e sequenciamento de genes
- Pesquisas visando isolar, sequenciar e caracterizar os fragmentos diferenciados, encontrados nesse estudo, são necessários para se certificar a quais mecanismos esses fragmentos estão associados. E, ainda, como esses mecanismos regulam a divisão de trabalho da *Apis mellifera*.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

→ Sobre o DDRT-PCR

O DDRT-PCR é uma técnica rápida e confiável, entretanto, sua otimização requer atenção a alguns detalhes. Os “primers” oligo d(T) têm que ser otimizados individualmente, pois foi mostrado nesse trabalho que as mesmas condições de reação para “primers” ancorados não servem para “primers” degenerados. A utilização desses tipos de “primers” é amplamente discutida na literatura, então, recomenda-se que sejam selecionados e otimizados de acordo com o material biológico utilizado.

Os “primers” arbitrários, selecionados nesse trabalho, conforme estudos anteriores, mostraram que são capazes de “varrer” diferencialmente a expressão gênica em uma determinada situação. Isso foi concluído pelo diferentes padrões de bandas obtidos durante o experimento. Por isso, um maior número de “primers” deve ser utilizada para aumentar o “pool” de mensagens avaliadas na expressão gênica.

→ Sobre a coloração por nitrato de prata no DDRT-PCR

O uso do nitrato de prata permitiu a visualização e otimização das condições ideais para a realização do DDRT-PCR em *Apis*. Entretanto, outros estudos comparando essa metodologia com a marcação radioativa e com quimioluminescência são necessários para verificar melhor sua eficácia. A coloração por prata é prática e fácil de utilizar, além de ser mais barata e menos perigosa que os radioisótopos. Para se ter sucesso com a marcação por prata, são necessários uma boa amplificação e reagentes de qualidade. Dessa forma, novas pesquisas deverão ser realizadas na tentativa de melhorar a qualidade dessa metodologia, além de procurar formas para aumentar seu poder de resolução.

Outra ressalva ao desenvolvimento do DDRT-PCR, é que atualmente são encontrados no mercado vários "kits" que podem agilizar o trabalho. Entretanto, a otimização, a busca e a descoberta de novas alternativas é que difundem melhor o conhecimento, bem como auxiliam a entender mais claramente as técnicas da Biologia Molecular. Assim, a técnica do DDRT-PCR pode ser agilizada, mas deve ser adaptada a cada espécie em estudo.

→ Sobre esse trabalho

A difícil situação em que se encontra o País, afeta também a pesquisa. A crise atual foi o principal obstáculo à realização desse, entretanto, apesar do trabalho ser extenso, as idéias aqui nascidas serão colocadas em prática para solucionar as dúvidas já criadas e criar novas a serem solucionadas. É isso que torna a pesquisa interessante.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AN, G.; LUO, G.; VELTRI, R. W. e O'HARA, S M. 1996. Sensitive, nonradioactive differential display method using chemiluminescent detection. *BioTechniques*, 20(3): 342-346.
- ADATI, N.; ITO, T.; KOGA, C.; KITO, K.; SAKAKI, Y. e SHIOKAWA, K. 1995. Differential display analysis of gene expression in developing embryos of *Xenopus laevis*. *Biochimica et Biophysica acta*, 1262(1): 43-51.
- BAUER, D.; MÜLLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHOE, P. e STRAUSS, M. 1993. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Research*, 21(18): 4272-4280.
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G. e GRESSHOFF, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80-83.
- BLUM, H; BEIR, H. e GROSS, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- BROWERS E. V. M. 1982. Activation of the hypopharyngeal glands of honeybees in winter. *Journal of Apicultural Research*, 22(3): 137-141.

