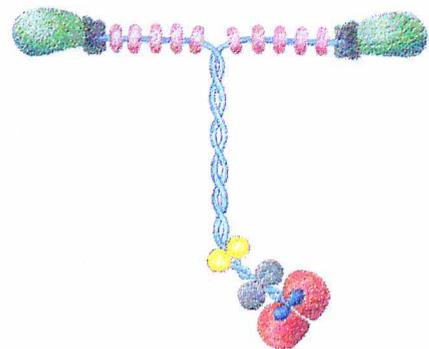
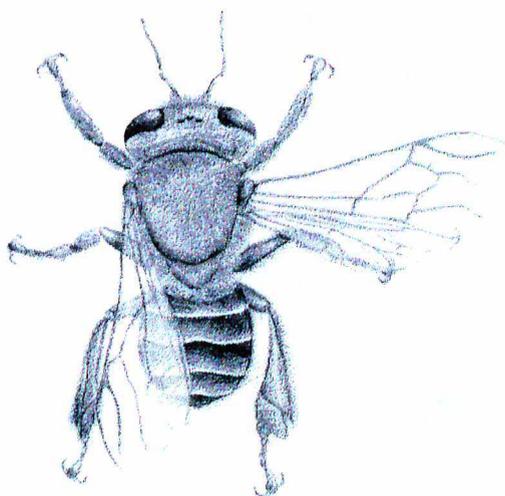


IDENTIFICAÇÃO DE MIOSINA-V E
ANATOMIA INTERNA DOS SISTEMAS
REPRODUTOR E NERVOSO DE *Melipona*
scutellaris Latreille (Hymenoptera, Apidae)



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

MON
585.149.115
5586 i
TES/MEM

**IDENTIFICAÇÃO DE MIOSINA-V E
ANATOMIA INTERNA DOS SISTEMAS
REPRODUTOR E NERVOSO DE *Melipona
scutellaris* Latreille (Hymenoptera, Apidae)**

Aluno

Alexandre Coletto da Silva

Orientador

Prof. Dr. *Foued Salmen Espindola*

Co-orientador

Prof. Dr. *Warwick Estevam Kerr*

SISBI/UFU



1000193427

UBERLÂNDIA - MG
ABRIL DE 2000

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

UMU
595.799.115
55862
TES120
ex.1

**IDENTIFICAÇÃO DE MIOSINA-V E
ANATOMIA INTERNA DOS SISTEMAS
REPRODUTOR E NERVOSO DE *Melipona
scutellaris* Latreille (Hymenoptera, Apidae)**

Alexandre Coletto da Silva

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Genética e Bioquímica, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA - MG

ABRIL DE 2000

23014

Coletto, Alexandre, 1974 -

Identificação de Miosina-V e Anatomia Interna dos Sistemas Nervoso e Reprodutor de *Melipona scutellaris* Latreille (HYMENOPTERA, APIDAE)

- Uberlândia: 2000

Nº total de folhas: 71, Nº total de fotos:

Foued Saumem Espindola

Tese de Mestrado - Universidade Federal de Uberlândia.

Coordenação de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui Bibliografia

1. *Melipona scutellaris* Latreille - Teses. 2. Miosina-V - Teses. 3. Western Blot - Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia.

À DEUS,

Por sua bondade quando me fez parte de sua criação, desfrutando-a com uma vida saudável, familiares maravilhosos, amizades sinceras e, também, pela oportunidade de explorar os mistérios contidos na natureza, vivenciando infinitas possibilidades de crescimento e aperfeiçoamento.

AGRADEÇO.

“ Minha religião consiste numa admiração humilde do Espírito Superior e Ilimitado que se revela a si mesmo nos menores pormenores, que estamos aptos a captar com nossas fracas e irrelevantes mentes. A profunda certeza de um Poder Superior que se revela no universo, difícil de ser compreendido, forma minha idéia de Deus.”

“ O que podemos experimentar de mais belo é o mistério. É a fonte da Arte e da Ciência verdadeira. Aquele para quem tal emoção seja estranha, aquele que não se detenha a admirar as coisas, sentindo-se saturado de surpresa, é como se permanecesse morto. Olhos e espírito fechados.”

Albert Einsten

Aos meus pais,
Antônio Coletto da Silva e Maria do Socorro
Gomes Coletto,
pelo amor, carinho e incentivo

DEDICO.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, por
todas as alegrias e experiências
compartilhadas e por seus ensinamentos
construídos no convívio acadêmico e pessoal.

DEDICO.

AGRADEÇO

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pelos ensinamentos bioquímicos como orientador, pelas sugestões para meu aperfeiçoamento e crescimento como pesquisador, pelo apoio e incentivo e, sobretudo, pela avaliação deste trabalho. Fica, também, minha gratidão pelo convite para participar do intercâmbio entre os laboratórios de Genética e Bioquímica, bem como a utilização do laboratório de Bioquímica.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, pelos ensinamentos, incentivo, confiança e orientação na graduação, co-orientação na pós-graduação e orientação na vida.

À Prof. Dra. Carmina da Cruz Landim pela atenção, disponibilidade em compor a banca examinadora e pela avaliação deste trabalho.

À Prof. Dra. Ana Maria Bonetti e a Prof. Dra. Fernanda Maní, por comporem a banca examinadora e apreciarem esse trabalho ainda na condição de manuscrito.

À Prof. Anna Eugênia Sahione Affonso, pela revisão da Língua Portuguesa.

À minha família pelo apoio e incentivo a mim dedicados em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Bioquímica:

Abelhudos - Gislene, Vania, Gustavo, Rosana, Soraya, Ana Paula Soragi, Cristina Lima, Katiere, Cristina Soares, Viviane Brandão, Flávia, Cristiano, Francis, Cláudio, Maurício Bezerra, Ney, Maria Alice, Roselaine, Jamil, Juliana, Pablo, Camila, Sybelli, Carlos;

Abelhudos simpatizantes – Marcus T. Marculino, Waldesse, Ana Paula de Oliveira, Cristiano, Cícero, Vanessa, Jair Jr., Letícia, Fátima, Lúcia, Alcione, Roselys, Gerson e Francisco - OBRIGADO, pela cooperação, amizade e feliz convivência.

Especialmente à Andreia Barcellos Passos Lima pelo auxílio durante boa parte da execução deste trabalho.

À D. Lygia Sansigolo Kerr, pela atenção, paciência e carinho durante o manejo das colônias em sua residência.

À Gilda pelo dedicação, carinho e atenção dispensada e pelos inúmeros cafezinhos com creme, oferecidos durante o manejo das colônias.

Ao melhor amigo do homem, não podia me esquecer de você Fido, fiel companheiro dos manejos. É verdade que tivemos algumas divergências nos últimos meses, mas ficará registrado na minha memória o seu carinho quando me recepcionava.

A todos os professores do Departamento de Genética e Bioquímica pela minha formação.

À FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL , à FAPEMIG e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
I - INTRODUÇÃO	4
II - OBJETIVOS	19
III - MATERIAIS E MÉTODOS	21
III.1 - Material Biológico	22
III.2 - Métodos	22
III.2.a - Captura/Coleta dos indivíduos	22
III.2.b - Dissecção do material	23
III.2.c - Homogeneização dos tecidos	23
III.2.d - Dosagem de Proteína Total	24
III.2.e - Eletroforese em Gel Gradiente de Poliacrilamida na Presença de SDS (SDS-PAGE/ 5-22%)	26
III.2.f - Transferência eletroforética do gel para membranas de nitrocelulose - "Western Blot"	26
III.2.g - Revelação por quimioluminescência - Imunodeteção	27
III.2.h - Anticorpos Utilizados na Imunodeteção	28
III.3 - Metodologia para Descrição Anatomo-morfométrica	29
III.3.a - Captura/Coleta dos Indivíduos	29
III.3.b - Protocolo para Procedimento de Perfusão de Abelhas	30
III.3.c - Documentação Fotográfica Utilizando Microscópio Estereoscópio	31
III.3.d - Padronização de Escala para Documentação Fotográfica e Artística dos Sistemas Nervoso e Reprodutor de <i>M. scutellaris</i>	31
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
V - CONCLUSÕES	49
VI - RESUMO	51
VII - SUMMARY	53
VIII - BIBLIOGRAFIA	55
IX - ANEXO - (Dados Morfométricos)	63
X - ANEXO - (Padrões de Massa Molecular)	66
XI - ÍNDICE REMISSIVO	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Dados morfométricos das estruturas anatômicas referentes aos sistemas reprodutor e nervoso da *Melipona scutellaris*. – pág. 36

TABELA 2 - Quadro de análise de variância referente as medidas das larguras dos cérebros das operárias, rainhas e machos de *Melipona scutellaris*. - pág. 37

TABELA 3 - Teste de Tukey para médias de larguras de cérebros das operárias, rainhas e machos da *Melipona scutellaris*. – pág. 37

