

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

DETECÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM *Melipona scutellaris*
(HYMENOPTERA, APIDAE).

Flávia Assumpção Santana

SISBI/UFU



1000210956

Uberlândia - MG
Maio - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
595.799-115
5932 L
TES/MEU

DETECÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM *Melipona scutellaris*
(HYMENOPTERA, APIDAE).

Flávia Assumpção Santana

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica – Área de Concentração: Genética

Uberlândia - MG
Maio - 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
BIBLIOTECA

SISBI/UFU

210956

D

FU000277650

FICHA CATALOGRÁFICA

S232d Santana, Flávia Assumpção, 1978-
Detecção de genes diferencialmente expressos em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) / Flávia Assumpção Santana. - Uberlândia, 2003.
76f. : il.
Orientador: Ana maria Bonetti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Abelha - Genética - Teses. 2. *Melipona* - Genética - Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 595.799-115 (043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

DETECÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM *Melipona scutellaris* (HYMENOPTERA,
APIDAE).

Flávia Assumpção Santana

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dra. Ana Maria Bonetti (orientador)
Examinadores: Dr. Waldesse Piragé de Oliveira Junior
Dra Maria Cristina Ramos Costa
Suplentes Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Dr. Carlos Roberto Ceron

Data da defesa : ____/____/____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
dissertação foram contempladas

Dra. Ana Maria Bonetti

Uberlândia - MG
Maio - 2003

Dedicatória

Aos meus pais, Santana e Odete, por todo o amor, carinho apoio durante todos os momentos de minha vida.

As minhas irmãs Fernanda e Fabiola por estarem presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida, infinita bondade e amor!

À Dra Ana Maria Bonetti pela orientação, pelo seu amor á pesquisa, não deixando que esta pare.

Aos amigos dos laboratórios do Instituto de Genética e Bioquímica pelo apoio, colaboração, força, paciência e amizade durante este tempo de convivência.

Aos membros da banca examinadora, Dr Waldesse Piragé de Oliveira Junior e Dra Maria Cristina R Costa por aceitar o convite feito e as colaborações feitas para a melhoria deste trabalho.

Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica, pelos ensinamentos e ajuda emprestando equipamentos e materiais.

Ao amigo Francis, incentivador desse trabalho, pela inestimável colaboração nas etapas de clonagem, sequenciamento e análises.

Ao Prof Dr Wilson Araújo da Silva Jr, chefe do laboratório de Clonagem do Centro de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto/FMRPUSP pelas facilidades concedidas, permitindo que parte dos experimentos fossem conduzidos em seu laboratório.

Aos recursos financeiros concedidos pela CAPES, CNPq e FAPEMIG, sem os quais esse trabalho não poderia ter sido realizado.

E por fim um agradecimento especial, aos meus amigos Hugo, Lílian, Luciana, Narcisa, Teresa, Marcolino e Jock e ao meu namorado Allan, pela força nos momentos difíceis, paciência, pelos conselhos, pelo carinho...

ÍNDICE:

INTRODUÇÃO GERAL

I-Resumo Geral	1
1-Introdução	2
1.1- Determinação de Sexo e Casta em <i>Melipona</i>	3
1.2- Desenvolvimento em <i>Melipona</i>	6
1.3- Hormônio Juvenil (HJ)	8
1.4-Reação em Cadeia da Polimerase-PCR	9
1.5- Differential Display Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR)	12
1.6- Aplicações da Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR)	15
2-Referências Bibliográficas	17

CAPÍTULO 1

1- Introdução	27
1.1- Resumo	29
2- Material e Métodos	30
2.1 Material Biológico	30
2.2 Extração de RNA total e Remoção de DNA Cromossomal	30
2.3 Differential Display Reverse Transcriptase-PCR (DDRT-PCR)	31
2.3.1 Transcrição Reversa	31
2.3.2 DD-PCR	32
2.4 Clonagem	33
2.4.1- Transformação	33
2.5 Seqüenciamento	34
2.6 Análise das seqüências	35
3- Resultados e Discussão	36
4- Conclusão geral	51
5- Referências Bibliográficas	52
6- Anexos	56

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1:** Modelo de segregação de castas em *Melipona* proposto por KERR 1974 (com autorização do autor). 5
- Figura 2:** Estágios do desenvolvimento ontogenéticos de *Melipona compressipes fasciculada*, segundo KERR *et al*, 1996, (com autorização do autor). 7
- Figura 3:** Esquema do tempo de desenvolvimento ontogenético (em dias) de *Melipona* 7
- Figura 4:** Esquema das etapas da PCR: desnaturação, anelamento e extensão 11
- Figura 5:** Esquema da técnica DDRT-PCR segundo LIANG & PARDEE 1992. 14

CAPITULO 1:

- Figura 1:** Padrão de RNA de *Melipona scutellaris* obtido pelo método Trizol, em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, (A) RNA total (B) RNA total após remoção do DNA contaminante pela digestão com DNase I.
1 - L1, 2 - L2, 3 - L3, 4 - LPD, 5 - LD, 6 - PO, 7 - PR, 8 - O, 9 - RV, 10 - RI
38

Figura 2: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, utilizando os *primers* HT11G-OPA16. A seta → indica a diferença de intensidade na expressão de fragmento com expressão diferencial que ocorre em L1, L2, L3, LPD e LD. A seta ↔ indica o fragmento específico de L1 e a ●→ L2

39

Figura 3: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, utilizando os *primers* HT11G-OPf12. A seta → indica os fragmentos expressos apenas em larva pré-defecante.

40

Figura 4: Padrão de cDNAs diferencialmente expressos durante o desenvolvimento ontogenético de *Melipona scutellaris* com diferentes combinações de primers, após eluição e reamplificação.

Os fragmentos foram diferencialmente expresso nos estágios e combinações de *primers*:

- 1- L1 a L3 com HT11G-AP05
- 2- L1 e L2 com HT11G -AP05
- 3- O, RV e RI com HT11G -AP05
- 4- L1 e L2 com HT11C-AP05.
- 5- e 6 - LPD com HT11G -OPF12
- 7- LD com HT11G -OPF12
- 8- PR e RI com HT11G -OPF12
- 9 e 10 – L1, L2, L3, LPD, LD com HT11G -OPA16
- 11- L1, L2, L3 com HT11G -OPA16
- 12- L1, L2 com HT11G -OPA16
- 13- L2, com HT11G -OPA16
- 14- L1 com HT11G -OPA16
- M- marcador molecular de 100pb.

A seta → indica os fragmentos selecionados para seqüenciamento

41

Figura 5: Padrão dos produtos de PCR dos clones em gel de agarose 1%. O tamanho de cada fragmento corresponde ao inserto de interesse mais um pedaço de seqüência do vetor adjacente ao inserto.

M- Marcador Molecular

2- Fragmento obtido de L1 e L2 utilizando os *primers* HT11G -AP05

3- Fragmento obtido de O, RV e RI utilizando os *primers* HT11G -AP05

4- Fragmento obtido de L1 e L2 utilizando os *primers* HT11C-AP05

12- Fragmento obtido de L1, L2 utilizando os *primers* HT11G -OPA16

13- Fragmento obtido de L2 utilizando os *primers* HT11G -OPA16

42

Figura 6: Seqüência do fragmento específico de L2 de *Melipona scutellaris* pela combinação dos *primers* HT11G-OPA16.

44

Figura 7: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, utilizando os *primers* HT11G-OPF12. A seta indica o fragmento expresso em pupa de rainha natural e rainha adulto induzida por HJIII.

44

Figura 8: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, utilizando os *primers* HT11G-AP05. A seta indica o fragmento estágio específico, L1, L2 e L3.

45

Figura 9: Distribuição das seqüências com identidade à seqüência específica de adultos (RV, RI e O) de *M. scutellaris*, por meio de BLAST n.

46

Figura 10: Seqüência do fragmento específico de L1 e L2 de *Melipona scutellaris* pela combinação dos *primers* HT11G-AP05

46

Figura 11: Distribuição das seqüências homologas a seqüência analisada apresentada, por meio de BLAST x, A seta indica a homologia entre a

seqüência referente às fases L1 e L2 de *M. scutellaris* com domínio protéico de tioredoxina disulfeto reductase de *Clostridium sporogenes* 47

Figura 12: Seqüência do fragmento específico de L1 e L2 de *Melipona scutellaris* obtido pela combinação dos *primers* HT11G-OPA16 48

Figura 13: Distribuição das seqüências homologas mostradas, por meio de BLAST x, A seta indica a homologia entre a seqüência referente às fases L1 e L2 de *M. scutellaris* com homologia clone de DNA humano similar a proteína SALL1 de *Drosophila*. 48

ÍNDICE DE TABELA:

CAPITULO 1

Tabela 1: Seqüência dos *primers* oligodT utilizados na transcrição reversa 31

Tabela 2: Seqüência dos *primers* aleatórios utilizados no DD-PCR. 32

LISTA DE ABREVIATURA

μ l	Microlitro
μ M	micromolar
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
DDRT	Differential Display Reverse Transcriptase
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
HJ	Hormônio Juvenil
L1	Estágio larval 1
L2	Estágio larval 2
L3	Estágio larval 3
LD	Larva defecante
LPD	Larva pré defecante
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT	Transcriptase reversa
AFLP	Amplified Fragment Length Polimorfic
RAPD	Random Amplified Polimorfic DNA
PO	pupa de operária
PR	pupa de rainha
RI	rainha induzida por HJIII
RV	rainha virgem
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
U	unidade

I- Resumo Geral

As abelhas apresentam os mais variados graus de sociabilidade, desde espécies solitárias até eussociais. Nas colônias de abelhas eussociais há duas castas, rainhas e operárias, e machos, cada um deles com funções específicas. KERR propôs um modelo de regulação gênica para explicar a segregação 3:1 no nascimento em larvas de *Melipona*, pelo quais dois genes principais X^a e X^b , com dois alelos cada um, seriam os responsáveis por produtos feminizantes. O Hormônio Juvenil (HJ) é um dos mais importantes hormônios de insetos, influenciando as principais funções do seu complexo sistema fisiológico. Nesse estudo, usamos a técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (DDRT-PCR) para comparar a expressão gênica de *Melipona scutellaris*, em operária e rainha adulta, rainha natural e induzida por Hormônio Juvenil II e no desenvolvimento ontogenético pós embrionário. Fragmentos diferencialmente expressos foram obtidos com as combinações dos *primers*: HT11G-AP05; HT11C-AP05; HT11G-OPF12; HT11G-OPA16. A combinação HT11G-AP05 revelou, em L1 (larva 1) e L2 (larva2, um produto que clonado, seqüenciado e analisado em banco de dados, mostrou identidade com um domínio protéico de tiorredoxina dissulfeto redutase de *Clostridium sporogenes*, proteína importante nos processos de oxirredução na célula. Em L1 e L2, a combinação dos *primers* HT11G-OPA16 revelou um produto que mostrou identidade com o gene *sall1* de *Drosophila*, gene que codifica para uma proteína requerida para a formação de estruturas antero-posterior, durante a embriogênese e cujo produto é importante para a manutenção da heterocromatina. Caso se confirme a identidade com esses 2 genes, o da tiorredoxina e o da *sall1*, seria possível inferir para *Melipona*, funções similares e relevantes no desenvolvimento embrionário e na regulação de genes próximos a regiões heterocromáticas, além de manutenção do próprio estado altamente heterocromático que se verifica em *Melipona*.

1- INTRODUÇÃO

Os insetos ultrapassam, em número, todos os outros animais, representando cerca de 80% do reino animal (ADIS, 1990). São os animais terrestres mais bem sucedidos, tendo em vista o grande número de espécies e a considerável radiação adaptativa sofrida por eles. A ordem Hymenoptera é a terceira em número de espécies e a primeira em importância, nos mecanismos de perpetuação de espécies vegetais. Sua principal função na natureza é a polinização das flores e conseqüente produção de sementes e frutos, podendo ser responsáveis por 40 a 90% da polinização das árvores nativas (KERR *et al.* 1996).

Como são organismos adaptados ao meio em que vivem, estão seriamente ameaçados pela ocupação irracional do homem em todos os espaços, poluindo o ar e as águas, derrubando e queimando as florestas e matando os animais, fatores que, gradativamente, estão extinguindo vários seres em virtude da quebra da cadeia ecológica.

Uma média de 23000 espécies de abelhas perfazem a superfamília Apoidea que apresenta grande variação comportamental, habitats e níveis de organização. As abelhas sociais pertencem às famílias Halictidae, Anthophoridae e Apidae (ROIG-ALSINA & MICHENER 1993).

Cerca de 300 espécies conhecidas são nativas do Brasil, constituindo a tribo Meliponini, composta por abelhas sem ferrão. Elas se distinguem das outras tribos por algumas características peculiares tais como: atrofia do ferrão, redução e fragilidade da venação e pela ausência de pêlos nos olhos (MOURE, 1961; SAKAGAMI, 1982, MICHENER, 1990; CARVALHO 2000; TANNUS-NETO, 2001).

Uma característica dos insetos é apresentar polifenismo, morfologia alternativa acompanhada de fisiologia e comportamento diferentes. Formas alternativas, expressas por espécies polifênicas, possibilitam adaptações para diferentes condições ambientais (EVANS & WHEELER, 1999).

A criação racional das abelhas sem ferrão é uma maneira de preservá-las e, para isso, devem ser levados em consideração alguns fatores como, o local de implantação do meliponário, que deve ter muitas flores, água, luz solar e sombreamento em proporção adequada e, principalmente, número adequado de colméias em um raio de um quilômetro, fator importante para que não se perca a variabilidade genética devido ao endocruzamento, com conseqüente morte das colônias. Esse número corresponde, segundo YOKOYAMA e NEI (1979), ao mínimo de 44 colônias de uma mesma espécie em um mesmo local (raio de 1 Km, aproximadamente) e foi definido em função do sistema de determinação do sexo e de acasalamento dos Meliponíneos.