- CHOMCZYNSKI, P. e SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**(1): 156-159.
- CHOMCZYNSKI, P. 1992. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Research*, **20**: 3791-3792.
- COSTA-LEONARDO, A. M. 1985. Development cycle of the mandibular glands of *Apis mellifera* workers. 2. Effect of queenlessness. *Journal of Apicultural Research*, **24**(2): 76-79.
- COSTA-LEONARDO, A. M. e CRUZ-LANDIN, C. 1985. Ciclo de desenvolvimento das glândulas mandibulares de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) I- Influência da idade, tamanho da colônia e temperatura ambiente. *Revista Brasileira de Entomologia*, **29**(2): 205-215.
- CUNNINGHAM, M. E.; MALAYER, J. R.; YELICH, J. V. e GEISERT, R. D. 1996. Utilization of differential display PCR to identify changes in gene expression in early porcine conceptus development. *Journal of Animal Science*, **74** supl.1: 73.
- DIMOPOULOS, G. RICHMAN, A.; TORRE, A. D.; KAFATOS, F. C. e LOUIS, C. 1996. Identification and characterization of differentially expressed cDNAs of the vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics*, **93**: 13066-13071.
- DONADELLI, R.; NORIS, M.; REMUZZI, A.; GULLANS, S. R.; REMUZZI, G. e OPISIO, S. 1996. Differential display RT-PCR analysis reveals genes

differentially regulated by shear stress on endothelial cells exposed to laminar flow. **Journal of the American Society of Nephrology**, 7(9): 1561.

FEHLMANN, C.; KRAPF, R. e SOLIOZ, M. 1993. Reverse transcriptase can block polymerase chain reaction. **Clinical Chemistry**, 39(2): 111-114.

FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª Ed., EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, p. 37-38.

FREE, J. B. 1980. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. EPU: Ed. da Universidade de São Paulo. São Paulo, 79p.

GODING, J. W. 1998. Molecular protocols-Reverse transcriptase polymerase chain reaction. <http://www.Sciencexchange.com/sxprotocols/molbiol/rt.htm>

GUIMARÃES M. J.; LEE, F.; ZLOTNIK, A. e MCCLANAHAN. 1995. Differential display by PCR: novel findings and application. **Nucleic Acids Research**, 23(10): 1832-1833.

HADMAN, M.; ADAM, B-L.; WRIGHT JR., G. L. e BOS, T. J. 1995. Modifications to the differential display technique reduce background and increase sensitivity. **Analytical Biochemistry**, 226: 383-386.

- HELPS, N. R.; ADAMS, S. M.; BRAMMAR, M. W. J. e VARLEY, J. M. 1995. The *Drosophila melanogaster* homologue of the human BRC1 gene is highly expressed during embryogenesis. **Gene**, **162**(2): 245-248.
- HIRAI, M.; YUDA, M.; SHINODA, T. e CHINZEI, Y. 1998. Identification and cDNA cloning of novel juvenile hormone responsive genes from fat body of the bean bug, *Riptortus clavatus* by mRNA differential display. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **28**: 181-189.
- HOY, M. A. 1994. DNA amplification by the polymerase chain reaction: molecular biology made accessible. In: **Insect Molecular Genetics. An Introduction to Principles and Application**. Academic Press. San Diego, California, 203-240.
- HUANG, Z. Y. e ROBINSON, G. E. 1992. Honey bee colony integration: Worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**(24): 11726-11729.
- INNIS, M. A. e GELFAND, D. H. 1990. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SKINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, Inc., San Diego, California 92101. Academic Press Limited, 24-28. 3-12p.
- JEANNE, R. L. 1986. The evolution of the organization of work in social insects. **Monit. Zool. Ital.**, **20**: 119-133.

- JUNG, L. J. e SCHELLER, R. H. 1991. Peptide processing and targeting in the neuronal secretory pathway. **Science**, **251**: 1330-1335.
- KANG, D.; LIU, G.; GUNNE, H. e STEINER, H. 1996. PCR differential display of immune gene expression in *Trichoplusia ni*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **26**(2): 177-184.
- KANG, D.; LUNDSTRÖM, A. e STEINER, H. 1996. *Trichoplusia ni* attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an anti bacterial protein. **Gene**, **174**: 245-249.
- KERR, W. E. 1967. The history of introduction of African Bees in Brazil. **South African Bee Journal**, **39**: 3-5.
- KERR, W. E. 1969. Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). **Evolutionary Biology**, **3**: 119-175.
- KLEMENTZ R.; HULTMARK, D. e GEHRING, W.J. 1985. Selective translation of heat shock mRNA in *Drosophila melanogaster* depends on sequence information in the leader. **EMBO Journal**, **4**: 2053-2060.
- LIANG, P. e PARDEE, A. P. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, **257**: 967-971.
- LIANG, P.; AVERBOUKIN, L.; KEYOMARSI K.; SAGER, R. e PARDEE, A. B. 1992. Differential Display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. **Cancer Research**, **52**: 6966-6968.