TABELA 4 - Conversão de medidas no microscópio estereoscópio Leica - Wild Typ 308700, Heerbrugg, Switzerland. – pág. 66

TABELA 5 - Medidas do Diâmetro maior das vesículas seminais de macho da *Melipona scutellaris*. Aumento estereoscópio utilizado: 16, (ver anexo 3, tabela de conversão para escala em milímetros). – pág. 66

TABELA 6 - Medidas do comprimento do ovário atrofiado das operárias de *Melipona scutellaris*. Aumento utilizado no microscópio estereoscópio: 16 (ver anexo 3, tabela de conversão para escala em milímetros). – pág. 66

TABELA 7 - Medidas do Diâmetro maior das espermatecas de rainhas virgens da *Melipona scutellaris*. Aumento utilizado no microscópio estereoscópio: 16 (ver anexo 3, tabela de conversão para escala em milímetros). – pág. 67

TABELA 8 - Medidas da largura dos cérebros das operárias, rainhas virgens e machos da *Melipona scutellaris*. Aumento utilizado no microscópio estereoscópio: 16 (ver anexo 3, tabela de conversão para escala em milímetros). – pág. 67

TABELA 9 - Padrões de massa molecular adquiridos da Sigma (SDS – 6H). – pág. 69

TABELA 10 - Padrões de massa molecular adquiridos da Sigma (SDS – 7B). – pág. 69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Vista geral do sistema nervoso (A) e cérebro, gânglio subesofágico e principais nervos da cabeça (B) da operária adulta da *Apis mellifera*, reproduzido de SNODGRASS (1956). – pág. 6

FIGURA 2 - Órgãos reprodutivos internos do macho da *Apis mellifera*, reproduzido de SNODGRASS, 1956. – pág. 7

FIGURA 3 - Órgãos reprodutivos e ferrão da rainha da *Apis mellifera* (vista dorsal), reproduzido de SNODGRASS (1956). – pág. 8

FIGURA 4 - Modelo estrutural da Miosina-V de cérebro (M5a) - redesenhado por COLETTTO baseado em LARSON (1996). – pág. 13

FIGURA 5 - Análise filogenética do domínio motor das miosinas da classe V (A); Homologia dos domínios motor, pescoço e cauda da Miosina-V nos diferentes filos (B) – (reproduzido de RECK-PETERSON, 2000). – pág. 13

FIGURA 6 – Ilustração da *Melipona scutellaris* Latreille, desenho de COLETTTO. – pág. 17

FIGURA 7 - Sistemas reprodutores das Operárias (A), Rainhas Virgens (B) e Machos (C) de *Melipona scutellaris*. – pág. 35

FIGURA 8 - Sistemas Nervosos da Operária (1), Rainha Virgem (2) e Macho (3) de *Melipona scutellaris*. – pág. 36

FIGURA 9 - Perfil eletroforético (A) e Imunoblot para Miosina-V (B) das amostras de homogeneizado (H), sobrenadante (S) e sedimento (P) dos cérebros de operárias (O), rainhas (R) e machos (M) de *Melipona scutellaris* Lat. – pág. 41

FIGURA 10 – Perfil eletroforético (A) e Imunoblot de Cadeia Leve de Dineína (B) com amostras de homogeneizado (H), sobrenadante (S) e sedimento (P) dos sistemas nervosos de operárias (O), rainhas virgens (R) e machos (M) de *Melipona scutellaris* Lat. – pág. 43

FIGURA 11 - Imunodeteção da Miosina-V no extrato total de ovários das rainhas de *Melipona scutellaris*. – pág. 44

FIGURA 12 - Perfil eletroforético (A) e Imunoblot (B) com amostras de homogeneizado (H), sobrenadante (S) e sedimento (P) dos sistemas reprodutores das operárias (O), rainhas virgens (R) e machos (M) de *Melipona scutellaris* – pág. 46

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenosina-5'-trifosfato

BSA – Soro Albumina Bovina

CLD – Cadeia Leve de Dineína

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético (sal tetrassódico)

EGTA - ácido etilenoglicol-bis (-aminoetil éter) – N, N, N', N' - tetracético

HEPES – ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanossulfônico]

IQ – motivos repetitivos (IQXXQRGXXXRXXQ, ~23 aminoácidos) encontrados na maioria das miosinas, representando sítios de ligação às cadeias leves. Cada motivo consiste de em resíduos básicos e hidrofóbicos sendo que na estrutura primária do pescoço da Miosina-V, existem 6 motivos IQ.

Myo2 – segundo gene para miosina identificado em levedura – codifica uma miosina-V (Myo2p)

Myo4 – quarto gene para miosina identificado em levedura – codifica uma miosina-V (Myo4p)

Myo6 – miosina-V de cérebro de rato (também denominada miosina-Vb)

PMSF – Fenilmetilsulfonilfluorido ou fluoreto de fenilmetilsulfonila – inibidor de serina-proteases

PVDF – Membrana de transferencia (polivinilideno difluor)

SDS – dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

TBS/T – Tampão Tris/NaCl com Tween 20%

Tris - Tris - (hidroximetil) – aminometano

I
INTRODUÇÃO

Das diferentes ordens descritas para a classe Insecta, a ordem Hymenoptera é a terceira em número de espécies descritas e a primeira por possuir importância fundamental nos mecanismos de perpetuação de inúmeras espécies vegetais e animais. Os insetos, também, ocupam lugar de destaque no contexto cultural, sistema de crenças, economia e cultura dos povos indígenas. Alguns artrópodes ameaçam sua saúde, a produtividade de suas colheitas, competindo pela comida e espaço humanos.

Certos himenópteros sociais, como as abelhas sem ferrão, já eram conhecidos e domesticados pelos povos pré-colombianos, que lhes atribuíram nomes que ainda hoje persistem na cultura popular. Grupos de líderes indígenas brasileiros, tais como os Kayapó, demonstram vasto conhecimento sobre abelhas sem ferrão e sobre seu comportamento. Seu saber a respeito da biologia de insetos (etnoentomologia) tem gerado hipóteses interessantes, que podem ser testadas cientificamente (POSEY, 1986).

O sistema nervoso dos insetos (fig. 1A), como nos vertebrados, possui neurônios reunidos em um sistema nervoso central (cérebro e cordão nervoso), dentro dos quais passam nervos sensoriais e a partir do qual são enviados sinais sensoriais e motores. Além disso, ambos, insetos e vertebrados têm um sistema nervoso visceral especializado associado com seus órgãos internos. Embora insetos e vertebrados apresentem seus cérebros contidos em cápsulas, o cordão nervoso de um vertebrado é dorsal (dentro de uma espinha dorsal), enquanto o de um inseto é ventral (EVANS, 1984). As abelhas, como os demais insetos eussociais, possuem uma capacidade de aprendizagem muito alta, graças ao seu complexo sistema nervoso. No cérebro das abelhas (fig. 1B), existem os chamados corpos pareados em forma de cogumelo (*corpora pedunculata*) que compreendem uma região rica em neurônios (células Kenyon) e, por isso, são considerados o seu principal centro de memória, associação e aprendizado (ROBINSON *et al.*, 1997).

As diferentes estratégias utilizadas pelos insetos sociais nos processos de comunicação da descoberta de fontes alimentares, tais como: a produção de som

e o uso de feromônios, confirmam a eficiência dessa organização sensorial, permitindo seu sucesso adaptativo. Alguns autores vão mais além, afirmando ser de fundamental importância o entendimento desses processos para o estudo do comportamento social, tendo em vista que este depende da capacidade de comunicação entre os animais (DEAG, 1980; HUNTINGFORD, 1984).