Considerando-se que estas abelhas estão intrinsecamente ligadas à polinização de espécies vegetais que compõem a diversidade da flora brasileira, torna-se importante conhecer sua biologia e os mecanismos genéticos envolvidos no seu desenvolvimento, para contribuir com sua preservação e conseqüente preservação da biodiversidade.

1.1- DETERMINAÇÃO DE SEXO E CASTA EM *Melipona*

As colônias de abelhas são formadas por fêmeas de duas castas, rainhas e operárias, e pelos machos, cada um deles com funções específicas. As rainhas são fêmeas férteis, responsáveis pela postura; as operárias são fêmeas estéreis, que desenvolvem diferentes funções, de acordo com a idade e necessidades da colônia e que podem dar origem a machos, pela postura de óvulos não fecundados. Elas cuidam da manutenção da colônia, ou seja, fazem a limpeza da colméia, coleta de alimento, construção dos alvéolos, alimentação das crias, entre outros (ZUCOLOTO, 1973; COSTA, 1996).

As castas nas abelhas podem ser definidas pela quantidade e/ou qualidade de alimento, pelo comportamento ou, ainda, por mecanismo genético-alimentar. A determinação por comportamento tem como exemplo a vespa *Polistes gallicus*, na qual não há diferenças morfológicas ou genéticas entre as fêmeas. A rainha, nesta espécie, é uma das fêmeas que se sobressai em relação às demais (ROSELER *et al.*, 1980 *apud* BONETTI, 1982).

Em *Apis*, a determinação de casta é, essencialmente, trofogênica, ou seja, feita por meio de alimento (KERR & NIELSEN, 1966). Assim, os ovos têm a mesma constituição genética e a casta é determinada pela quantidade e qualidade do alimento recebido após o terceiro dia da fase larval (BEETSMA, 1979 *apud* BONETTI, 1982).

Em *Melipona*, a variação da quantidade e qualidade de alimento por si só, não é capaz de induzir a diferenciação da casta. KERR (1946, 1948, 1950, 1974) e KERR e NIELSEN (1966) propõem a ocorrência de uma interação entre alimento e genética na determinação de castas dessas abelhas, sendo que rainhas são produzidas pela dupla heterozigose de dois genes X^a e X^b , associada à alimentação suficiente da larva, enquanto que as operárias são determinadas pela homozigose de um desses genes ou de ambos, independentemente da quantidade de alimento que a larva receba. Larvas heterozigotas, adequadamente alimentadas, se desenvolvem em rainhas e larvas homozigotas ou larvas heterozigotas mal alimentadas se tornam operárias em consequência de baixa produção de Hormônio Juvenil e não expressão de genes feminizantes. Os genes X^a e X^b seriam responsáveis por algum passo na cadeia de reações bioquímicas de síntese de Hormônio Juvenil.

Em *Melipona*, os genes que conferem características feminizantes estão presentes tanto em machos como fêmeas, sendo que em zangões não se expressam; em operárias estão parcialmente ativos e em rainhas estão totalmente ativos (BONETTI 1982).

Em consequência desse mecanismo, a segregação das castas nos meliponínios ocorre em uma proporção de 3 operárias para 1 rainha (Figura1).

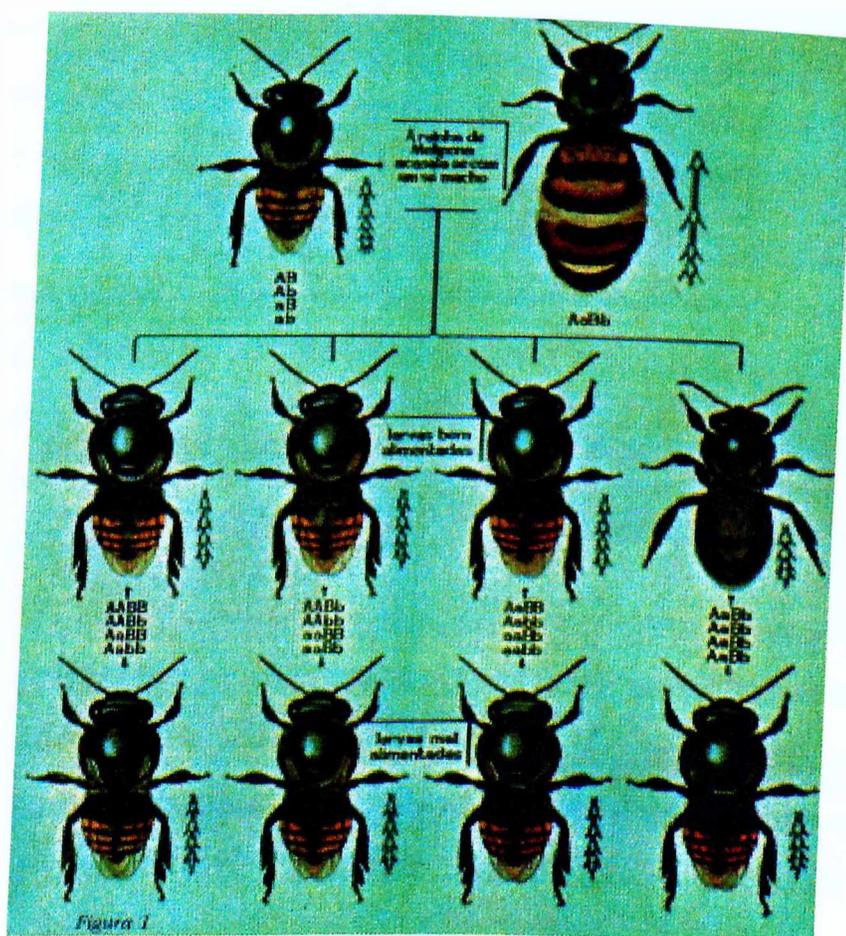


Figura 1: Modelo de segregação de castas em *Melipona* proposto por KERR 1974 (KERR, *et al* 1996, com autorização dos autores).

1.2- DESENVOLVIMENTO EM *Melipona*

As abelhas, como insetos holometábolos, apresentam 4 estágios de desenvolvimento ontogenético, a saber, embrião, larva, pupa e adulto. A célula de cria, em *Melipona*, é totalmente provisionada antes da postura pela rainha. Quando o ovo eclode, a larva passa por um processo de desenvolvimento até chegar à fase de pré-pupa e esse desenvolvimento implica na ingestão de todo alimento que a célula de cria contém. Depois desse período, a pré-pupa tece o casulo e a célula de cria continua fechada até o completo desenvolvimento do adulto, quando as operárias da colônia retiram a cera da parte superior do casulo e o adulto emerge (Figura 2).

Durante o desenvolvimento larval, o tempo gasto entre duas mudas é conhecido por **estágio** (PURVES, *et al.* 1995) e características como forma, idade e cor apresentadas por um inseto durante um estágio particular são chamadas de **instar** (PARRAS & HADDAD 1998). Os estágios de larva, pupa e adulto em abelhas são descritos com base em caracteres da morfologia externa. Em *Melipona*, o ciclo de desenvolvimento corresponde ao mostrado na Figura 3.

O estágio de Larva subdivide-se em 03(três) instares (L1, L2 e L3) (DIAS *et al.*, 2001) sendo que Larva (L3) compreende Larva pré-defecante (LPD) e Larva defecante (LD) que precedem o estágio de pupa.

Em *Melipona*, as células de cria são iguais para todos os indivíduos (operária, rainha e machos) sendo possível distingui-los apenas a partir da pupa.

Os machos originam-se por partenogênese arrenótoca sendo, portanto, haplóides, enquanto que as fêmeas são diplóides, originadas de ovos fecundados.

BEZERRA (1994) observou que rainhas de *Melipona quadrifasciata* nascem com maior frequência na periferia dos favos e os machos emergem,

preferencialmente, da região central. Isso pode ser devido ao fato das células da periferia serem aprovisionadas com maior quantidade de alimento larval do que as células do centro do favo.

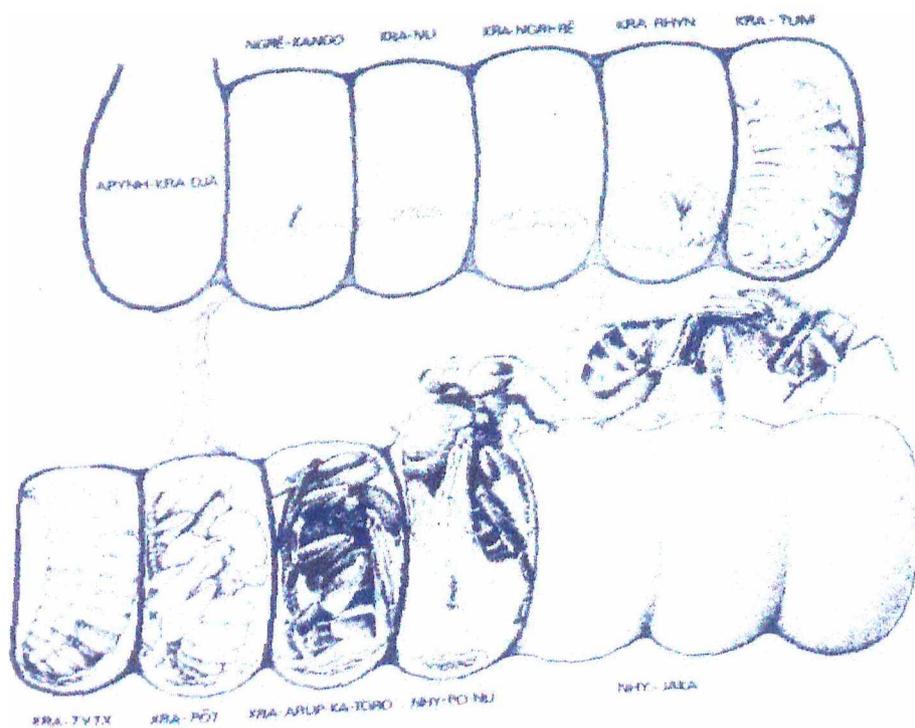


Figura 2: Estágios do desenvolvimento ontogenético de *Melipona compressipes fasciculada*, (Retirado de KERR et al, 1996, com autorização do autor).

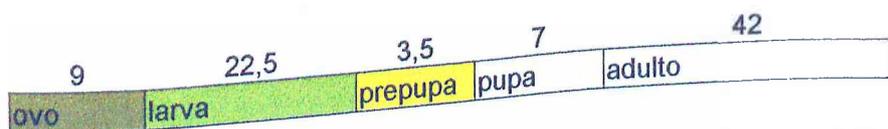


Figura 3: Esquema do tempo médio de cada etapa do desenvolvimento ontogenético (em dias) de *Melipona*. (Dados retirads de KERR, 1996)

As necessidades enzimáticas para o desempenho metabólico das atividades tecido-específicas variam em cada fase do desenvolvimento. Assim, algumas enzimas podem ser requeridas e apresentar atividade na fase embrionária, desaparecer nas fases larvais e de pupa, voltando a se expressarem na fase adulta (REZENDE, 1997).

O tempo de duração das diferentes fases do desenvolvimento varia entre espécies e, algumas vezes, entre indivíduos da mesma espécie. Além disso, uma diferença de poucas horas pode ser muito importante, quando se considera o "ligar" e "desligar" de genes e os títulos de enzimas correspondentes.

A atividade de algumas enzimas aumenta, diminui ou não é detectada em momentos precisos no decorrer do desenvolvimento de vários organismos, o que indica que o processo de desenvolvimento é controlado direta ou indiretamente por mudanças no padrão de expressão gênica (REZENDE, 1997).

1.3- HORMÔNIO JUVENIL (HJ)

O Hormônio Juvenil (HJ) constitui uma família de derivados do ácido farnesóico, produzido pelas glândulas *corpora allata*, secretado na hemolinfa e transportado até os tecidos alvo. Entra nas células por difusão, através das membranas e interagem com o genoma, provavelmente, via receptor da superfamília esteróide (DAVEY, 2000).

O HJ é um dos mais importantes hormônios de insetos, influenciando as principais funções do seu complexo sistema fisiológico (SILVA, 1999). Quando é aplicado em abelhas, promove o aparecimento de características de fêmeas completas (CAMPOS, 1979; BONETTI, 1983; SILVA, 1999, SILVA, 2000), desempenhando um papel importante na diferenciação de castas nos insetos

sociais, tais como ativação do aparelho reprodutor externo e interno, diferenças morfológicas, entre outras (BONETTI, 1984; HARTFELDER, 2000).

A aplicação tópica de Hormônio Juvenil no final do terceiro instar larval e em Larva pré-defecante (LPD) de *Melipona* desencadeia mecanismos genéticos que promovem a diferenciação de larvas fêmeas em rainhas (BONETTI 1983, 1984; BONETTI *et al*, 1994; BONETTI *et. al*, 1995).

BONETTI *et al.* (1995) e SILVA (1999) mostraram que o HJ III na dosagem de 0,5µg/µl é capaz de induzir a produção de até 100% de rainhas em *Melipona scutellaris* quando aplicado, topicamente, em larvas pré-defecantes (LPD). Altas concentrações de HJ, como 1 a 5 µg/µl, abaixam a taxa da produção de rainhas e aumentam a taxa de mortalidade e a aplicação tópica de HJ em rainha em ovoposição, não produz qualquer efeito na cria nascente (BONETTI & KERR, 1987).