- LIANG, P.; AVERBOUKH, L. e PARDEE, A. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. **Nucleic Acids Research**, **21**(14): 3269-3275.
- LIANG, P.; BAUER, D.; AVERBOUKH, L.; WARTHOF, P.; ROHRWILD, M.; MULLER, H.; STRAUSS, M. e PARDEE, A. B. 1995. Analysis of altered gene expression by differential display. **Methods in Enzymology**, **254**: 305-321.
- LINDAUER, M. 1953. Division of labour in the honey bee colony. **Bee World**, **34**: 63-73.
- MANNIATIS, T; GOODBOURN, S. e FISCHER, J. A. 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. **Science**, **236**: 1237-1245.
- MICHENER, C. D. 1974. **The social behavior of the bees**. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts, 404p.
- MICHENER, C. D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **Univ. Kansas Sci. Bull.**, **54**(4):75-164.
- MOMYIAMA, T.; AFELE, J. C.; SAITO, T.; KYANO, T.; TABEL, Y.; TAKAIWA, F.; TAKAYANAGI, K. e NISHIMURA, S. 1995. Differential display identifies developmentally regulated genes during somatic embryogenesis in egg plant (*Solanum melongena* L.). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **213**(2): 376-382.
- MOTLIK, J.; CARNWATH, J.W.; HERRMANN, D.; TERLETSKI, V.; ANGER, M. e NIEMANN, H. 1998. Automated recording of RNA

- differential display patterns from pig granulosa cells. **BioTechniques**, 24(1): 148-153.
- MOU, L.; MILLER, H.; LI, J.; WANG, E. e CHALIFOUR, L. 1994. Improvements to the differential display method for gene analysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 19(2): 564-569.
- OLIVEIRA, R. C. 1998. **Divergência genética por marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 50p.
- PAIVA, M. L. S. e CONTEL, E. P. B. 1995. Caracterização isoenzimática da hexoquinase no desenvolvimento de *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae) e sua relação com a atividade de vôo. **Revista Brasileira de Biologia**, 55 (supl. 1): 107-111.
- PARDO, A. M. 1979. La abeja africanizada: alguns aspectos sobre su origen, biología y manejo. **Conference de VI Congresso Colombiano de Entomologia/Cali.**, 40p.
- PASSAGLIA, L. M. P. e ZAHA, A. 1996. Técnicas de DNA Recombinante. In: ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Editora Mercado Aberto Ltda., Porto Alegre, R.S., p324.
- PEIXOTO, A. A. e HALL, J. C. 1997. Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of drosophila. **Genetics**, 148: 827-838.

- PLOMIN, ROBERT. 1990. The role inheritance in behavior. *Science*, **248**: 183-188.
- PURVES, W. K.; ORIANI, G. H. e HELLER, H. C. 1995. **Life: The Science of Biology**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 1196p.
- RIBBANDS, C. R. 1953. **The behaviour and social life of honeybees**. Bee Research Association Limited, London, 352p.
- RINDERER, T. E.; OLDROYD, B. P. e SHEPPARD, W. S. 1993. Africanized Bee in the United States. *Scientific American*, **269**(6): 52-58.
- ROBINSON, G. E. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. - *Annual Review of Entomology*, **37**: 637-665.
- RÖSCH, G. A. 1925. Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. 1. Die Tätigkeiten im normalen Bienenstaat und ihre Beziehungen zum Alter der Arbeitsbienen. *Z. vergl. Physiol.*, **2**: 571-631.
- ROSS, K. G. e KELLER, L. 1998. Genetic control of social organization in an ant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 14232-14237.
- RUTZ, W.; GERIG, L.; WILLE, H.; LÜSCHER, M. (1974). A bioassay for juvenile hormone (JH) effects of insect growth regulators (IGR) on adult worker honeybees. *Mitt. Schweiz. Ent. Ges.*, **47**: 307-313.