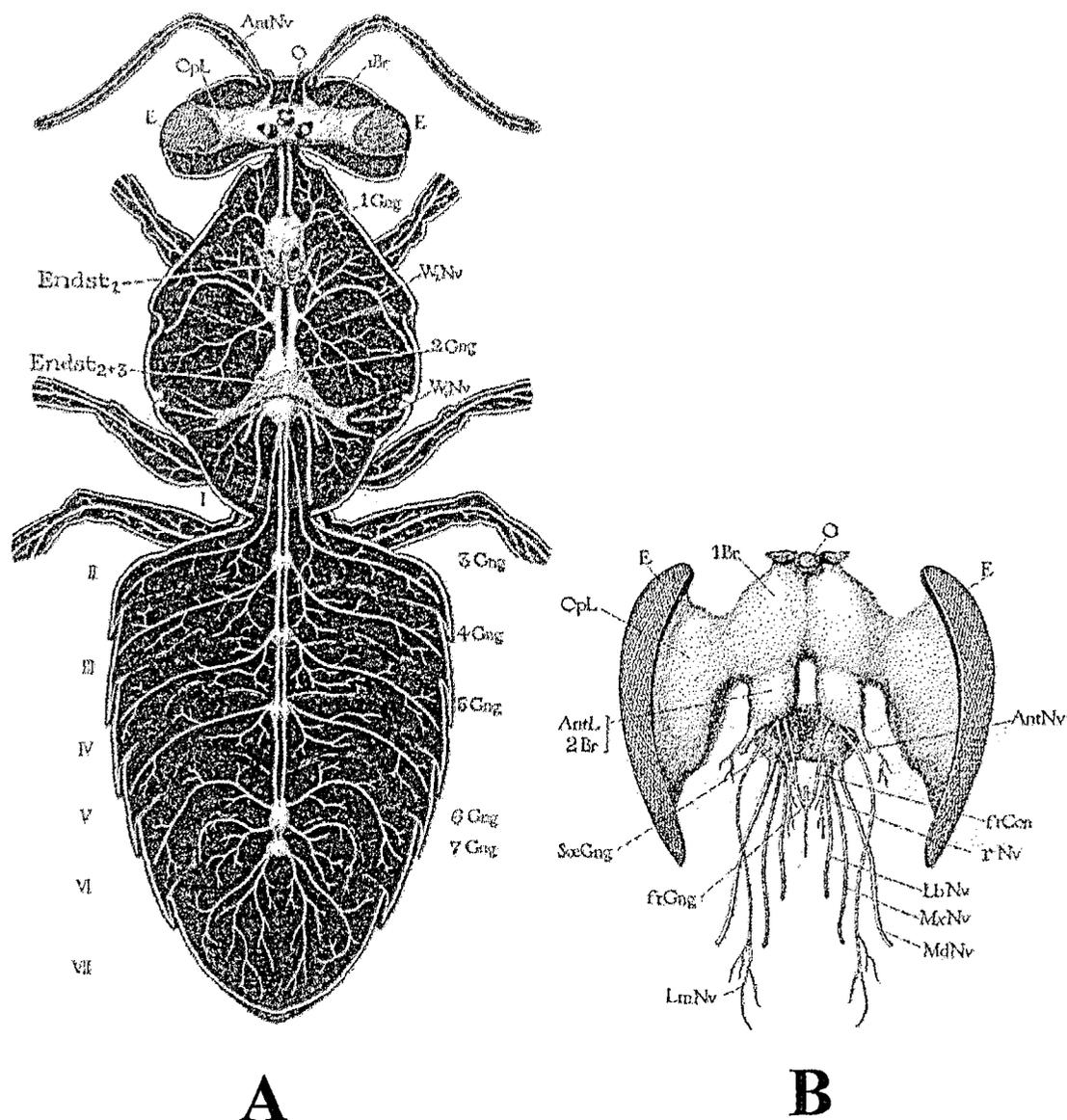


FIGURA 1 – Vista geral do sistema nervoso (A) e cérebro, gânglio subesofágico e principais nervos da cabeça (B) da operária adulta da *Apis mellifera*, reproduzido de SNODGRASS (1956). AntNv – nervo antenal; E – olho composto; O – ocelo; Br – Brain; Gng – gânglio; Endst – endosterno; WNv – nervo da asa; Opl – lóbulo ótico; AntL – lóbulo antenal; frCon – conexão do gânglio frontal; rNv – nervo recorrente; lbNv – nervo labial; MxNv – nervo maxilar; MdNv – nervo mandibular; LmNv – nervo labral; SoeGng – gânglio subesofágico.

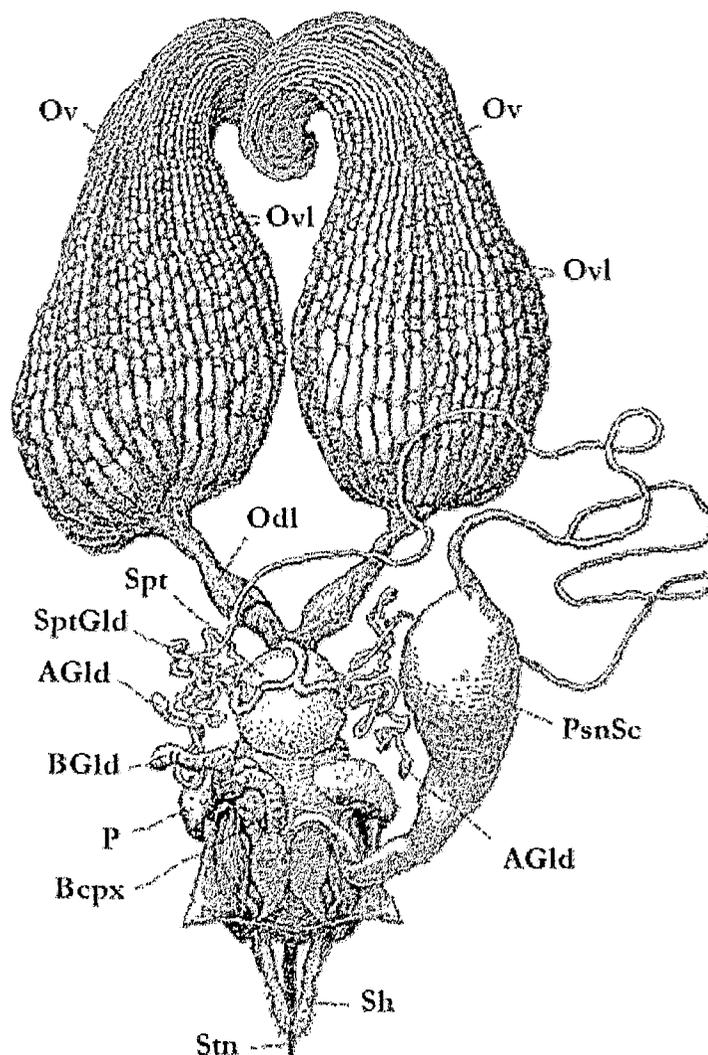


FIGURA 3: Órgãos reprodutivos e ferrão da rainha da *Apis mellifera* (vista dorsal), reproduzido de SNODGRASS (1956).

Ov – Ovário; Ovl – Ovariolo; SptGld – Glândula da Espermateca; AGld - Glândula de veneno do ferrão ; BGld – Glândula Acessória do Ferrão; P – Bolsa lateral da *Bursa Copulatrix*; Spt – Espermateca; Odl – Oviduto Lateral; Stn – Ferrão; Sh – Lóbulos do ferrão; PsnSc – Reservatório de Veneno; Bcpx - *Bursa copulatrix* ou bolsa copulatória.

Pesquisas que abordam a organização das estruturas internas do sistema reprodutor das abelhas podem levar ao desenvolvimento de técnicas que possibilitem a obtenção de cruzamentos controlados. Isso ocorreu, por exemplo, para o gênero *Apis* e o conjunto dessas técnicas ficou conhecido como inseminação artificial ou, mais recentemente, como inseminação instrumental, técnica importante para o melhoramento genético, produção de rainhas e desenvolvimento da criação de abelhas melíferas (CAMARGO, 1972).

A organização e especialização presentes nos sistemas anatômicos internos dos insetos, como o sistema nervoso e reprodutor, também se estende ao nível celular e molecular. O citoplasma, por exemplo, pode ser comparado a uma Metrôpole servida por uma completa malha ferroviária, que funciona como um sistema de transporte e distribuição altamente eficiente e dinâmico. Nesse sistema, os trilhos compõem o chamado citoesqueleto; as locomotivas são as diversas proteínas motoras conhecidas como motores moleculares, que pelos “trilhos” se movimentam, executando o transporte de diferentes tipos de cargas ou vagões, para sítios celulares específicos. Microfilamentos de Actina, Microtúbulos e Filamentos Intermediários são os três tipos principais de proteínas ou “trilhos” do citoesqueleto que sofrem um processo de polimerização (monômeros: G-actina, α e β tubulina e proteínas fibrosas respectivamente). Tal processo possibilita ligações suficientemente longas capazes de cobrir uma célula de uma extensão a outra do citoplasma. O funcionamento dessas proteínas do citoesqueleto depende de um grande número de proteínas acessórias, que ligam os filamentos entre si e, também, a outros componentes celulares. Além disso, essas proteínas acessórias são, também, essenciais para o arranjo controlado dos filamentos protéicos em locais determinados e se interagem com os motores moleculares, que movimentam as organelas ao longo dos filamentos ou movimentam os próprios filamentos (SMALL *et al.*, 1999).