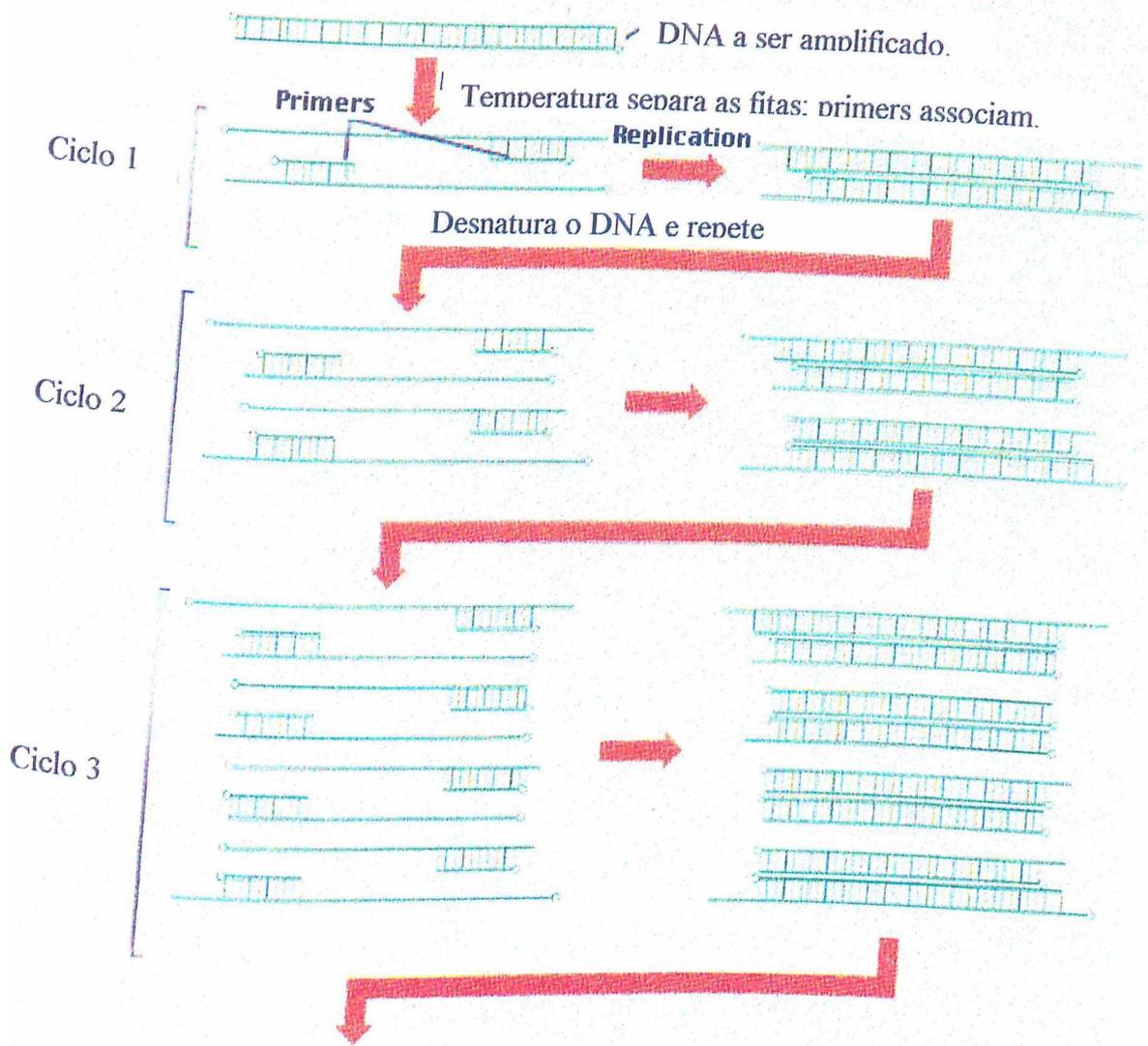
1.4- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Um grande avanço na genética foi o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase por Kary Mullis em 1985 (MULLIS & FALOONA, 1987). É uma técnica que permite a amplificação, *in vitro*, de um segmento molde de DNA por meio de *primers* específicos ou inespecíficos, que delimitam a seqüência alvo de amplificação, em presença da enzima DNA polimerase. A partir desta técnica várias outras metodologias foram desenvolvidas tais como: RAPD, AFLP, RT-PCR, DDRT-PCR, entre outras.

A reação em cadeia da polimerase consiste em três fases: desnaturação, anelamento e extensão. São feitos vários ciclos, obtendo-se ao final mais de um milhão de cópias do DNA alvo. O DNA molde é desnaturado pela elevação da temperatura para 92°C a 95°C. A temperatura é reduzida para 40°C - 60°C, na

para que o *primer* se associe à seqüência complementar. Após o anelamento ocorre a extensão da fita pela adição de nucleotídeo no sentido 5'→3', a partir da extremidade 3'OH livre do *primer*, à temperatura de 72°C (revisão em FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A quantidade de DNA molde dobra a cada ciclo, ou seja, a amplificação do fragmento segue uma progressão geométrica de maneira que, com apenas 20 ciclos, obtém-se de um milhão de cópias da seqüência alvo inicial, delimitada pelos *primers* (WHITE *et al*, 1989) (Figura 4).



Depois de 30 ciclos > 1 bilhão de moléculas idênticas ($2^{30}=1,07 \times 10^9$).

Figura 4: Esquema de uma reação de PCR: desnaturação, anelamento e extensão, em 3 ciclos consecutivos.

1.5- DIFFERENTIAL DISPLAY REVERSE TRANSCRIPTASE- POLYMERASE CHAIN REACTION (DDRT-PCR)

A identificação de genes diferencialmente expressos em organismos e/ou tecidos tem sido usada para se entender a função dos genes e, também, dos mecanismos moleculares básicos de diferentes processos biológicos (VEDOY *et al.*, 1999). O padrão de mudanças na expressão gênica é responsável pelos processos de desenvolvimento celular e métodos efetivos são necessários para identificar os genes expressos alternativamente em células ou sob condições diferentes (LIANG & PARDEE, 1992). A expressão gênica diferencial pode ser detectada por meio de várias técnicas como, hibridação diferencial, hibridação subtrativa, *differential display* ou *fingerprinting* do RNA (VEDOY *et al.*, 1999).

A partir de 1992, a técnica de Differential Display Reverse Transcriptase (DDRT) baseada na Polymerase Chain Reaction (PCR) tem inovado a área de estudo da expressão gênica (Figura 5). Esta técnica, descrita inicialmente por LIANG e PARDEE (1992), é um poderoso instrumento para identificação, isolamento e clonagem de genes que são diferencialmente expressos em células de eucariotos (LIU & RAGHOTHAMA, 1996). A técnica usa as propriedades da PCR para obter cDNA a partir do RNA total de um eucarioto, utilizando um *primer* oligodT com uma base ancorada, que pode ser A (adenina), C (citosina) ou G (guanina) com 10 ou 13 bases que se anelam na extremidade 3' do mRNA (cauda poliA). As espécies de cDNA obtidas são então amplificadas usando-se *primers* arbitrários que se associam na porção 5' e *primers* ancorados na 3'. Os fragmentos são separados por migração em eletroforese e aqueles que são identificados como diferencialmente expressos, nas situações comparadas, são isolados, reamplificados, clonados e seqüenciados.

Segundo LIANG *et al.* (1995) uma metodologia que se proponha a analisar a expressão gênica deve apresentar as características de: a) permitir a

visualização da maioria dos mRNAs de uma célula; b) apresentar alta reprodutibilidade; c) permitir comparar mRNA de fontes diferentes; d) as diferenças devem ser suficientes para identificar e isolar os cDNAs; e) deve ser rápida e fácil.

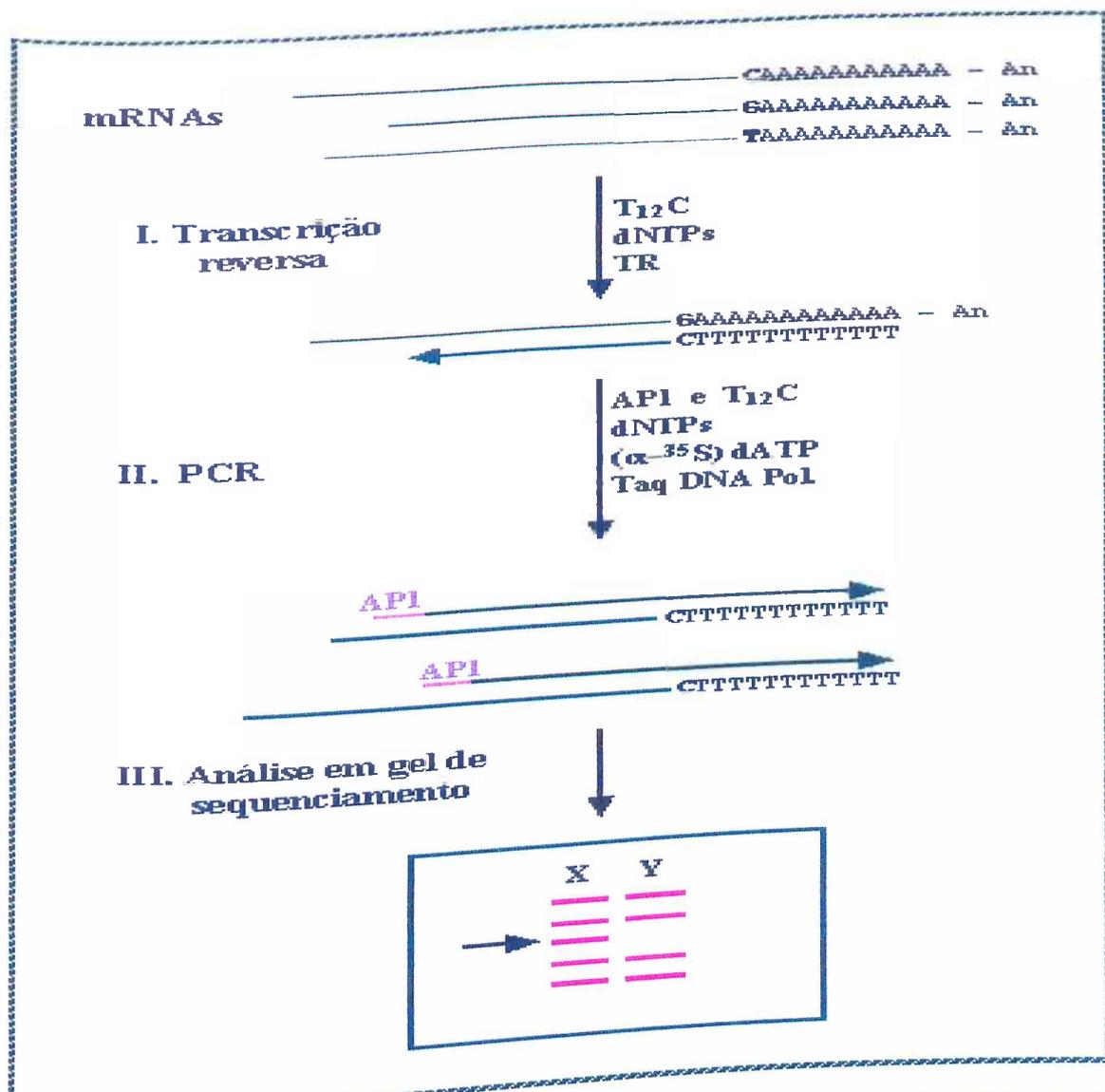


Figura 5: Esquema da técnica DDRT-PCR, segundo LIANG & PARDEE, 1992.

1.6- APLICAÇÕES DO DIFFERENTIAL DISPLAY REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION (DDRT-PCR)

Essa técnica tem sido amplamente utilizada por muitos grupos para isolar genes expressos diferencialmente em situações biológicas distintas (WARTHOE *et al* 1995).

Em humanos, tem sido utilizada para identificar e isolar mRNAs diferencialmente expressos em fígado hemocromático e normal (KEDAR *et al* 1996); em células cancerígenas do pâncreas (OHNAMI *et al*, 1999) entre outros.

Em mamíferos, tem sido aplicada em camundongos. AMSON *et al.* (1996) isolaram 10 cDNAs diferencialmente expressos no processo de apoptose induzido pelo gene supressor de tumor p53, em células de rato. SILVA *et al.* (1999) usaram a estratégia de diferencial display para identificar mRNAs expressos em vários tipos celulares de camundongo estimulados com citoquinas pró-inflamatória, produtos microbióticos e drogas anti-inflamatórias. WARSKULAT *et al.* (2001) estudaram a complexa alteração na expressão gênica em astrócitos de rato sob a influência de amônia e células hipo-osmótica, usando a tecnologia do DDRT-PCR e análise por Northern Blot.

Hemócitos de *Biomphalaria globata* exposto ou não ao *Schistosoma mansoni* foram investigados, por DDRT-PCR, para identificar genes envolvidos na imunobiologia de células hemocíticas (MILLER *et al*, 2001)

Hemócitos foram usado por CARGINALE e colaboradores (2002) para investigar genes transcritos em peixes de água gelada.

BENITO *et al.* (1996) analisaram a expressão gênica na interação fungo-planta. Os fungos apresentaram genes que são realçados durante a interação com a planta.

Em insetos, no entanto, é onde a técnica de DDRT-PCR tem sido mais amplamente utilizada, para a detecção de genes diferencialmente expressos.

Em *Apis mellifera* HEPERLE & HARTFELDER (2001) empregaram o DDRT-PCR para analisar a expressão de genes envolvidos na regulação de ecdisteroide durante a diferenciação de casta. KUCHARSKI & MALESZKA (2002) verificaram que o gene do inositol 1,4,5-trifosfato 3quinase se expressa diferencialmente em cérebro de abelhas emergentes e forrageadoras.

CORONA *et al.* (1999) identificaram, por meio de DDRT-PCR, dois genes codificantes de proteínas mitocondriais, subunidade 1 citocromo-oxidase e citocromo c, em *Apis mellifera*, os quais apresentaram expressão diferencial em rainha e operária.