- RUTZ, W.; GERIG, L.; WILLE, H.; LÜSCHER, M. (1976). The function of juvenile hormone in adult worker honey bees, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, 22: 1485-1491.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. e ERLICH, H. A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALCOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. e ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230: 1350-1354.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS. 1989. **Molecular cloning: A Laboratorial Manual**. 2nd ed., vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring. New York, EUA.
- SELLNER, L. N.; COELEN, R. J. e MACKENZIE, J. S. 1992. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. **Nucleic Acids Research**, 20: 1487-1490.
- SEVERSON, D. W.; WILLIAMSON, J. L. e AIKEN, J. M. 1989. Caste-Specific transcription in the female honey bee. **Insect Biochemistry**, 2: 215-220.
- STORT, A. C. e GONÇALVES, L. S. 1979. A abelha africanizada e a situação atual da apicultura no Brasil. **Ciência e Cultura**, 31(1): 32-43.

- TRENTMANN, S. M.; KNAP, E. V. D. e KENDE, H. 1995. Alternative ^{35}S a label for the differential display of eukaryotic messenger RNA. **Science**, **267**: 1186.
- VERES, G.; GIBBS, R. A.; SCHERER, S. E. e CASKEY, C. T. 1987. The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. **Science**, **237**: 415-417.
- WANG, X. e FEUERSTEIN, G. Z. 1995. Direct sequencing of DNA isolated from mRNA differential display. **BioTechniques**, **18**(3): 448-453.
- WARTHOE, P.; BAUER, D.; ROHDE, M. e STRAUSS, M. 1995. Detection and identification of expressed genes by differential display *in PCR Primer: A laboratorial manual*. DIEFFENBACH, C. W.; DVESKLER, G. S. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EUA.
- WELSH, J. e MACCLELLAND, M. 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18**: 7213-7218.
- WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S. S.; CHENG, R.; RALPH, D. e MACCLELLAND, M. 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, **20**: 4965-4970.
- WHIFFLER, L. A.; DRUSEDAL, M. U. H.; CREWE, R. M. e HEPBURN, H. R. 1988. Defensive behavior and the division of labor in the African honeybee (*Apis mellifera scutellata*). **Journal of comparative physiology a sensory neural and behavior physiology**, **163**(3): 401-412.
- WHITE, T. J.; ARNHEIN, N. e ERLICH, H. A. 1989. The polymnerase chain reaction. **Technical Focus** **5**(6): 185-188.

- WIESE, H. 1995. **Novo manual de apicultura**. R. S. Livraria e Editora Agropecuária LTDA. Guaíba, Rio Grande do Sul, 292p.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. e; TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18**: 6531-6535.
- WILSON, E. O. 1984. The relation between caste ratios and division of labor in the genus *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae). **Behavior Ecol. Sociobiol.**, **16**: 89-98.
- WINSTON, M. L. 1992. The biology and management of africanized honey bees. **Annual Reviews Entomology**, **37**: 173-193.
- XINKANG, W. e FEUERSTEIN, G. Z. 1995. Direct sequencing of DNA isolated from mRNA Differential Display, **BioTechniques**, **18**(3): 448-452.
- ZIMMERMANN, J. W. e SHCULTZ, R. .M. 1994. Analysis of gene expression in the pre-implantation mouse embryo: use of m-RNA differential display. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**: 5456-5460.
- ZUCCHI, R. 1973. **Aspectos bionômicos de *Exomalopsis aureopilosa* e *Bombus atratus* incluindo considerações sobre a evolução do comportamento social (Hymenoptera-Apoidea)**. Tese de doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, 140p.