(Motor molecular é o termo utilizado para as mecanoenzimas, que convertem energia química em energia mecânica, desempenhando alguma função na célula. RNA ou DNA polimerases são exemplos de motores moleculares, mas os principais motores que trabalham ao longo de microfilamentos de actina ou microtúbulos, são as miosinas, dineínas e cinesinas. O trabalho gerado por estes motores moleculares provem de energia química produzida pela hidrólise do ATP (Adenosina Tri-Fostato) a qual é convertida em energia mecânica, necessária para o movimento ao longo dos trilhos do citoesqueleto. Essa conversão de energia é extremamente importante em processos celulares tais como: movimento celular, migração de cromossomos, motilidade de vesículas e

de organelas, motilidade flagelar, citocinese, expansão neurítica, formação de cone de crescimento, tráfico de membranas e sinais de transdução (CHENEY & MOOSEKER, 1992; LANGFORD, 1995; HASSON & MOOSEKER, 1996; MERMALL *et al.*, 1998; HIROKAWA *et al.*, 1998 e WU *et al.*, 2000). Microtécnicas que funcionam como verdadeiros sistemas de armadilhas óticas estão sendo utilizados para o estudo da biomecânica de moléculas únicas como as proteínas motoras (cinesinas, miosinas, etc) e os biopolímeros (RNA e DNA polimerases, etc). Esses sistemas partem do princípio básico de que a luz exerce força sobre a matéria e são constituídos basicamente de luz (geralmente um laser), partículas dielétricas, microscópio, superfície óptica e a molécula que é objeto de nosso interesse. Com essa tecnologia é possível se saber de que modo determinada molécula desempenha sua função bioquímica, quais forças internas ou externas estão atuando e como são geradas tais forças. Vários são os sistemas de armadilhas óticas e suas aplicações, enquanto ferramentas para solucionar casos de doenças genéticas, têm possibilitado progressos em áreas clínicas importantes, (MEHTA *et al.*, 1999a).

(As miosinas pertencem a uma superfamília com 15 classes distintas estruturalmente e evolutivamente interrelacionadas (WU *et al.*, 1998; EVANS *et al.*, 1998 e MEHTA *et al.*, 1999b). As primeiras miosinas a serem investigadas foram as da classe II (presentes nos músculos e em células não-musculares). Essas miosinas são dímeros com duas cabeças e uma cauda em bastão (coiled-coil) que possuem forma filamentosa e são, por isso, consideradas convencionais. Mais tarde, descobriu-se miosinas da classe I, monômeros com uma cabeça e sem cauda, sem coiled-coil que não formam filamentos, sendo portanto, consideradas não-convencionais (ESPINDOLA, *comunicação pessoal*). Outros membros das miosinas da classe II, desempenham funções na contração muscular e estão envolvidos nos processos celulares anteriormente descritos.) Além disso, também desempenham funções secretórias, atuam no tráfego de membranas e localização celular, no transporte de RNA mensageiro e na produção de expansões citoplasmáticas requeridas para o movimento e para a nutrição

(MERMALL *et al.*, 1998; BAKER & TITUS, 1998). Nos últimos 10 anos, outras miosinas que apresentam diferenças estruturais quando comparadas com a miosina II foram descobertas e, também, consideradas não-convencionais (SPUDICH, 1994 e MOOSEKER & CHENEY, 1995).

Das classes descritas para as miosinas, a miosina não-convencional da classe V é uma das mais bem caracterizadas, sendo encontrada desde leveduras até vertebrados, exercendo papel importante no transporte intracelular (organelas e vesículas) e função altamente regulada por Ca^{++} e por calmodulina (TITUS, 1993 e 1997; LARSON, 1996 e LANGFORD *et al.*, 1998). A Lula e sapo constituem organismos nos quais foram determinadas seqüências parciais da Miosina-V, e três genes humanos para Miosina-V foram parcialmente ou completamente clonados e sequenciados (MOLYNEAUX & LANGFORD, 1997; SOLC *et al.*, 1994; BEMENT *et al.*, 1994 e ENGLE & KENNETT, 1994).

Compõem a classe V dessas miosinas os produtos dos genes *myo2* e *myo4*, da levedura *Saccharomyces cerevisiae*; o produto do gene *dilute* de camudongo; a proteína *myr6* de rato, a miosina-V de cérebro de galinha ou **BM-V**, e a miosina-V de cérebro humano, *mioxina* (JOHNSTON *et al.*, 1991; HAARER *et al.*, 1994; MERCER *et al.*, 1991; ZHAO *et al.*, 1996; ESPREÁFICO *et al.*, 1992; SANDERS *et al.*, 1992).

(A Miosina-V foi inicialmente detectada em preparações de actomiosina de cérebro de coelho (LARSON *et al.*, 1990 e ESPINDOLA *et al.*, 1992). Estudos subsequentes conduziram à clonagem do gene da M5a de ave (galinha), bem como a obtenção de anticorpos e sua caracterização pela purificação bioquímica a partir de cérebros de pintainhos - *Gallus gallus* - (ESPREAFICO *et al.*, 1992; CHENEY *et al.*, 1993; COELHO & LARSON 1993; NASCIMENTO *et al.*, 1995; ESPINDOLA *et al.*, 1996a). Estruturalmente, a Miosina-V constitui um dímero de cadeias pesadas, que possui 3 principais domínios: um domínio motor altamente conservado, um domínio alfa hélice pescoço (ou regulatório) que apresenta 12 motivos IQ (repetições de 24-30 aminoácidos) contendo os sítios ligantes de cadeias leves, e um domínio cauda C-terminal, menos conservado e

que consiste de regiões globulares intercaladas com regiões superenoveladas de α hélice, no qual existe a ligação com a carga a ser transportada, (ver modelo na **fig. 4**). A seqüência de aminoácido do domínio cabeça ou motor é altamente conservada pela classe de miosinas V, o que pode ser confirmado na **fig. 5**, com 42% de identidade mais 23% de homologia (LARSON, 1996 e RECK-PETERSON, 2000). (Essa conservação filogenética das miosinas da classe V, bem como a homologia dos seus domínios específicos nos diferentes filós, possibilitou a produção de anticorpos contra domínios específicos dessas proteínas e se constitui em instrumento importante para estudos de identificação e imunolocalização em diferentes organismos (LIMA *et al.*, 1999)).

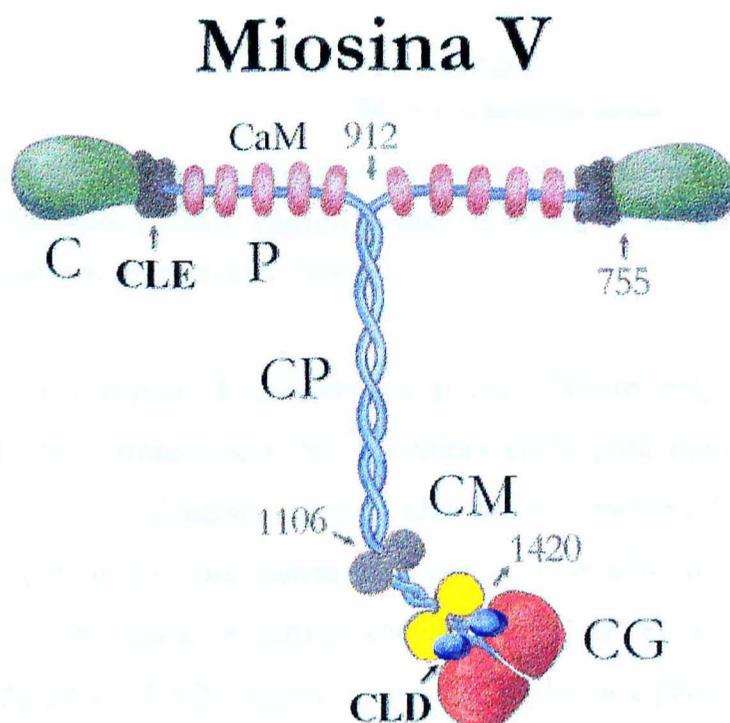


FIGURA 4: Modelo estrutural da Miosina-V de cérebro (M5a) - redesenhado por COLETTTO baseado em LARSON (1996). C = região cabeça; P = região pescoço; CLE = cadeia leve essencial; CLD = cadeia leve de dineína; CaM = calmodulina; CP = cauda proximal; CM = cauda medial e CG = cauda globular. Os números indicam as posições dos resíduos de aminoácidos nas junções entre os domínios.

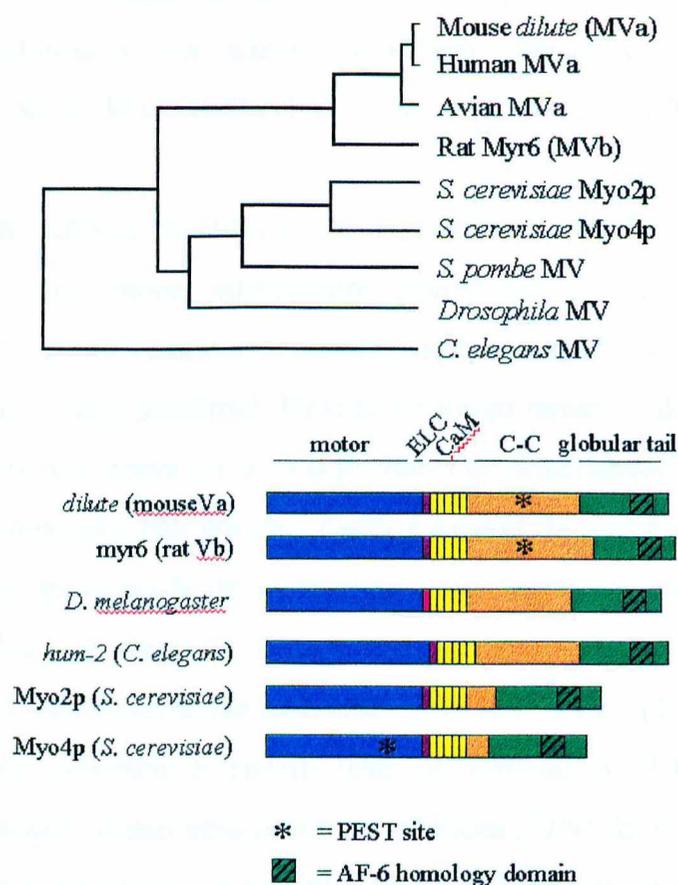


FIGURA 5: Análise filogenética do domínio motor das miosinas da classe V (A); Homologia dos domínios motor, pescoço e cauda da Miosina-V nos diferentes filis (B) – (reproduzido de RECK-PETERSON, 2000).