Genes diferencialmente expressos nas castas em *Melipona quadrifasciata* foram investigados por JUDICE *et al.* (2002) empregando a DDRT-PCR. OLIVEIRA-JUNIOR (1999) e OLIVEIRA-JUNIOR *et al.* (2003) encontraram 6 genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera*, que foram relacionados a divisão de trabalho na colônia.

Desde a sua publicação, em 1992, vários trabalhos foram realizados utilizando a técnica de DDRT-PCR em sua forma original ou adaptada ao material biológico empregado, propostas de otimização da técnica (MOU *et al.* 1994; GUIMARÃES *et al.* 1995; DOSS, 1996; BONNET *et al.* 1998).

2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adis J (1990) Thirty million arthropod species – too many or too few? *Journal of Tropical Ecology* 6: 227-237.
- Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, Gall IL, Medhioub M, Cruz GL, Lethrosne F, Pasturaud P, Piouffre L, Prieur S, Susini L, Alvaro V, Millasseau P, Guidicelli C, Bui H, Massart C, Cazes L, Dufour F, Giovanelli HB, Owadi H, Hennion C, Charpak G, Dausset J, Calvo F, Oren M, Cohen D & Telerman A (1996) Isolation of differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the *Drosophila* seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3953-3957.
- Beetsma J (1979) The process of queen-worker differentiation in the honeybee. *Bee World* 60(1): 24-39
- Benito EP, Prins T. & Kan AL van. (1996) Application of differential display RT-PCR to analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Molecular Biology* 32: 947-957.
- Bezerra JMD (1994) Aspectos da reprodução de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, UFV.
- Bonetti AM & Kerr WE (1987) Sex determination in bees. XXIII Brood of a laying queen treated with Juvenile Hormone III. *Revista Brasileira de Genética* 10(3): 593-597.

- Bonetti AM (1982) Ação do Hormônio Juvenil sobre expressão gênica em *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado FMRP USP 151p.
- Bonetti AM (1983) Action of Juvenile hormone on gene expression in *Melipona* (hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética* 6(3): 583-585.
- Bonetti AM (1984) Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Biologia* 44(4): 509-516.
- Bonetti AM, Cruz-Alandim C & Kerr WE (1994) Sex determination in bees XXX. Effects of Juvenile Hormone on the development of tergal glands in *Melipona*. *Journal of Apicultural Research*. 33 (1): 11-14.
- Bonetti AM, Kerr WE & Matusita SH (1995) Effects of Juvenile Hormones I, II and III, in single and fractionated dosagem in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Biologia* 55: 113-120.
- Bonnet S, Prévot G & Bourgouin C (1998) Efficient reamplification of differential display products by transient ligation and thermal asymmetric PCR. *Nucleic Acids Research* 26(4): 1130-1131.
- Campos LAO (1979) Determinação do sexo nas abelhas. XIV. Papel do Hormônio Juvenil na diferenciação de castas na subfamília meliponinae (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Biologia* 39: 965-971

- Carginale V, Capasso C, Scudieros R & Parisi E (2002) Identification of cadmium-sensitive genes in the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* by messenger RNA differential display. *Gene* 299:117-124.
- Carvalho GA (2000) Contribuição à reprodução da *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e suas conseqüências. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP. 109p.
- Corona M, Estrada E & Zurita M (1999) Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honey bee *Apis mellifera*. *The Journal of Experimental Biology* 202:929-938.
- Costa RAC (1996) Morfologia e funcionamento das glândulas hipofaríngeas em operárias, machos e rainhas de *Scaptotrigona postica* Latreille, 1804 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) Tese de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, S.P. 88p.
- Davey KG (2000) The model of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 663-669.
- Dias J das D, Bonetti AM and Kerr WE (2001) Determinação do número de instares larvais em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae). *Naturalia* 26:257-263
- Doss RP (1996) Differential display without radiativity – A modified procedure. *Biotechniques* 21(3): 408-412.;

- Evans JD & Wheller DE (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera* Proc.Natl. Acad Sci 96:5575-5580
- Ferreira ME & Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética 3ª Ed Embrapa-Cenargem Brasília p37-38.
- Guimarães MJ, Lee F, Zlotnik A & Mcclanahan T (1995) Differential display by PCR: novel findings and applications. Nucleic Acids Research 23(10): 1832-1833.
- Hartfelder K (2000) Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33(2):157-177.
- Hepperle C & Hartfelder K. (2001) Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. Naturwissenschaften 88: 113-116.
- Judice CC, Oliveira, MA, Hartfelder K & Pereira GAG (2002) Identification of differentially expressed genes between queen and worker castes of *Melipona quadrifasciata*. Anais do V encontro sobre abelhas p253.
- Kedar V, Fletcher L. & Powell L (1996) Molecular cloning of a novel mRNA highly expressed in haemochromatotic human liver and proliferating cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 226:461-466.
- Kerr WE (1946) Formação das castas no gênero *Melipona* (Illiger, 1806) An. Esc Sup.Agric Luiz de Queiroz USP 3:300-312.

- Kerr WE (1948) Estudos sobre o gênero *Melipona* An. Esc Sup. Agric Luiz de Queiroz USP 5:181-276.
- Kerr WE (1950) Genetic determination of castes in the genus *Melipona* Genetics 35: 143-152.
- Kerr WE (1974) Sex determination in bees III. Caste determination and genetic control in *Melipona*. Insects Sociaux 21 (4): 357-368.
- Kerr WE & Nielsen RA (1966) Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. Genetics 54(3): 859-866.
- Kerr WE (1996) Biologia e Manejo da tábua: a abelha do Maranhão. Ed. Edufma, 156p.
- Kerr WE, Carvalho G A & Nascimento VA (1996) Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação. Ed. Fundação Acangaú, 36 p.
- Kucharski R & Maleszka R (2002). Molecular profiling of behavioural development: differential expression of mRNAs for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoforms in naive and experienced honeybees (*Apis mellifera*). Molecular Brain research 99:92-101
- Liang P & Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic Messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257:967-970

- Liang P, Bauer D, Averboukh L, Warthoe P, Rohrwild D, Muller H, Strauss M & Pardee AB (1995) Analysis of altered gene expression by differential display. *Methods in Enzymology* 254:305-321.
- Liu C & Ragothama KG (1996) Practical method for cloning cDNAs generated in mRNA differential display. *BioTechniques* 20(4):576-580
- Michener CD (1990) Classification of the Apidae (Hymenoptera) *Univ. Kan Sci Bull* 54: 75-164.
- Miller AN, Raghavan N, FitzGerald PC, Lewis FA & Knight M (2001) Differential gene expression in hemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. *International journal for parasitology* 31: 687-696.
- Mou L, Milte HLJ Wang E. & Chalifour L (1994) Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199(2): 564-569.
- Moure JM (1961) A preliminary supra-specific classification of the old World Meliponinae bees (hymenoptera, Apoidea). *Studia Entomol.*4(1-4):181-242.
- Mullis K & Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysis chain reaction. *Methods Enzymology* 55:335-350.
- Ohnami, S Matsumoto N, nakano M, Aoki k, Sugimura T, Terada M & Yoshida T (1999) Identification of gene showing differential expression in antisense K-ras-transduced pancreatic cancer cells with suppressed tumorigenicity. *Cancer Research* 59:5565-5571.

- Oliveira Junior WP (1999) Análise da expressão gênica diferencial na divisão de trabalho em *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) por DDRT-PCR. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia UFU, T 55p
- Oliveira Junior WP, Dias JDP, Goulart-Filho LR & Brandeburgo MAM (2003) Uso do differential Display não radioativo para estudo da expressão gênica I na divisão de trabalho em *Apis mellifera*. Bioscience Journal Uberlândia, v 19 n2.
- Parras JRP & Haddad ML. (1998) Determinação do número de instares de insetos. Piracicaba: FEALQ 49p.
- Purves WK, Orians GH & Heller HC (1995) Life. The Science of Biology 4 ed Massachusetts 1195p.
- Rezende SHMS (1997) Padrão de esterases durante o desenvolvimento pós embrionário de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia UFU, T 51p.
- Roig-Alsina A & Michener CD (1993) Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (hymenoptera Apoidea). The University of Kansas Science Bulletin 55(4): 123-162.
- Roseler PF, Roseler I & Strambi A. (1980) The activity of corpora allata in dominant and subordinated females of the wasp *Polistes gallicus*. Insectes Sociaux 27(2): 97-107

- Sakagami S (1982) Stingless bees. In Hermann HR Social Insect Academic Press Inc 4(3):361-423.
- Silva AC (2000) Identificação da miosina-V e anatomia interna dos sistemas reprodutor e nervoso de *Melipona scutellaris* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. 67p.
- Silva AM, Pires EG, Abrantes EF, Ferreira LRP, Gazzinelli RT & Reis LFL (1999) Application of differential display RT-PCR strategy for the identification of inflammation-related mouse genes. Braz. J. Med. Biol. Res. 32(7): 845- 852.
- Silva CGN (1999) Efeito do Hormônio Juvenil III na determinação de Casta em *Melipona scutellaris*. Monografia. Universidade Federal de Uberlândia 21p.
- Tannus-Neto J (2001) Morfologia comparada de operárias, machos e rainhas de abelhas urucu do nordeste, *Melipona scutellaris*, Latreille, 1811. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. 197p.
- Vedoy CG, Bengtson MH and Sogayar MC (1999) Hunting for differentially expressed genes. Braz. J. Med. Biol. Res. 32(7): 877 - 884.
- Warskulat U, Kreuels S, Müller HW and Häussinger D (2001) Identification of osmosensitive & ammonia -regulated genes in rat astrocytes by Northern blotting and differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Journal of hepatology 35:358-366.

Warthoe P, Bauer D, Rohde M & Strauss (1995) Detection and identification of expressed genes by differential display In: PCR Primer: A laboratorial manual. Dieffenbach CH, Dveskler GS. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

White TJ, Arnheim N & Erlich HA (1989) The polymerase chain reaction Technical Focus 5(6):185-188.

Yokoyama S. & Nei M (1979) Population dynamics of sex determining alleles in honey bees and sel-incompatibility alleles in plants. Genetics 91: 609-626.

Zucoloto FS (1973) Estudos de nutrição em *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera - Apidae.) Tese de doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto.

Capítulo 1

Detecção de Genes Diferencialmente
Expressos em *Melipona scutellaris*
(Hymenoptera, Apidae)

1- INTRODUÇÃO

As colônias de abelhas eussociais são formadas por duas castas – rainhas e operárias - e por machos, cada um deles com funções específicas. As rainhas são as fêmeas férteis, responsáveis pela postura e desenvolvimento populacional da colônia, as operárias são as fêmeas estéreis, que apresentam diferentes funções, de acordo com a idade e necessidades da colônia e que podem originar machos a partir de óvulos não fecundados. As castas nas abelhas podem ser definidas pela quantidade e/ou qualidade de alimento, pelo comportamento ou, ainda, por mecanismo genético-alimentar (BONETTI, 1982).

Em 1974, KERR propôs um modelo de regulação gênica para explicar a segregação de três operárias para uma rainha nos nascimentos em *Melipona*, no qual dois genes principais X^a e X^b , com dois alelos cada um, seriam os responsáveis por produtos feminizantes. Larvas heterozigotas para ambos os genes, suficientemente alimentadas, desenvolvem-se em rainhas e larvas mal alimentadas ou homozigotas para um ou ambos os genes se tornam operárias em consequência de baixa produção de Hormônio Juvenil e não expressão dos genes feminizantes

O Hormônio Juvenil (HJ) é um dos mais importantes hormônios de insetos, influenciando as principais funções do seu complexo sistema fisiológico (SILVA, 1999). Quando é aplicado em larvas de abelhas do gênero *Melipona*, promove o aparecimento de características de fêmeas completas (CAMPOS, 1979; BONETTI, 1983; 1984; BONETTI *et al*, 1995; SILVA, 1999; SILVA, 2000).

Nesse estudo, usamos a técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (DDRT-PCR) desenvolvida por LIANG e PARDEE (1992) para comparar, por meio do perfil de cDNA, a expressão gênica durante o desenvolvimento ontogenético pós-embrionário de *Melipona scutellaris*. Foram comparados, ainda, rainha adulta natural e induzida por Hormônio Juvenil III. A técnica DDRT-PCR consiste na transcrição reversa do

RNA em cDNA por meio de um *primer* oligo-dT seguido de amplificação por meio de *primers* aleatórios. Após separação dos fragmentos por eletroforese em gel, aqueles diferencialmente expressos são, clonados e seqüenciados.

1.1- Resumo

As colônias de abelhas eussociais são formadas por duas castas – rainhas e operárias - e pelos machos, cada um deles com funções específicas. KERR propôs um modelo de regulação gênica para explicar a segregação de três operárias para uma rainha segundo o qual dois genes principais X^a e X^b codificariam para produtos feminizantes. Nesse estudo usamos a técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (DDRT-PCR) para comparar, por meio do perfil de mRNA, a expressão gênica em *Melipona scutellaris*, durante o desenvolvimento ontogenético pós embrionário e em operária adulta e rainha adulta, natural e induzida por Hormônio Juvenil III. Fragmentos diferencialmente expressos foram detectados com as combinações dos *primers*: HT11G-AP05; HT11C-AP05; HT11G -OPF12; HT11G-OPA16. A combinação HT11G-AP05 revelou, em L1 e L2, um produto que clonado, seqüenciado e analisado por homologia em banco de dados mostrou identidade com um domínio protéico de tiorredoxina disulfeto redutase de *Clostridium sporogenes*, proteína importante nos processos de oxirredução na célula. Em L1 e L2, a combinação dos *primers* HT11G-OPA16, revelou um produto que mostrou identidade com o gene *sall1* de *Drosophila*, gene que codifica para uma proteína relacionada a repressão da transcrição próximo as regiões heterocromáticas. Caso se confirme a identidade com esse gene, seria possível inferir para *Melipona*, funções similares em função do alto grau de heterocromatina nessas abelhas.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Material Biológico

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade de Uberlândia-MG.

O material biológico utilizado foi abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* proveniente da Bahia e mantida no Meliponário Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil (S 18° 55' / W 48° 17'). Foram utilizadas larvas nos estágios de Larva1 (L1), Larva 2 (L2), Larva 3 (L3), Larva pré-defecante (LPD), Larva defecante (LD), Pupas de operária (PO) e de rainha (PR) e Adultos: operária recém nascida (O), rainhas virgens naturais (RV), e rainhas virgens induzidas por HJIII (RI).

As fases de larva foram identificadas segundo ROSSINI (1989) e DIAS *et al.* (2001) usando morfometria de cápsula cefálica. Larva Pré-defecante e Defecante de acordo com a morfometria permanecem no mesmo grupo de L3 diferenciando se por volume do corpo e presença ou ausência de alimento e dejetos na célula de cria (DIAS, c.p.)

2.2- Extração de RNA Total e Remoção do DNA cromossomal

A extração de RNA total, foi feita em pool de 5 indivíduos, pelo método do Trizol (GIBCO) segundo recomendações do fabricante (ANEXO I).

Para remoção do DNA cromossomal foi utilizada a enzima DNaseI (GIBCO) de acordo com o protocolo em ANEXO II, seguindo recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260nm e sua integridade foi verificada em gel de agarose 1,5% (Tampão TBE 0,5X; 90W).

2.3- Differential Display Reverse Transcriptase-PCR (DDRT-PCR)

A técnica foi desenvolvida segundo LIANG E PARDEE (1992) e adequada ao material biológico utilizado.

2.3.1- Transcrição reversa

Para a reação de transcrição reversa (ANEXO III) foram utilizados 200ng de RNA total, 8 pmoles de *primer* oligo-dT com uma base âncora (Tabela 1), 12 U de RNAsin (Amershan Biosciences), Tampão da Enzima 1 X, 10mM de DTT, 200µM de dNTPs, 200U de RT SUPERSCRIPT II (INVITROGEN) para um volume final de 20µl. O controle negativo foi feito sem a adição de transcriptase reversa para verificar a ocorrência de ampliações inespecíficas, oriundas de DNA contaminante.

<i>primer</i>	Seqüência 5' → 3'
HT11A	AAGCTTTTTTTTTTTTA
HT11C	AAGCTTTTTTTTTTTTC
HT11G	AAGCTTTTTTTTTTTTG

Tabela 1: Seqüência dos *primes* oligodT utilizados na transcrição reversa

2.3.2- DD-PCR

O cDNA foi obtido a partir do RNA total com a enzima SUPERSSCRIPT RT II (GIBCO) e um *primer* oligo-dT, por meio da transcrição reversa (ANEXO IV). O uso de *primer* oligo-dT permite selecionar apenas os mRNA, em função da cauda poli-A. Foram feitas triplicatas das reações de transcrição e um branco para cada amostra, que consistiu de reação com RNA sem a presença da SUPERSSCRIPT. Quando nessas amostras aparecerem bandas, significa que o RNA está contaminado com DNA. Foi feito, ainda, um branco geral que consistiu em uma reação onde se colocou todos os reagentes, com exceção do RNA. Com essa reação verifica-se se os reagentes estão contaminados.

Os cDNAs obtidos foram amplificados em Termociclador PCR Express-HYBAID e os *primers* arbitrários utilizados estão mostrados na Tabela 2

<i>primer</i>	Seqüência 5' → 3'
AP04	AAGCTTCTAACG
AP05	AAGCTTAGTAGGC
OPA18	AGGTGACCGT
OPA17	GACCGCTTGT
OPA16	AGCCAGCGAA
OPF12	ACGGTACCAG

Tabela 2: Seqüência dos *primers* aleatórios utilizados no DD-PCR.

A separação eletroforética dos produtos amplificados foi processada em gel de poliacrilamida 6% (19 Acrilamida: 1 Bis) não desnaturante, a 150 V por 13 h. A visualização das bandas foi feita por coloração com nitrato de prata de acordo com BLUM *et al.* (1987) com modificações de BASSAM *et al.* (1991) (ANEXO V).

As bandas diferencialmente expressas foram recortadas do gel de poliacrilamida e eluídas (ANEXO VI). Como critério para seleção de bandas para análise utilizou-se: a) presença ou ausência em uma das situações comparadas (estágio de desenvolvimento, casta e tratamento com HJ III); b) intensidade de expressão.

Os fragmentos purificados (14) foram reamplificados utilizando os mesmos *primers* utilizados em sua obtenção, nas mesmas condições da PCR. Os produtos desta reação foram avaliados em gel de agarose 1,5% (Tampão TBE 0,5X; 90W).

2.4. Clonagem

Essa etapa foi realizada no Centro de Terapia Celular/Laboratório de Clonagem do Hemocentro de Ribeirão Preto/ FMRP-USP.

Após confirmação da reamplificação em gel de agarose 1,5%, procedeu-se à clonagem utilizando o Kit Sure Clone™ Ligation (Amersham Biosciences) que tem como princípio a retirada de adeninas únicas, normalmente incorporadas aos produtos finais de PCR, nas extremidades 3'. Após extração fenol/clorofórmio e purificação em coluna de Sephacryl™ S-200 HR, os fragmentos foram ligados ao vetor plasmidial pUC18 Sma I/BAP (defosforilado) pela ação da T4 DNA ligase. Esse plasmídeo contém um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, permitindo a seleção de colônias transformadas.

2.4.1- Transformação

Foi usada a linhagem de bactérias *E.coli* DH10. A transformação foi processada por choque térmico a 42°C. As bactérias foram cultivadas em meio de cultura 2xYT (peptona triptona 1,6%, extrato de levedura 1% e NaCl 85mM) por 1 hora, a 37°C em shaker a 120rpm. As bactérias foram plaqueadas em meio

2xYT/Ágar (Ágar 1,5%) contendo ampicilina (100µg/ml). As placas foram tratadas com 80 µl de Xgal (30mg/ml) e 50µl de IPTG (16mg/ml) e foram incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias de bactérias foram selecionadas de acordo com a cor, branco e azul em função da atividade da β-galactosidase na presença de Xgal e IPTG. As colônias brancas (08) foram inoculadas em 150µl de meio 2xYT em placas com fundo U em presença de ampicilina (100µg/ml) por 12 horas a 37°C.

Processou-se a reação de PCR utilizando *primers* universais M13 *forward* (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') e *reverse* (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') que flanqueiam os sítios de clonagem no vetor, adjacentes ao inserto.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% (Tampão TBE 0,5X; 90W) corado com brometo de etídeo, sendo utilizados 2µl desses produtos para a reação de seqüenciamento.

2.5- Seqüenciamento (ANEXO VII)

O seqüenciamento foi processado em seqüenciador automático ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER (Applied Biosystems) diretamente a partir de 2µl de produtos de PCR com 3,2 pmol de *primer* M13 (*Forward* ou *Reverse*) e 2 µl de Big Dye, para um volume final de 5µl.

Anteriormente à aplicação no gel, as amostras foram purificadas por precipitação com etanol e acetato de potássio 3M, pH 5,2, para retirada de nucleotídeos e *primers* não incorporados.

Em seguida, cada amostra foi ressuspendida em 2 µl de *Loading Buffer* e imediatamente antes da aplicação no gel de seqüenciamento, foi desnaturada a 95°C por 2 min e mantida em gelo até a aplicação.

2.6- Análise das seqüências

O resultado do seqüenciamento foi submetido à análise em programa *Sequencher*™ 3.1, que permite visualizar a seqüência, editar e alinhar em *clusters* para busca da identidade com seqüências depositadas.

A seqüência foram analisadas utilizando os algoritmos BLASTn e BLAST x. No BLAST n foi feita uma busca contra banco de dados não redundante e ESTs e no BLAST x, apenas contra o banco de dados não redundante do NCBI/*Gene Bank*.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

DDRT é uma técnica relativamente simples, sensível e de rápido isolamento de cDNA. O tempo gasto e a quantidade de tecido necessário para o experimento são menores do que a demandada pela técnica de hibridação subtrativa (LIU & RAGHOTHAMA, 1996). Embora seja uma técnica simples, tem como problema, a alta proporção de bandas falso-positivas. É questionada a habilidade do DDRT-PCR para identificar mRNAs raros, sendo que nem todos os mRNA obtidos podem ser clonados (VEDOY *et al.*, 1999).

DILKS *et al* (2003), no entanto, consideram que o diferencial display (DD-PCR) combina a sensibilidade da PCR com o poder de resolução da eletroforese em gel de poliacrilamida e permite a identificação de novos transcritos de mRNAs que são diferencialmente expressos em células e tecidos sob várias condições experimentais .

As modificações adotadas no presente trabalho foram: uso de gel não desnaturante, aumento em 1U na quantidade de *Taq* polimerase (de 1U para 2U), 800µl de Trizol/mg em lugar de 1ml/mg e 12 U de RNAsin em lugar de 10U que vinha sendo usado nos protocolos do Laboratório, o que produziu resultados satisfatórios para a análise em questão.

Para o estudo comparativo do perfil de mRNA durante o desenvolvimento ontogenético pós embrionário, o RNA foi extraído pelo método TRIZOL e tratado com DNase I para remoção de DNA genômico, que poderia contaminar a reação produzindo falsas bandas, levando à interpretação inadequada dos dados. Sabe-se que a DNase I é uma endonuclease que hidrolisa, preferencialmente, cadeias simples ou duplas de DNA nos sítios adjacentes aos nucleotídeos pirimidínicos (SAMBROOK *et al*, 1989). Após o tratamento, a integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1,5%. Os RNAs mostraram-se adequados para a transcrição reversa (Figura 1).

Um display de mRNAs de *Melipona scutellaris* obtido em gel de seqüenciamento está mostrado na Figura 2. Nessa figura observa-se um produto que se mostrou diferença de intensidade de expressão durante o desenvolvimento, de L1 a LD.

Os perfis diferencialmente expressos foram eluídos e reamplificados apresentando o padrão mostrado na Figura 3. As bandas apresentaram entre 100 e 300 pares de bases (bp).

Os fragmentos de tamanho mais adequado ao seqüenciamento (acima de 200bp) foram clonados e seqüenciados e correspondem aos de números 2, 3, 4, 12, 13 da Figura 4. Os números 7 e 14, até o momento não foram seqüenciados. Após a clonagem a reação de PCR dos clones para confirmar a presença do inserto apresentou o padrão mostrado na Figura 5.

A combinação dos *primers* HT11G-OPF12 revelou 2 fragmentos que só mostraram expressão em larva pré defecante (LPD) (Figura 4).

A combinação dos *primers* HT11G-OPA16 revelou diferença de intensidade na expressão de um fragmento que ocorre em L1, L2, L3, LPD e LD, com menor intensidade no dois primeiros estágios, conforme mostra Figura 2.

Em *Melipona*, as fases L3 e LPD representam momentos críticos no desenvolvimento, quando a larva fêmea pode seguir um de dois caminhos, diferenciação em rainha ou em operária. Esse resultado de expressão diferencial nos estágios de L1 até LD pode estar relacionado a necessidades fisiológicas inerentes à diferenciação de casta.

O seqüenciamento desses fragmentos, poderia permitir a identificação dos produtos por comparação com seqüências já descritas, no entanto, os mesmos não foram seqüenciados devido ao tamanho reduzido.

Os estágios de L1 e L2, apresentaram, separadamente, um produto que ocorreu apenas em cada um deles (Figura 2).

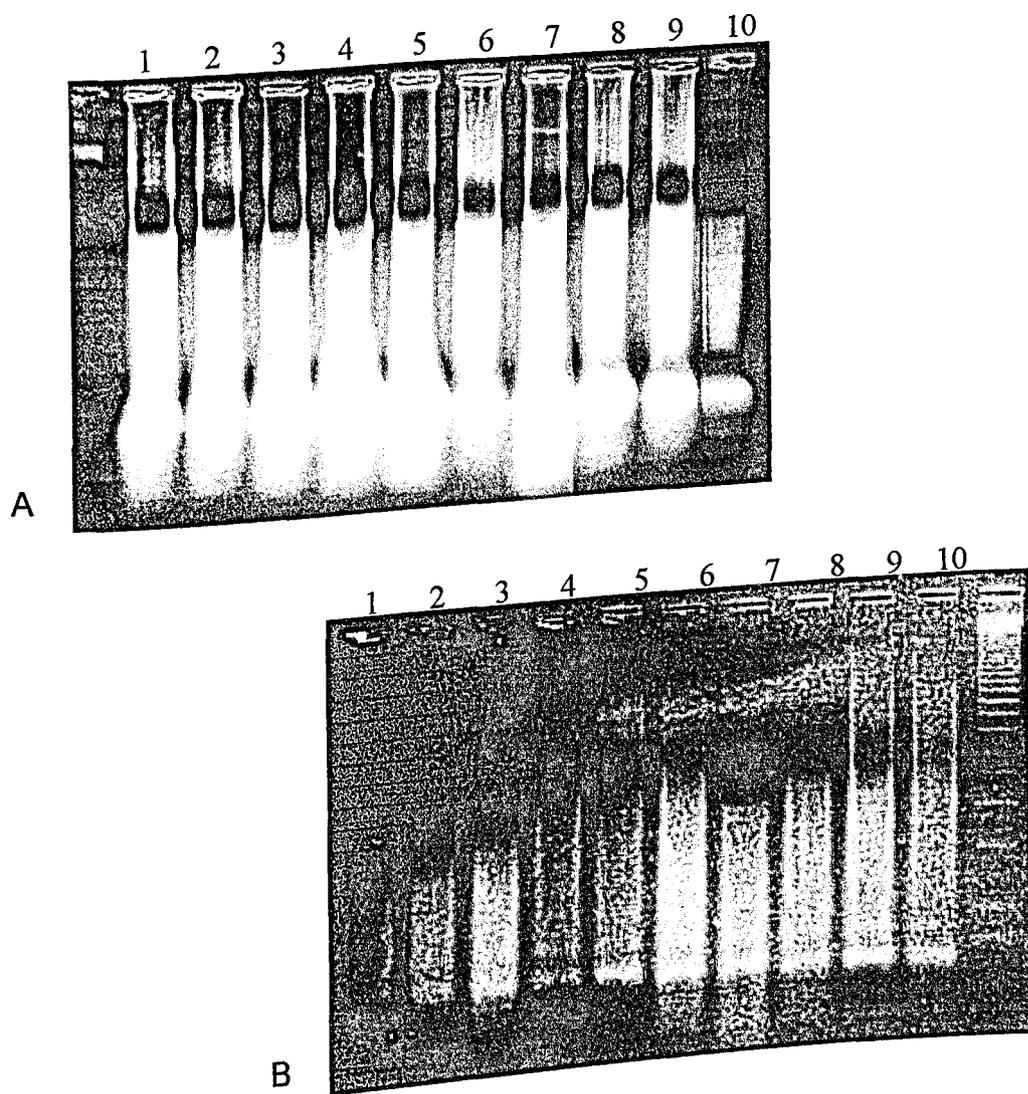


Figura 1: Padrão de RNA de *Melipona scutellaris* obtido pelo método Trizol, em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, (A) RNA total (B) RNA total após remoção do DNA contaminante pela digestão com DNase I.