A cabeça globular, localizada na porção N-terminal, inclui desde o aminoácido 1 até o aminoácido 765 e contém sítios para hidrólise do ATP e ligação com Actina. O domínio pescoço alfa hélice (aminoácidos 765 a 912) é alongado se comparado com outras miosinas e é o sítio de ligação para 8 moléculas de calmodulina e outras cadeias leves de 17 e 23 kDa. Essas subunidades de 23 e 17 kDa fazem parte da família dos genes da cadeia leve essencial de Miosina-II, codificada pelos genes de cadeia leve na galinha, L23 e L17, respectivamente (ESPINDOLA *et al.*, 2000).

Os motivos IQ são encontrados em todos os tipos de miosinas conhecidas e possuem de 23 a 30 aminoácidos de comprimento. Acredita-se que cada motivo IQ constitua um sítio de ligação para uma cadeia leve. Análises densitométricas

com miosina de cérebro sugerem que cada cadeia pesada se liga a 4 ou 5 moléculas de calmodulina, a uma cadeia leve do tipo essencial (17 ou 23 kDa) e a uma cadeia leve de 10 kDa (CHENEY *et al.*, 1993 e ESPINDOLA *et al.*, 2000).

O restante da proteína constitui o domínio cauda, formado por segmentos em alfa hélice superenovelados, intercalados com domínios globulares (partes cinza e amarela, na fig. 4). O maior segmento superenovelado, os aminoácidos 912-1106, é chamado cauda proximal. Devido ao longo tamanho do segmento α hélice, acredita-se que ele possa ser o sítio primário de dimerização da molécula. A sequência de aminoácidos nas porções distal e medial da cauda são altamente conservadas entre as miosinas-V de vertebrados, mas essas sequências não são tão bem conservadas por meio da classe. A Miosina-V possui também uma cadeia leve de 10 kDa, identificada por ESPINDOLA *et al.*, (1996), como a mesma proteína que constitui a cadeia leve de dineína (CLD8) flagelar e citoplasmática, e também como uma proteína inibidora (PIN) da forma neuronal da NOS (óxido nítrico-sintetase). A subunidade 10 de kDa esta associada com o domínio cauda da Miosina-V (ESPINDOLA *et al.*, 2000). A CLD é altamente conservada e tem sido identificada em vários organismos incluindo *Chlamydomonas*, *Sacharomysces cerevisiae*, *Drosophila*, *Aspergillus*, *Schistosoma mansoni* e humanos (KING & PATEL-KING, 1995; PAZOUR *et al.*, 1998). Possíveis funções para a CLD no funcionamento da Miosina-V incluem estabilização de ligações cadeia pesada - cadeia pesada e ligação à carga. Estudos bioquímicos demonstram que a CLD existe como um dímero *in situ*, quando ligada à Miosina-V ou dineína (BENASHSKI *et al.*, 1997).

Tanto a estrutura quaternária quanto as propriedades bioquímicas da Miosina-V reforçam a idéia dessa proteína como motor molecular que tem função no transporte de organelas. O comprimento dos domínios cabeça e pescoço da Miosina-V (31 nm comparado aos 18 nm para Miosina-II) é considerado mais longo que na maioria das outras miosinas. Em micrografias eletrônicas, os domínios cabeça de 2 cadeias pesadas no dímero são geralmente

alargados separadamente dando à Miosina-V um alcance significativo que pode permitir o desengate da cabeça para que ela se conecte a um filamento adjacente dentro de uma frouxa rede de trabalho de actina.

Além dos ensaios enzimáticos, os ensaios de motilidade têm sido conduzidos com Miosina-V imunoabsorvida e purificada, a fim de se entender os mecanismos utilizados pela Miosina-V para desempenhar suas funções na interação com filamentos de actina. Tem se demonstrado, por exemplo, que a Miosina-V é um motor processivo dependente de actina, ou seja, um motor que sofre ciclos catalíticos múltiplos e avanços mecânicos a cada encontro difuso com seu trilho de actina (MEHTA *et al.*, 1999b). A Miosina-V é capaz de translocar filamentos de actina em ensaios de deslizamento de filamentos e pode mover partículas artificiais (contas) ao longo de filamentos de actina em sistemas de armadilhas óticas (MEHTA *et al.*, 1999a; VEIGEL *et al.*, 1999).

Estudos de imunolocalização celular e mutações também constituem importantes linhas de pesquisas que fornecem pistas sobre o papel da Miosina-V. Os anticorpos policlonais contra a Miosina-V demonstram a localização subcelular dessa proteína em neurônios, astrócitos e outras células secretoras do córtex cerebral de rato. Isso sugere possíveis papéis na região sináptica (MANI *et al.*, 1994. ESPINDOLA *et al.*; 1996 e SUTER *et al.*, 2000) e revela a presença dessa proteína em neurônios ganglionares da raiz dorsal de embriões de galinha, mais especificamente na extremidade do cone de crescimento e em regiões ricas em organelas. Resultados similares foram obtidos para gânglios cervicais superiores de camundongos nos quais se constatou o enriquecimento da Miosina-V nas regiões ricas em organelas em associação a um grupo distinto de pequenas organelas ligadas aos microtúbulos e à actina. Estes dados sugerem um modelo para a Miosina-V, que funcionaria como um “passageiro” ligado a organelas transportadas por motores baseados em microtúbulos, até regiões corticais, ricas em actina, onde passaria a atuar como motor ou na ancoragem de vesículas (EVANS *et al.*, 1997).

Mutações identificadas nos genes responsáveis pela expressão da Miosina-V em humanos e camudongos (MERCER *et al.*, 1991 e PASTURAL *et al.*, 1997) revelaram que defeitos na transferência de grânulos de melanina dos melanócitos para os queratinócitos podem levar a distúrbios fenotípicos. Nos camudongos esse fenótipo é conhecido como *dilute* e caracteriza-se pelo clareamento da pelagem deles; já em humanos esse fenótipo caracteriza uma enfermidade, a chamada Síndrome de Griscelli. Essa doença rara, foi associada com mutações no gene da Miosina-V presente no cromossoma 15q21 (GRISCELLI *et al.*, 1978; PASTURAL *et al.*, 1997). Trata-se de uma doença autossômica recessiva caracterizada por imunodeficiência grave e albinismo parcial com diluição da pigmentação a exemplo do fenótipo *dilute* no camundongo. Esse clareamento que constitui um fenótipo de cabelos e pele prateados é resultado de acúmulo de melanossomos nos melanócitos.

O gene da Miosina-V em *Drosophila melanogaster* foi clonado e mutações neste gene podem causar letalidade embrionária (BONAFE & SELLERS, 1997). MacIVER *et al.*, (1998), identificaram um transcrito de um gene para Miosina-V localizado nos oócitos durante fases precoces da oogenese. O padrão de localização observado por estes autores utilizando hibridização *in situ* é semelhante àquele visto para os genes *orbe* e *oskar*, ambos com papéis fundamentais na oogênese e embriogênese.

Neste trabalho, procurou-se investigar a presença da Miosina-V e sua cadeia leve acessória de dineína nos sistemas nervoso e reprodutor da Uruçu do Nordeste - *Melipona scutellaris* Latreille (Fig. 6) - espécie de abelha indígena, brasileira e sem ferrão, cuja distribuição geográfica alcança desde o sudeste da Bahia até o sul do estado do Rio Grande do Norte ocupando, principalmente, o bioma chamado Zona da Mata. Paralelamente realizou-se um estudo anatômico morfométrico das estruturas internas pertencentes aos sistemas nervoso e reprodutor dessa abelha.