- | | |
|----------|----------|
| 1 - L1, | 6 - PO, |
| 2 - L2, | 7 - PR, |
| 3 - L3, | 8 - O, |
| 4 - LPD, | 9 - RV, |
| 5 - LD, | 10 - RI. |

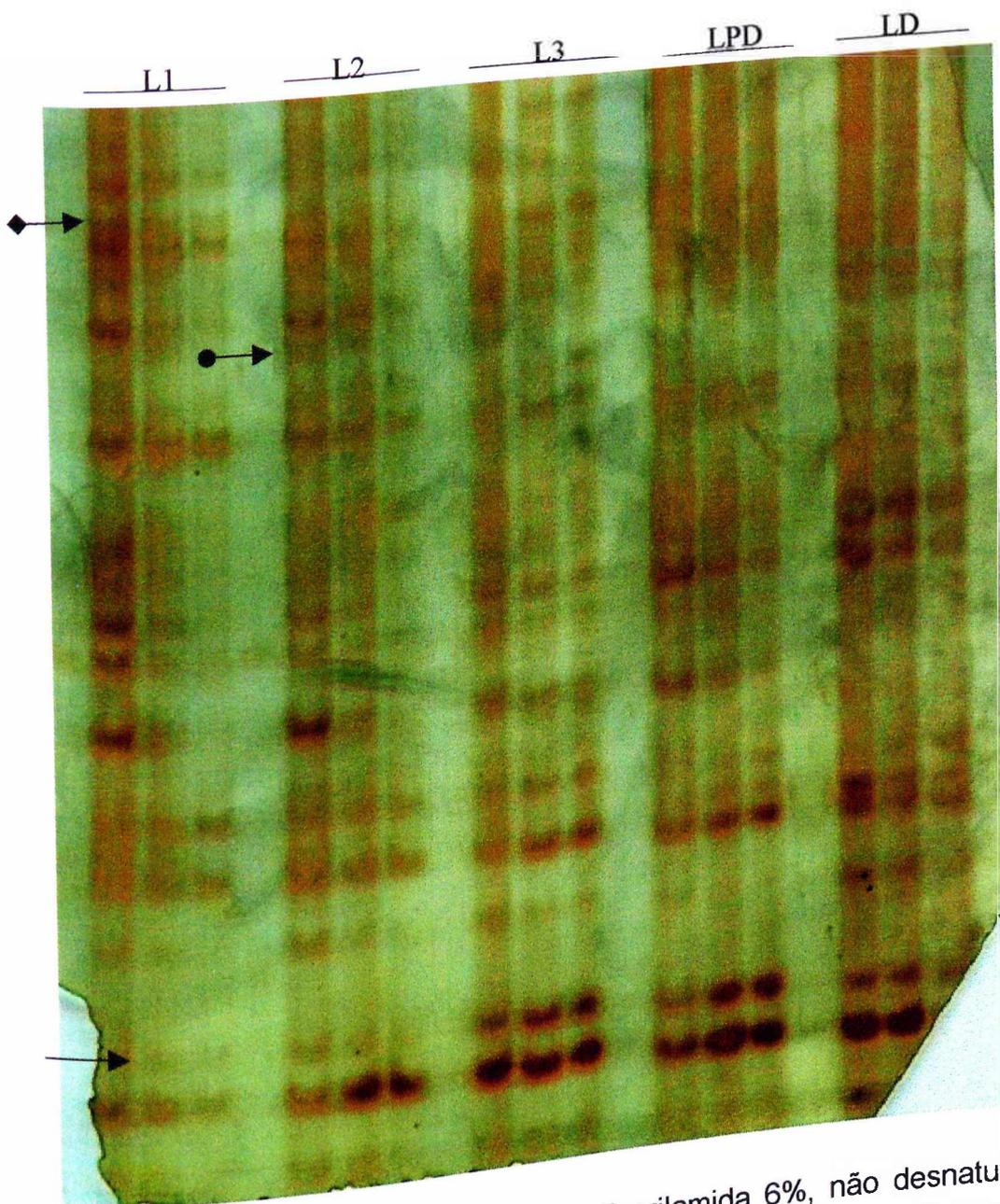


Figura 2: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, utilizando os *primers* HT11G-OPA16. A seta → Indica a diferença de intensidade na expressão de fragmento com expressão diferencial que ocorre em L1, L2, L3, LPD e LD. A seta ◈→ indica um fragmento específico de L1 ◈→ e L2.

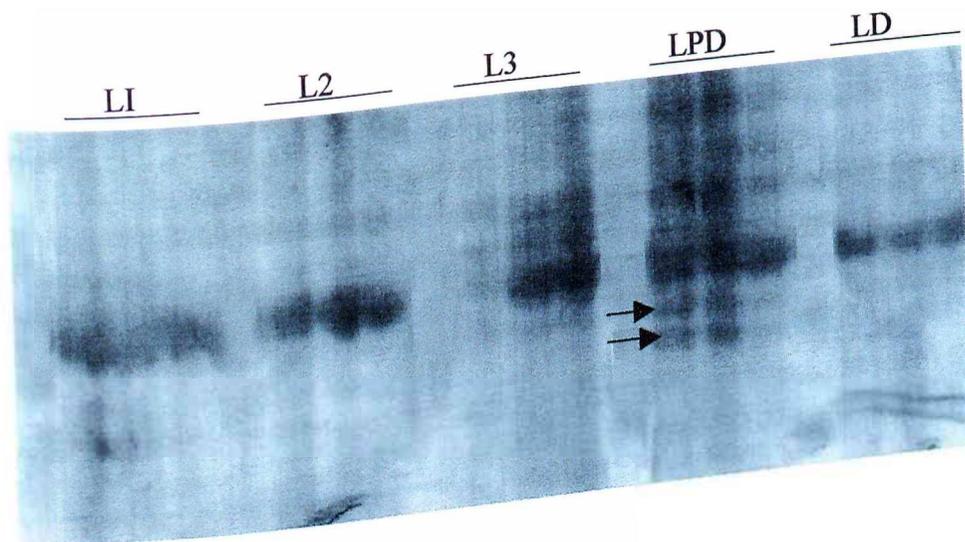


Figura 3: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, utilizando os *primers* HT11G-OPf12. A seta → Indica os fragmentos expressos apenas em larva pré-defecante.

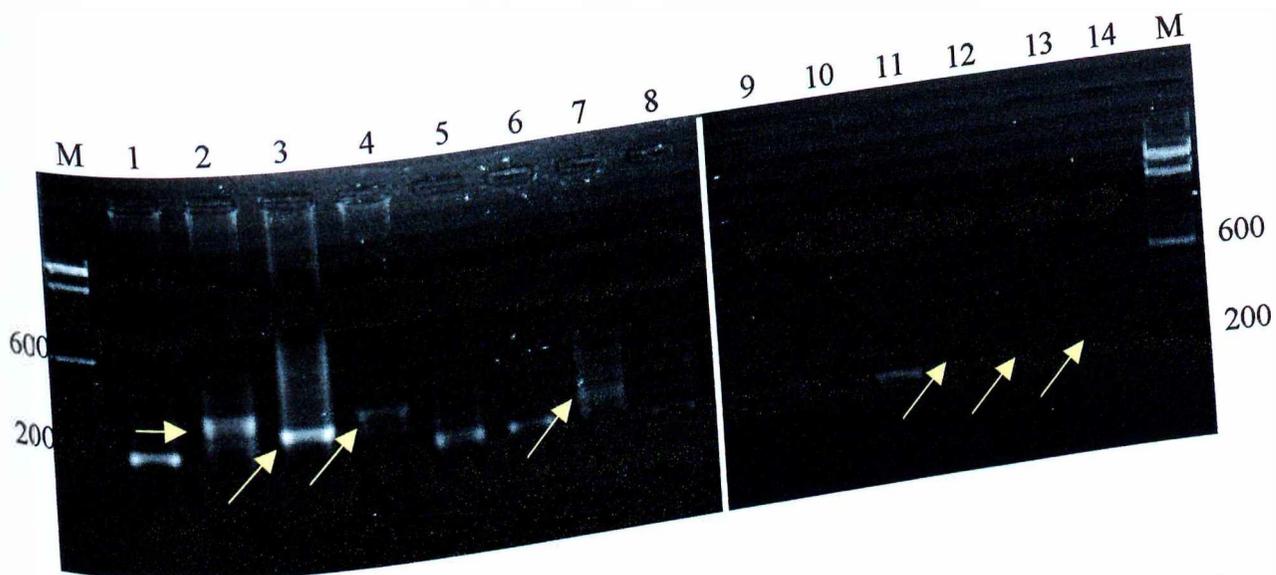


Figura 4: Padrão de cDNAs diferencialmente expressos durante o desenvolvimento ontogenético de *Melipona scutellaris* com diferentes combinações de *primers*, após eluição e reamplificação. Observou-se expressão diferencial nos estágios e combinações de *primers*:

- 1-L1 a L3 com HT11G-AP05
- 2-L1 e L2 com HT11G -AP05
- 3-O, RV e RI com HT11G -AP05
- 4-L1 e L2 com HT11C-AP05.
- 5 e 6 LPD com HT11G -OPF12
- 7- LD com HT11G -OPF12
- 8- PR e RI com HT11G -OPF12
- 9 e 10 - L1, L2, L3, LPD, LD com HT11G -OPA16
- 11- L1, L2, L3 com HT11G -OPA16
- 12- L1, L2 com HT11G -OPA16
- 13- L2, com HT11G -OPA16
- 14- L1 com HT11G -OPA16

M- marcador molecular de 100pb.
 A seta → indica os fragmentos selecionados para clonagem e seqüenciamento



Figura 5: Produtos de PCR dos clones em gel de agarose 1%. O tamanho de cada fragmento corresponde ao inserto de interesse mais um pedaço de seqüência do vetor adjacente ao inserto.

- M- Marcador Molecular
- 2- Fragmento obtido de L1 e L2 utilizando os primers HT11G -AP05
- 3- Fragmento obtido de O, RV e RI utilizando os primers HT11G -AP05
- 4- Fragmento obtido de L1 e L2 utilizando os primers HT11C-AP05
- 12- Fragmento obtido de L1, L2 utilizando os primers HT11G -OPA16
- 13- Fragmento obtido de L2 utilizando os primers HT11G -OPA16

O fragmento diferencialmente expresso em L2, representado na Figura 2, foi seqüenciado e apresentou 159 bases (Figura 6) e a análise em BLASTn e BLASTx mostrou informações não confiáveis.

A combinação HT11G-OPF12 revelou um fragmento cuja expressão foi detectada somente em pupa de rainha natural e rainha adulta induzida por HJIII, conforme mostra a Figura 7. Esse amplicon não pode ser considerado de rainha porque não se expressou em rainha virgem. Supomos, no entanto, que pode ser resultado de um gene susceptível ao tratamento com HJIII ou de resposta ao estresse ambiental, devido à manipulação das larvas durante o tratamento. Esse fragmento não foi seqüenciado, por apresentar tamanho reduzido.

Um produto que vale destacar, embora não tenha se mostrado adequado ao seqüenciamento (190 bp) é um fragmento revelado pela combinação dos *primers* HT11G-AP05, nos estágios de larva, L1, L2 e L3 (Figura 8). Esse fragmento se expressou nos três estágios larvais, o que o torna candidato a um gene larva-específico.

A combinação HT11G-AP05 apresentou um produto específico de operária, rainha virgem e rainha induzida. Esse produto foi clonado e seqüenciado e a comparação em BLAST apresentou similaridade fraca (Figura 9) com seqüências depositadas nos bancos de dados.

```
TGGGAAACGGGCCNGTNGGTATTTCCAAAATGTTNGAAA  
AATGGGCAGCGGCAGTTTCACACATCCGCCTCATTCAAACCG  
CGGTTTATTTCTTTNGGTTTTTCGCTGGCTAGCCAGCGAACTGT  
AGACTTTAATCCGAAATCATCCAACCAGACAA
```

Figura 6: Seqüência do fragmento específico de L2 de *Melipona scutellaris* pela combinação dos *primers* HT11G-OPA16.

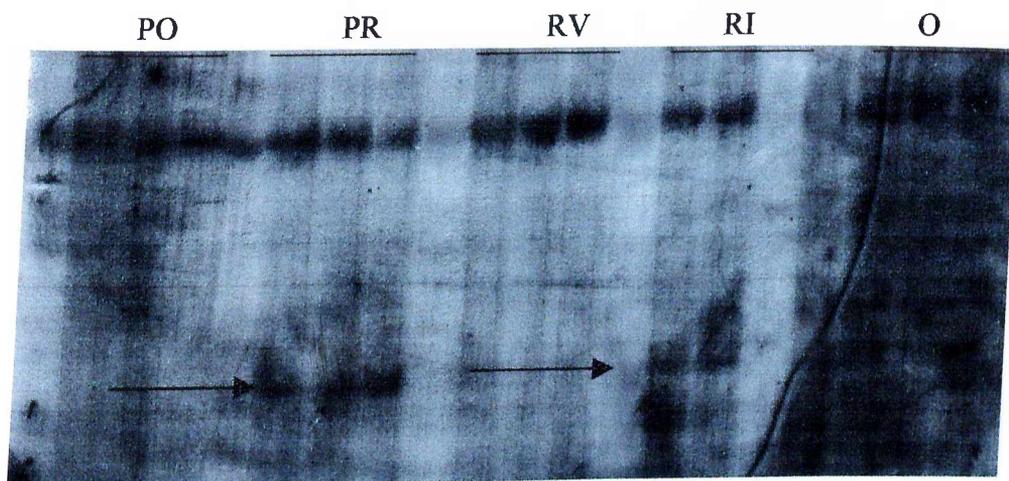


Figura 7: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, utilizando os *primers* HT11G-OPF12. A seta indica o fragmento expresso em pupa de rainha natural e rainha adulta induzida por HJIII.

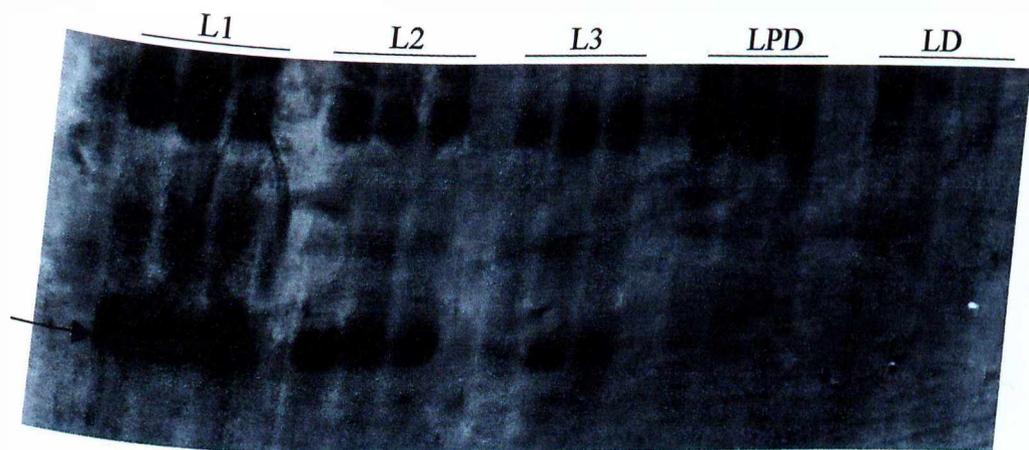


Figura 8: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, obtidos com os *primers* HT11G-AP05. A seta indica o fragmento em L1, L2 e L3.

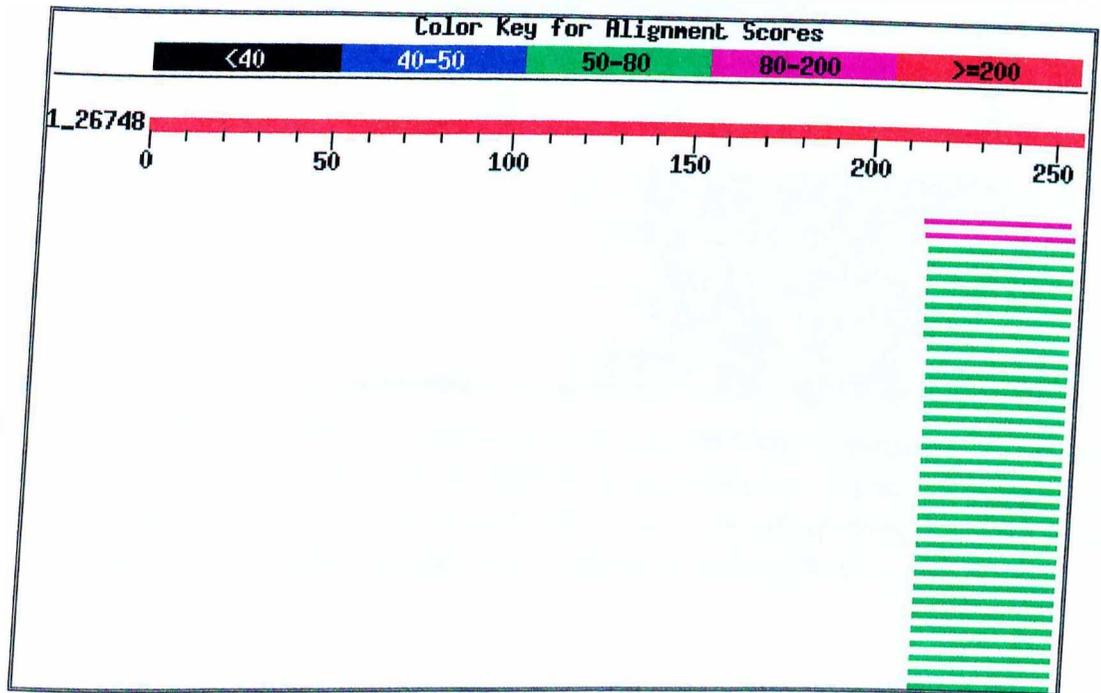


Figura 9: Distribuição das seqüências com identidade uma seqüência específica de adultos (RV, RI e O) de *M. scutellaris*, por meio de BLAST n.

A combinação HT11G-AP05 revelou, em L1 e L2, um produto cuja seqüência (Figura 10) analisada por comparação em banco de dados (Figura 10) mostrou identidade com um domínio protéico de tiorredoxina dissulfeto redutase de *Clostridium sporogenes*.

```

AGGAAGCTTACAATTTTCATCGGTAATTTTTATTTGTCCACCTAG
AGCATTCTATCTAATACTAATGTATTAAGCTTTGCTCTGCCAG
CGTATATAGCAGCACTAAGTCCAGAAGGTCCAGAGCCAATTAT
AATTAATCGTAGATACTATCCGCCATAAATGAACCTCCTATAA
TTTGCCTACTAAGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT
GCAAGCTTGG
  
```

Figura 10: Seqüência do fragmento específico de L1 e L2 de *Melipona scutellaris* pela combinação dos primers HT11G-AP05

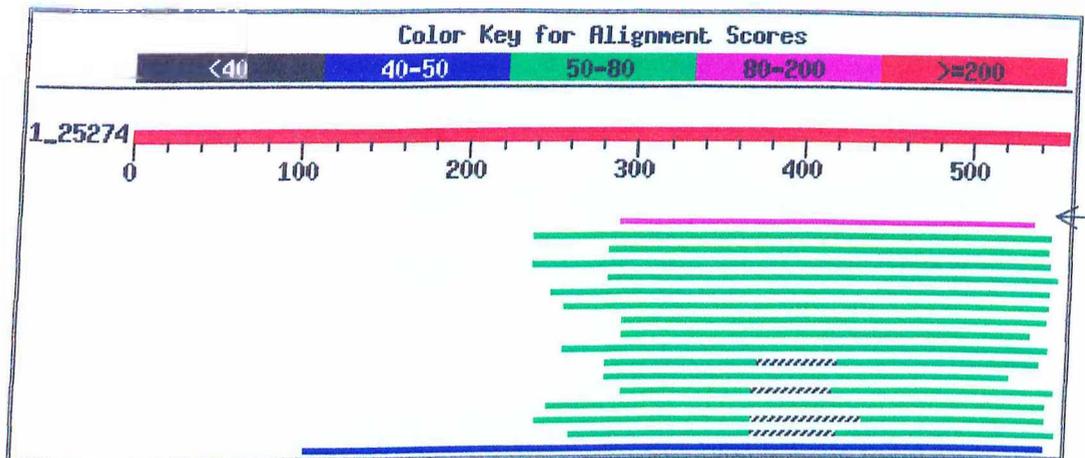


Figura 11: Distribuição das seqüências com identidade à seqüência analisada apresentada, por meio de BLAST x, A seta indica a região do alinhamento entre a seqüência referente às fases L1 e L2 de *M. scutellaris* com domínio protéico de tiorredoxina dissulfeto reductase de *Clostridium sporogenes*

A tiorredoxina redutase (TrxR) é uma flavoproteína que catalisa a redução de tiorredoxina dependente de NADPH e que tem função na manutenção de um ambiente celular redutor (WILLIAMS JR *et al*, 2000).

A TrxR faz parte de um sistema que protege a célula contra espécies de oxigênio reativo, subprodutos citotóxicos, que podem danificar a célula. Em *Drosophila*, a TrxR age como antioxidante intracelular e mutantes para essa enzima têm capacidade reduzida de proteger adequadamente as células de danos citotóxicos, resultando em morte da larva. Mutantes para redução dessa enzima apresentam dificuldade de eclosão e tem o tempo de vida diminuído (MISSIRLIS *et al* 2001)

Em bovino, já foi demonstrado que a tiorredoxina otimiza o desenvolvimento de embrião, *in vitro*, mostrando seu efeito em momentos específicos (BING *et al* 2003).

Em *Melipona scutellaris* uma enzima, que tenha similaridade com essa, pode ser importante no início do desenvolvimento embrionário, quando há intensa

atividade fisiológica e contínuo fluxo de alimento, o qual é oferecido de uma só vez (alimentação massal) para a larva recém eclodida.

Em L1 e L2, a combinação dos *primers* HT11G-OPA16 revelou um produto de 101 bases (Figura 12) que analisado em BLAST mostrou identidade com a proteína SALL1 de *Drosophila* (Figura 13).

```
GCCAGCGAATTTGAAGAAGCGCCTTCTCAGTAATAGTTTT  
AAACATAGAGTTTACAATNGGCACTTTTtaggggactaagg  
GGTGGGATTTGNGCCTGGT
```

Figura 12: Seqüência do fragmento específico de L1 e L2 de *Melipona scutellaris* obtido pela combinação dos *primers* HT11G-OPA16

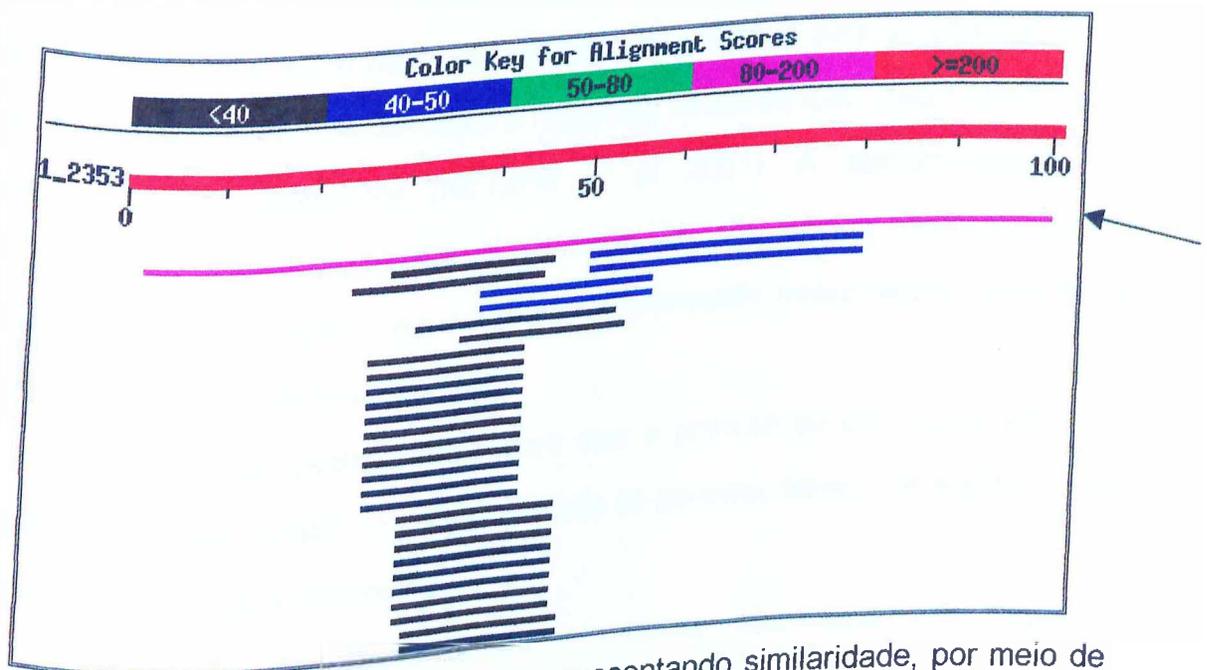


Figura 13: Distribuição das seqüências apresentando similaridade, por meio de BLAST n com as seqüências referentes às L1 e L2 de *M. scutellaris* a um clone de DNA humano similar a proteína SALL1 de *Drosophila*.