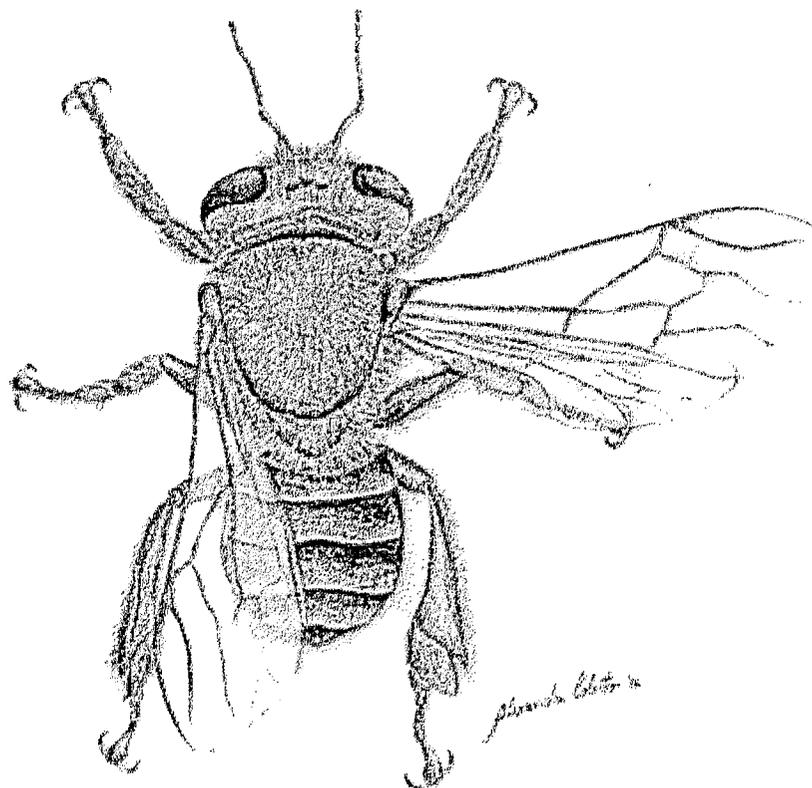


FIGURA 6 – Ilustração da *Melipona scutellaris* Latreille, desenho de COLETTO in COLETTO & KERR, 1996.

No idioma Tupi, o termo uruçu significa “abelha grande”, o que explicaria o fato de muitas abelhas brasileiras sem ferrão serem conhecidas por essa denominação. As abelhas sem ferrão nativas do Brasil pertencem à superfamília Apoidea que é subdividida em 10 famílias: Colletidae, Andrenidae, Fideliidae, Oxaeidae, Halictidae, Melittidae, Megachilidae, Anthophoridae, Stenotritidae, Ctenoplectridae e Apidae (MICHENER, 1944 e 1965; MICHENER & MICHENER, 1951). Dentro dos Apidae, as abelhas corbiculadas se subdividem em quatro subfamílias: *Apinae*, *Meliponinae*, *Bombinae* e *Euglossinae*. A subfamília *Meliponinae*, a que pertence as abelhas indígenas sem ferrão, por sua vez, se divide em duas tribos: Meliponini (Central e Sul Americana) e Trigonini (Pan-Tropical). Dentro dos Meliponinae há 52 gêneros que totalizam mais de 400 espécies espalhadas em todo o mundo, abrangendo desde o Rio Grande do Sul até o centro do México, a África, Índia, Malásia, Indonésia e Austrália (KERR *et al.*, 1996).

No Brasil, de 30 a 90 % das árvores nativas, dependendo da região, são polinizadas por abelhas sem ferrão, designadas na literatura científica pelo nome geral de meliponíneos. Das mais de 400 espécies já identificadas, em todo o mundo, aproximadamente 100 estão em perigo de extinção devido a ações antrópicas, tais como: desmatamentos, destruição de ninhos por madeireiros e/ou meleiros e envenenamento por uso indiscriminado de agrotóxicos em plantações (KERR et al., 1994 e KERR *et al.*, 1996).

Por todos estes aspectos abordados até aqui, este trabalho procura utilizar a *M. scutellaris* como um possível modelo de estudos para a neurobiologia e mesmo a biologia reprodutiva. Pois acrescenta conhecimentos às hipóteses referentes às funções e propriedades bioquímicas dos motores moleculares (em especial, Miosina-V), descreve a anatomia interna dessa abelha e, divulga sua existência e sua importância nos ecossistemas naturais.

II

OBJETIVOS

1 - Identificar a Miosina-V e a cadeia leve de dineína (CLD) nos sistemas nervoso e reprodutor de indivíduos adultos (operárias, rainhas virgens e machos) da *M. scutellaris* utilizando a técnica de Western Blot.

2 - Dissecar, reconhecer, medir e documentar as estruturas anatômicas que compõem os sistemas nervoso e reprodutor da *M. scutellaris*.

04523/00

III
MATERIAIS
E
MÉTODOS

III.1 - MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foram utilizados rainhas virgens, machos e operárias de diferentes colônias da *M. scutellaris*. Originalmente, essas colônias fazem parte de um lote composto de 20 rainhas (todas em suas colônias) provenientes da região da Chapada Diamantina, introduzidas em Uberlândia em dezembro de 1987, mais 3 rainhas de Catu-BA (S 12° 21'; W-Gr 38° 23') em 1993; 11 rainhas originárias do município de Lençóis-BA (Chapada Diamantina - S 12° 34'; W-Gr 41° 23') entre 1992 e 1995 e 13 rainhas obtidas no município de Piatã-BA (a 200 Km a oeste de Lençóis - BA), (CARVALHO *et al.*, 1996). A última e mais recente introdução foi feita em outubro de 1999 com a aquisição de 8 colônias provenientes do município de Andaraí-BA (Chapada Diamantina).

A população inicial deu origem, hoje, a 64 colônias no Meliponário Uberlândia, Condomínio Mansões Aeroporto na cidade de Uberlândia - MG, colônias essas que são utilizadas nas pesquisas científicas em desenvolvimento nos Laboratórios de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. No Meliponário Uberlândia, utiliza-se um conjunto de práticas para manutenção dessas colônias, que são denominadas de manejo racional (para revisão sobre técnicas de manejo, consultar KERR *et al.*, 1996).

III.2 – MÉTODOS

III.2.a – CAPTURA/COLETA DOS INDIVÍDUOS

A coleta de material foi realizada no próprio Meliponário UFU-KERR durante o ano de 1999 e 2000. As operárias foram coletadas no momento da saída para o vôo, na própria porta de entrada das colônias. As rainhas virgens foram coletadas no chão, onde permanecem por alguns segundos antes de voarem. É comum a expulsão dessas rainhas das colméias pelas operárias.

Os machos foram coletados em pontos específicos, geralmente próximos ao alimentador artificial coletivo ou na extremidade das caixas racionais

(próximos à porta de entrada) ou, ainda, no muro ou vegetação vizinhos, onde houvesse incidência de raios solares (temperatura alta).

Para a coleta dos indivíduos utilizou-se uma pequena rede de aquário usada para captura de peixes. Posteriormente, os indivíduos foram mantidos em mini- colmeias com disponibilidade de alimento (mel de *Apis*) e um tubo de ensaio com água e algodão para se manter a umidade.

III.2.b - DISSECAÇÃO DO MATERIAL

As abelhas foram fixadas com auxílio de alfinetes entomológicos em placa de *Petri* contendo cera e/ou parafina. Adicionou-se uma quantidade de solução salina ou água destilada suficiente para cobrir o material e facilitar o processo de remoção da estrutura alvo. A remoção das estruturas anatômicas internas foi feita com auxílio de instrumental de precisão adequado (pinças, mini-tesouras, sondas e outros) previamente esterilizados. O material foi esterilizado ora com algodão embebido em álcool 70% ora por fervura, para evitar contaminações por fungos e/ou bactérias presentes nas estruturas a serem dissecadas.

Para fins de documentação anatômica e morfométrica a dissecação foi realizada em presença de fixador Dietrich que substituiu a água destilada ou solução salina utilizada nos ensaios bioquímicos.

O reconhecimento inicial das estruturas alvo envolvidas neste trabalho foi realizado mediante consulta dos trabalhos de SNOODGRAS (1956) e Camargo (1972).

III.2.c - HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS

Após a captura dos indivíduos, sua dissecação, remoção dos tecidos de interesse e estocagem em freezer - 80 C, procedeu-se à homogeneização do material. Nessa etapa foram necessários: Sonda Omine-mix (Omni TH International); tubos Eppendorfs previamente esterilizados; ponteiras; Becker;

estante para tubos eppendorfs; caixa de isopor; tampão de homogeneização; tampão da amostra, 10 vezes concentrado (TA 10x).

Os tubos eppendorfs contendo o material a ser homogeneizado são retirados do freezer à - 80C e, imediatamente, colocados em N₂ líquido até o momento de sua homogeneização. O tampão de homogeneização foi adaptado a partir do protocolo descrito por CHENEY (1998) a saber: 40 mM Hepes pH 7.7, 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM, Benzamidina, 100 µM Aprotinina, 0.5 mM PMSF.

Acrescenta-se um volume adequado para cada amostra (500µL para 10 cérebros, 500µL para 10 sistemas nervosos completos, 300µL para 10 sistemas reprodutores completos; 300µL para 5 pares de ovários) e as amostras são homogeneizadas por 1 minuto. Retira-se uma alíquota (100µL) do homogeneizado e o volume restante é centrifugado a 4° C, 40000 x g por 40 minutos (Ultra-centrífuga Himac CR 21, HITACHI, rotor 27). A seguir, ressuspende-se o sedimento com o mesmo volume de tampão de homogeneização, retira-se uma alíquota de 50µL para a dosagem de proteínas e acrescenta-se TA (10x) no restante do volume. Retira-se uma alíquota de 50 µL do sobrenadante e acrescenta-se TA 10 x no restante do volume. As amostras são fervidas a 100° C por 2 minutos e armazenadas em uma caixa de isopor contendo gelo, até o momento de serem utilizadas na próxima etapa (dosagem de proteína total).

III.2.d - DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL

A dosagem de proteína foi realizada com base no princípio da ligação proteína-corada de acordo com BRADFORD, 1976. Nesse método utilizou-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão. O material necessário para essa etapa inclui: estantes para tubo de ensaio; caixa de isopor; tubos de ensaio; ponteiras; becker; dosador para Bradford; gaze; água pura (milli-Q PLUS, sistema de ultra purificação de água MILLIPORE); BSA 1mg/mL (soroalbumina bovina); reagente de Bradford (100 mg de Comassie Blue G, 50 mL de Etanol 95%, 100

mL de ácido orto-fosfórico, completar para o volume final de 1000 mL com água pura); amostras para dosagem.

A curva padrão de BSA foi definida inicialmente com:

Tubos	Volume BSA	Volume H₂O	Volume Final
0	-	100 µL	100 µL
5	5 µL	95 µL	100 µL
10	10 µL	90 µL	100 µL
15	15 µL	85 µL	100 µL
20	20 µL	80 µL	100 µL
25	25 µL	75 µL	100 µL
30	30 µL	70 µL	100 µL

Os tubos a serem dosados sempre continham um volume final de 100 µL (incluindo volume da amostra mais volume de água). Um tubo controle (“branco”) foi preparado; ele continha o tampão da amostra (tampão de homogeneização) e água. Cada tubo recebeu 3 mL de reagente de Bradford (com dosador). A leitura em espectrofotômetro (HITACHI U-2000 Spectrophotometer), a 595 nm, foi feita depois de, no mínimo, 2 minutos, tempo suficiente para o reagente de Bradford sensibilizar as amostras.

Todas as amostras, incluindo a curva padrão, foram feitas com duplicatas e utilizou-se os valores das médias aritméticas das amostras.

A equação da reta foi obtida utilizando-se o programa EXCEL (Microsoft Office 97) e as médias das leituras das amostras foram substituídas nessa equação, para se obter a concentração de proteína de cada amostra. A padronização da concentração de proteínas para todas as amostras analisadas foi importante na aplicação dessas amostras no gel.

III.2.e - ELETROFORESE EM GEL GRADIENTE NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE / 5-22%)

Utilizou-se o sistema de tampão descontínuo descrito por LAEMMLI & FAVRE (1973). Nessa fase foram utilizados: cuba de eletroforese; mini-géis com dimensões 8.3 x 4.7 x 0.05 cm (Hofer) com gradiente de acrilamida de 5 a 22% no gel de separação e 3% no gel de empilhamento; seringa (aplicador); becker; estante para ependorffs; papel higiênico, tampão eletrodo 4 vezes concentrado, pH 8.3 [Tris (Trizma Sigma) 100 mM, EDTA (Boehringer Mannheim) 7,8 mM, GLICINA (Sigma) 770 mM e SDS (Boehringer Mannheim) 3%]; água milli-Q e amostras para aplicação.

A eletroforese foi conduzida com tampão eletrodo (estoque 4 vezes concentrado, que foi diluído para 1 vez, ou seja, 60 mL de tampão 4 vezes concentrado para 240 mL de H₂O milli-Q). O tampão eletrodo, assim chamado, é composto de Tris 100 mM, EDTA 7.8 mM, glicina 770 mM, SDS 3% pH 8.3) e uma corrente constante de 30 mA. As amostras foram aplicadas ao lado de um padrão de peso molecular (PM) conhecido (PADRÃO SDS – 7B ou SDS – 6H, SIGMA) e submetidas a uma corrente elétrica constante de 30 mA por aproximadamente 60 min.. Em seguida, procedeu-se com a coloração do gel por mais ou menos 30 minutos em solução de Comassie Brilliant Blue R 0.125%, metanol 50% e ácido acético 9% e depois descoloração com solução descorante (metanol 5% e ácido acético 9%). Posteriormente, os géis foram documentados por meio de processamento de imagem digital (scanner ScanMaker III da MICROTEK) e conservados em solução de ácido acético 7%.

III.2.f –TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA DO GEL PARA MEMBRANAS DE NITROCELULOSE – “WESTERN BLOT”

Utilizou-se a transferência eletroforética segundo TOWBIN *et al.* (1979). Nessa etapa foram necessários: cuba de eletrotransferência; papéis de filtro; esponjas; membrana de transferência (Hybond™ C, 0.45 micron, AMERSHAM

LIFE SCIENCE); “Suporte para o sanduíche”; gel a ser transferido; tampão de eletrotransferência ou eletroblot; corante Ponceau a 0,2%; TCA – Ác. tricloro acético 3% → 0,2%.

As amostras contendo as proteínas separadas por SDS-PAGE foram então transferidas para membrana de nitrocelulose a 100 mA “overnight”, utilizando-se tampão Eletroblot (80 mL tampão Tris-Glicina [10 x], 160 mL metanol e 800 mL de H₂O pura - milli-Q). Após a corrida do gel, colocou-se o mesmo no tampão de eletrotransferência e, posteriormente, procedeu-se com a montagem de “sanduíche” (tendo o cuidado de mantê-lo sempre molhado pelo tampão). A montagem é feita na seguinte ordem: esponja, papel de filtro, membrana de transferência, gel, papel de filtro, esponja. O “sanduíche” foi colocado na cuba de eletrotransferência por 12 horas a uma corrente elétrica constante de 100 mA. A membrana após a transferência, foi corada com Ponceau e mantida na geladeira.

O procedimento utilizado nos ensaios que tinham por objetivo estudar a presença da Cadeia Leve de Dineína (CLD) foi o mesmo aplicado na cadeia pesada da Miosina-V, já citado anteriormente, embora a membrana utilizada tenha sido a de PVDF e os tempos de eletrotransferência tenham sido de 15 min. e 45 min.

III.2.g - REVELAÇÃO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA – IMUNODETECCÃO

Nesse processo foram utilizados os seguintes materiais: cassete de revelação; membrana transferida; papel de filtro; pinça; timer; filme fotográfico; solução de detecção (Kit ECL Western Blotting, Amersham LIFE SCIENCE); solução reveladora; solução fixadora, água ultra-pura e dois tipos de anticorpos que serão descritos posteriormente.

Primeiramente, a membrana é bloqueada, com leite desnatado (Molico-Nestlé, 5%), por um período de 6 horas. O processo de bloqueio consiste numa estratégia de “proteção” dos sítios de ligação não-específicos.

A seguir, a membrana é lavada 3 vezes, com TBS (1 vez concentrado), por um período de 5 minutos a cada vez, e submetida ao anticorpo primário em incubação de 12 horas. Em seguida, retira-se o anticorpo primário, a membrana é novamente lavada 3 vezes, nas mesmas condições já citadas, com TBS (1 vez concentrado) e colocada em contato com o anticorpo secundário, permanecendo incubada por 1 hora.

Mais uma vez a membrana é lavada 3 vezes (por 5 minutos cada) com TBS (1 vez concentrado) e, em seguida, procede-se à revelação. A revelação por quimioluminescência, a exemplo de uma revelação fotográfica em estúdio, deve utilizar ambiente com ausência total de luz branca ou com auxílio de luz vermelha. A solução de detecção foi aplicada na membrana por 1 minuto. A membrana foi colocada em cassete de revelação e foram realizadas quatro exposições no papel fotográfico, em tempos diferentes. Na primeira exposição, o papel fotográfico é colocado no cassete, onde permanece lacrado até a finalização do tempo; na segunda exposição, o papel é invertido no sentido da direita para a esquerda. Finalmente, na terceira e quarta exposições, o filme é invertido da parte superior para a inferior e do lado direito para o esquerdo, respectivamente. Após as exposições, o filme é colocado em solução reveladora (1 min.), água (1 min.) e solução fixadora (1 min.) nessa ordem. Após a secagem, o filme é analisado.