Em *Drosophila* esse gene codifica para um domínio protéico com estrutura característico de zinc finger (KÖHLHASE *et al*, 1999) e é requerido para definição de estruturas antero-posteriores durante a embriogênese (JUNGENS, 1988 *apud* BUCK *et al*, 2001). Em humanos, o gene *sall1* está localizado em 16q 12.1 e sua mutação provoca a síndrome de Townes-Brocks e em camundongos, um homólogo de *sall1* tem expressão durante o início da embriogênese e, de certo modo, afeta as mesmas estruturas detectadas em humanos (BUCK *et al*, 2001).

Em camundongos, *sall1* localiza-se em regiões heterocromáticas (NETZER *et al* 2001). O fato de, em camundongos esse gene estar localizado em regiões heterocromáticas nos faz sugerir, para *Melipona scutellaris*, assim como para outras espécies de *Melipona*, um papel fundamental para um gene com identidade com o gene *sall1*.

Em várias espécies de *Melipona*, a heterocromatina ocupa praticamente toda a extensão de todos os cromossomos (ROCHA & POMPOLO, 1998; ROCHA *et al*, 2002). Para essas espécies, um gene que codifica para um produto similar ao SALL1, torna-se forte candidato a repressor de transcrição, assim como ocorre em células de mamíferos (NETZER *et al*, 2001). A descondensação da heterocromatina em cromossomos de *Melipona*, por técnica desenvolvida em nosso laboratório (Vieira c.p.) e análise de expressão nessa região, contribuirá para confirmar ou não essa hipótese.

Extrapolando, poderíamos sugerir que o produto de um gene similar a esse, estaria relacionado com a estabilidade do genoma, talvez, via supressão de transposons ou outro mecanismo.

Seqüências em *Melipona*, sem qualquer identidade com aquelas depositadas em banco de dados foram obtidas nesse estudo e, também, em anteriores (MACHADO, 2001) e pode ser que representem genes, ainda não descritos. Outras pesquisas e buscas responderão isso.

A diferenciação que ocorre em um animal é dirigida pelo “ligar” e “desligar” de genes e, dependendo dos genes que estão ativos em uma célula, é gerada a diferença entre um tipo celular e outro. Os programas de desenvolvimento dependem de cascatas de sinais e de respostas que se mantem altamente conservadas no reino animal. Um ponto importante da pesquisa biológica é desvendar esses programas (STRACHAN & READ, 2002).

4-CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- ✓ A técnica DDRT-PCR foi eficiente para a detecção de diferentes transcritos durante o desenvolvimento e em adultos de *Melipona scutellaris*.
- ✓ A combinação dos *primers* HT11G-AP05 permitiu verificar identidade de uma seqüência de *M. scutellaris* com um domínio protéico de tiorredoxina dissulfeto redutase de *Clostridium sporogenes*.
- ✓ A combinação dos *primers* HT11G-OPA16 mostrou identidade de uma seqüência de *M. scutellaris* com o gene *sall1* de *Drosophila*.
- ✓ As seqüências obtidas com os *primers* para as quais não houve alinhamento com seqüências depositadas em banco de dados, podem ser seqüências novas e, talvez, específicas de *Melipona*.
- ✓ Há boas chances de que os fragmentos obtidos nesse trabalho e que mostraram similaridade, sejam relevantes para o desenvolvimento pós-embrionário, assim como a expressão de genes próximos a regiões de elevada condensação cromatínica de *Melipona*.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bassan BJ, Caetano-Anoles G and Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytic Biochemical* 196: 80-83.
- Bing YZ, Hirao Y, Takenouchi N, Che LM, Nakamura H, Yodoi J & Nagai T (2003) Effects of thioredoxin on the preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 59(3-4):863-873
- Blum H, Beir H and Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gel. *Electrophoresis*: 93-99.
- Bonetti AM (1983) Action of Juvenile hormone on gene expression in *Melipona* (hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética* 6(3): 583-585.
- Bonetti AM (1984) Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Biologia* 44(4): 509-516.
- Bonetti AM, Kerr WE and Matusita SH (1995) Effects of Juvenile Hormones I, II and III, in single and fractionated dosagem in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Biologia* 55: 113-120.
- Buck A, kispert A and Kohlhase J (2001) Embryonic expression of the murine homologue of SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome. *Mechanisms of Development* 104:143-146.

Campos LAO (1979) Determinação do sexo nas abelhas. XIV. Papel do Hormônio Juvenil na diferenciação de castas na subfamília meliponinae (Hymenoptera, Apidae). Revista Brasileira de Biologia 39: 965-971

Dias J das D, Bonetti AM and Kerr WE (2001) Determinação do número de instares larvais em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae). Naturalia 26:257-263

Gene Bank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Jurgens G (1988) Head and tail development of the *Drosophila* embryo involves *spalt*, a novel homeotic gene. EMBO J 7:189-196.

Kerr WE (1974) Sex determination in bees III. Caste determination and genetic control in *Melipona*. Insects Sociaux 21 (4): 357-368.

Kohlhase J, Kohler A, Jackle H, Engel W & Stick R (1999) Molecular cloning of a SALL1-related pseudogene and mapping to chromosome Xp11.2. Cytogenet. Cell Genet 84(1-2):31-34.

Liang P and Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic Messenger RNA by means of the polymerase chain reaction science 257:967-970

Liu C & Raghothama KG (1996) Practical method for cloning cDNAs generated in mRNA differential display. BioTechniques 20(4):576-580

- Machado MAMS (2001) Expressão gênica diferencial em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera Apidae). Dissertação de Mestrado. Universidade federal de Uberlândia 51p
- Missirlis F, Phillips JP & Jackle H (2001) Cooperative action of antioxidant defense systems in *Drosophila*. *Curr Bio* 11(16):1272-1277
- Netzer C, Bohlander SK, Rieger L, Müller S and Kohlhase J (2002) Interaction of the developmental regulator SALL1 with UBE2I and SUMO-1. *Biochem and Biophys Research Communications* 296:870-876
- Rocha MP & Pompolo SG (1998) karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology* 21(1):4145.
- Rocha MP, Pompolo SG, Dergam JA, Fernandes A & Campos LAO(2002) DNA characterization and karyotype evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera Meliponini). *Hereditas* 136:19-27.
- Rossini SA (1989) Caracterização das mudas ontogenéticas e biometria dos *corpora allata* de *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de mestrado. UNESP_Rio Claro 120p
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 5.83 p.

- Silva AC (2000) Identificação da miosina-V e anatomia interna dos sistemas reprodutor e nervoso de *Melipona scutellaris* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. 67p.
- Silva CGN (1999) Efeito do Hormônio Juvenil III na determinação de Casta em *Melipona scutellaris*. Monografia. Universidade Federal de Uberlândia 21p.
- Strachan T & Read AP (2002) Genética Molecular Humana [trad. [Enrique Bunselmeyer Ferreira *et al*] Porto Alegre-RS, Artmed Editora 576p.
- Vedoy CG, Bengtson MH and Sogayar MC (1999) Hunting for differentially expressed genes. Braz. J. Med. Biol. Res. 32(7): 877 - 884.
- Williams Jr CH (2000) Thioredoxin-thioredoxin reductase – a system that has come of age. Eur. J. Biochem 267:6101.

ANEXOS

PROCOLOS

ANEXO I

EXTRAÇÃO DE RNA (TRIZOL)

1. Macerar o tecido em 800 μ l de trizol/50 a 100 mg de tecido, vortex, 30° c/5min
2. Adicionar 0,2 ml de clorofórmio/ml de Trizol, vortex/15seg, 30°C/2min
3. Centrifugar 12000g/15min a 4 ° C
4. Transferir a fase aquosa para eppendorf. Adicionar 0,5 ml de isopropanol/ml de Trizol. Misturar, incubar em temperatura ambiente)
5. Centrifugar 12000g/10min a 4° C
6. Lavar o pellet com etanol 75% (1 ml de etanol 75%/ ml de Trizol), centrifugando a 7500g/5 min a 4 ° C
7. Secar o pellet ao ar
8. Ressuspender em H₂O/DEPC

ANEXO II - Remoção Do DNA Cromossomal

DIGESTÃO COM DNase I (RNase Free)

RNA	~10µg-----	µl
Tp10x	p/1x -----	4µl
RNAsin	12U-----	µl
DNase I	1U-----	µl
Volume Final	-----	20µl

Incubar 20 min a Temp. ambiente

Adicionar 1 µl de EDTA 25 mM

Incubar 65° C/ 10 min. colocar no gelo

Fazer extração fenólica:

Extração Fenólica

Adicionar H₂O/ DEPC para 200µl----- µl

Adicionar 200µl de clorofane (fenol/cloroformio/alcool isoamílico-25:24:1)
vortex /1 min, misturar (manualmente)/5 min. centrifugar 14000rpm/5min.

Trasferir a fase aquosa para outro eppendorf contendo 200µl de cloroformio/alcool isoamílico (24:1 - clorofil) vortex /1 min, misturar (manualmente)/5 min. centrifugar 14000rpm/5min.

Transferir a fase aquosa para outro eppendorf, Adicionar o,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) 20µl, misturar, adicionar 400µl de etanol 100% gelado, misturar. Incubar a -20° C/2 horas ou overnight.

Centrifugar 14000 rpm / 30 min a 4° C

Remover o sobrenadante. Adicionar o mesmo volume anterior de etanol 70% gelado (600µl). centrifugar 14000rpm/15 min a 4° C

Remover o sobrenadante

Secar ao ar e ressuspender em 20 µl de H₂O/DEPC

Dosarem ABSe e ver a integridade.

ANEXO III - TRANSCRIÇÃO REVERSA DO mRNA

1. Preparar eppendorfs: etiquetar

1 branco com HT11 sem RNA e RT

branco com HT11 e RNA sem RT (um para cada amostra diferente)

HT11, RNA e RT (fazer triplicata para cada amostra)

2. Preparar as amostra de RNA

150 a 200 ng deRNA total	--µl
HT11	8pmol
Tampão da RT11 5X	1X
DTT	10mM
DNTPs	200µMl
RNAsin	12U
H ₂ O/DEPC	--µl

Misturar e dar um spin

3. Adicionar 1µl do RT (superscript RTII) mas NÃO colocar nos brancos sem RT nestes colocar 1µl de H₂O

4. Incubar a 42°C/50min em seguida por 75°C/15min. Colocar no gelo ou estocar a -20°C

ANEXO IV - REAÇÕES DE DD – PCR

✓ Etiqueta os eppendorff

✓ Preparar o mix

H ₂ O	X μ l
Tampão 10X	1X
MgCl ₂	1 μ l
dNTPs	200 μ M
HT11(o mesmo que foi usado no RT)	8pmol
Taq Dna pol	2U
Primer arbitrario	8pmol

Misturar e dar um spin –manter no gelo

Acrescentar o cDNA (2 μ l)

Colocar uma gota de óleo mineral e levar ao PCR com a programação:

4°C/hold 40 ciclos de 94°C/25Seg -40 °C/2min – 72°C/1min, seguidos de 72°C/5min e 4°C/hold.

Retirar do PCR e guardar no maximo por 15dias

ANEXO V – Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata

- Colocar o gel de acrilamida em solução de ácido acético 10% por no mínimo 10 minutos
- Lavar o gel com água destilada por 2 vezes
- Imergir o gel em solução 0,012M de nitrato de prata e 0,056% de formalina (150µl de formaldeído em 100ml de água) por 20 minutos(no escuro)
- Lavar o gel 2 vezes por 30 segundos com água destilada
- Revelar com solução gelada de 0,28M de carbonato de sódio anidro, 0,056% de formalina e 4µM de tiosulfato , até a imagem das bandas aparecer, adicionar o formaldeído e o tiosulfato imediatamente antes da imersão.
- Parar a reação com ácido acético 10%

ANEXO VI – Eluição do cDNA a partir de gel de poliacrilamida

- Recortar a banda a ser eluida
- Colocar a banda em eppendorf, macerar a banda
- Colocar 100 μ l de H₂O,
- Ferver a banda a 100 $^{\circ}$.C por 15 minutos
- centrifugar a 14000rpm por 3 minutos,coletar o sobrenadante.
- Adicionar 2 μ l de acetato de amônio 8M para cada 8 μ l do produto
adicionar 30 μ l de etanol absoluto- overnight
- Centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos, retirar o sobrenadante
- Lavar o pellet com etanol 70% gelado (200 μ l)
- Centrifugar a 13000 por 10 minutos
- Remover o sobrenadante
- Secar o pellet

Usar 2 μ l na reação de PCR

ANEXO VII - Sequenciamento

Reação de sequenciamento:

2 μ l produto de PCR

1 μ l primer 3,2 pmol/ μ l (M13-*forward* ou *reverse*)

2 μ l Byg Dye

5 μ l/amostra

condições de PCR

96°C – 2"

96°C-10"

50°C- 5"

60°C-4'

25X

Purificação

1. Adicionar 30 μ l de H₂O
2. 5 μ l NaOAc (ou KOAc) 3M pH 5,2
3. 100 μ l de etanol absoluto
4. homogeneizar a placa por inversão
5. incubar 15min, à temperatura ambiente
6. centrifugar por 20min a 2600rpm a 4°C
7. descartar o sobrenadante sobre papel absorvente
8. adicionar 200 μ l de etanol 70%
9. centrifugar por 6min a 2600rpm a 4°C
10. descartar o sobrenadante sobre papel absorvente
11. repetir o passo 8 e 9
12. inverte a placa e dar um spin
13. deixar secar em estufa a 37°C
14. por no mínimo 15 min

15. Guardar no escuro à temperatura ambiente

16.

Desnaturação

Ressuspender cada precipitado em 2 μ l de ILoading Buffer. Ante de aplicar no gel, desnatura a 95°C por 2' e colocar diretamente no gelo. Em seguida aplicar no gel de sequenciamento do ABI.