III.2.h – ANTICORPOS UTILIZADOS NA IMUNODETECCÃO

Os anticorpos utilizados na imunodeteccão da Miosina-V e da cld foram:

- ANTICORPO PRIMÁRIO PARA RECONHECIMENTO DA CADEIA PESADA DA MIOSINA-V – anticorpo α -head ou anti-cabeça da Miosina-V, obtido por imunização de coelhos, utilizando como antígeno o domínio motor ou cabeça da Miosina-V, expresso em bactéria. A seqüência do domínio cabeça de M5, usada para produzir a proteína de fusão para imunização, foi descrito em ESPREÁFICO *et al* (1992). O anticorpo utilizado neste trabalho foi produzido

como descrito em ESPREAFICO *et al.* (1998) e SUTER *et al.* (2000). A diluição do anticorpo usado nos ensaios por adição de TBS, foi de: 1:1000, na concentração de 0,2 µg/ µL;

- ANTICORPO SECUNDÁRIO PARA RECONHECIMENTO DA CADEIA PESADA DA MIOSINA-V – soro anti-habbit, policlonal, obtido por imunização de coelhos, anti-IgG de coelho (obtido de Boehringer Mannheim), diluição 1:2000 por adição de TBS, na concentração de 0,2 µg/µL;

- ANTICORPO PRIMÁRIO PARA RECONHECIMENTO DA CADEIA LEVE DE DINEÍNA – o anticorpo anti-dlc ou R4058 foi produzido a partir da imunização em coelho da dlc em fusão com proteína ligante de maltose (plm). O soro foi obtido por clonagem e expressão da cadeia leve de dineína do flagelo de *Chlamydomonas reinhardtii* (linhagem unicelular), como descrito em KING *et al.*, 1995. O soro foi imunopurificado (protocolo disponível em PATEL & KING (1995) contra a cadeia leve de dineína do flagelo de *C. reinhardtii*. Diluição utilizada nos ensaios por adição de TBS: 1:50, na concentração de 0,2 µg/µL;

- ANTICORPO SECUNDÁRIO PARA RECONHECIMENTO DA CADEIA LEVE DE DINEÍNA – anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com peroxidase, provenientes da Boehringer Mannheim, diluição 1:50 por adição de TBS, na concentração de 0,2 µg/µL;

III.3 – METODOLOGIA PARA DESCRIÇÃO ANATOMO-MORFOMÉTRICA

III.3.a - CAPTURA/COLETA DOS INDIVÍDUOS

Operárias, rainhas virgens e machos foram coletados no Meliponário Uberlândia (ver item: Material Biológico).

Os indivíduos foram mantidos em mini-colméias, que continham algodão embebido em água para que fosse mantida a umidade. Também foram usadas

nessas mini-colméias, alimentadores artificiais internos contendo mel de *Apis mellifera*. Posteriormente esses indivíduos, foram dissecados utilizando-se as ferramentas anteriormente descritas.

Utilizou-se CO₂ para anestésiar os indivíduos no momento da manipulação da mini-colméia para a placa de *Petri*.

III.3.b – PROTOCOLO PARA PROCEDIMENTO DE PERFUSÃO DE ABELHAS

DIETRICH foi o fixador escolhido para a perfusão por ser utilizado para análise citológica e histológica de insetos. Essa solução consiste em: 17 cm³ de álcool 96%; 6 cm³ de formol 40 %; 02 cm³ de ácido acético glacial; 28 cm³ de água destilada.

Cada abelha foi perfundida por uma micro-seringa que é utilizada, geralmente para inseminação instrumental de abelhas. Um micro capilar adaptado para essa seringa foi construído (oficina de Hialotecnia da Universidade Federal de Uberlândia) com o objetivo de permitir a execução do processo de perfusão das abelhas. O microcapilar é colocado no aparelho bucal da abelha e o êmbolo (em rosca) da seringa é lentamente acionado até que o conteúdo de aproximadamente 8 µL seja transferido para as partes internas do seu exoesqueleto. Como opção adicional, pode-se realizar a perfusão aplicando-se o conteúdo no tórax do inseto com o mesmo microcapilar descrito anteriormente, de modo a perfurar seu exoesqueleto.

Ensaio prévios foram conduzidos para testar a eficiência deste método, adicionando-se pequena quantidade de Azul-de-Metileno em pó à solução de DIETRICH a ser perfundida. Após esse procedimento, as abelhas foram dissecadas no plano sagital mediano e suas estruturas (cabeça, tórax e abdômem) foram analisadas no que concerne à presença ou não de coloração azul, para se confirmar a perfusão.

III.3.c - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA UTILIZANDO MICROSCÓPIO ESTEREOSCÓPIO

Os fundos para fotografia foram construídos utilizando-se a placa de *Petri* e parafina colorida com anilina. Outra opção é utilizar vela colorida derretida para compor o fundo utilizado nas fotografias. As cores escolhidas para a documentação foram o azul e vermelho por se tratarem de cores básicas, recomendadas em princípios de fotografia para melhores resultados na revelação. Os tecidos alvo (sistema nervoso ou sistema reprodutor) de operárias, rainhas virgens e machos, já perfundidos, foram colocados nas placas de *Petri* preparadas e procedeu-se à montagem das estruturas em sua posição anatômica, com auxílio de pinças e sondas. Para documentação de imagens em computador, foi utilizado scanner ScanMaker III da MICROTEK.

III.3.d - PADRONIZAÇÃO DE ESCALA PARA DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA E ARTÍSTICA DOS SISTEMAS NERVOSO E REPRODUTOR DE *Melipona scutellaris*

Para a padronização da escala na documentação fotográfica e artística dos sistemas nervoso e reprodutor da *M. scutellaris* foram realizadas medidas de estruturas peculiares a esses dois sistemas em Microscópio Estereoscópio Leica - Wild Typ 308700, Heerburgg, Switzerland. Cada aumento, nesse microscópio, possui uma escala de unidades oculares que pode ser convertida em milímetros (Anexo 3). Para a padronização foram utilizados 50 machos: 20 para o sistema nervoso e 30 para o sistema reprodutor; 50 rainhas virgens: 20 para o sistema nervoso e 30 para o sistema reprodutor e 40 operárias: 20 para o sistema nervoso e 20 para o sistema reprodutor. O aumento utilizado no microscópio estereoscópio, para todas as medidas na padronização de escalas, foi de 16x.

Posteriormente, realizou-se a média aritmética das medidas das estruturas, e foi feita não só a conversão para escala em milímetros, mas também o processamento da imagem (software CorelDRAW 7) com inserção da barra de escala sob a estrutura anatômica em questão. Os dados obtidos das medidas das

estruturas foram condensados na Tabela I, mas podem ser consultados separadamente no Anexo-3. No caso do sistema reprodutor de machos da *M. scutellaris*, a estrutura escolhida foi a vesícula seminal, sendo que 10 indivíduos foram dissecados, suas vesículas seminais removidas e os diâmetros dessas vesículas medidos. No sistema reprodutor de rainhas virgens foi utilizada a espermateca, sendo que 10 indivíduos foram dissecados, as espermatecas removidas e seus diâmetros medidos. Já no sistema reprodutor de operária, mediu-se o comprimento do ovário atrofiado. Com relação ao sistema nervoso das três categorias de indivíduos foi medida a largura do cérebro, ou seja, a distância da extremidade do lóbulo óptico direito até a extremidade do lóbulo óptico esquerdo. Os dados referentes às medidas dos cérebros para operárias, rainhas e machos foram submetidos a tratamento estatístico adequado (Teste F e Teste de Tukey) com utilização do programa SANEST (Sistema de Análise Estatística do SEAGRO – Faculdade de Engenharia Agrícola – UNICAMP, Autores: Elio Paulo Zonta e Amauri Almeida Machado).

IV
RESULTADOS
E
DISCUSSÃO

Neste trabalho, optou-se pela captura dos indivíduos conforme suas funções na colônia ou seus atos comportamentais, de modo a garantir uma amostra da mesma faixa etária. Assim sendo, foram coletadas somente operárias campeiras, machos sexualmente maduros com comportamento de espera da rainha nas proximidades da entrada da colônia e rainhas virgens recém expulsas de suas colônias.

Operárias, rainhas virgens e machos da *M. scutellaris* foram perfundidos com solução Dietrich, e as estruturas internas que pertencem aos seus sistemas nervoso e reprodutor, dissecadas, sendo mantida sua integridade. Posteriormente, essas estruturas foram montadas em superfície de parafina colorida para serem documentadas por meio de fotografia em microscópio estereoscópio. Em seguida, as imagens da documentação anatômica (figuras 7 e 8) foram digitalizadas e processadas em computador com utilização de software específico para tratamento de imagens. Os dados morfométricos (Tab. 1) das estruturas que compõem os sistemas estudados possibilitaram a elaboração da barra de escala presente nessas imagens e, também, foram importantes para a análise estatística presente nas Tabelas 2 e 3. A dissecação de insetos com utilização de instrumental adequado e o estudo anatômico e morfométrico, constituem ferramentas muito importantes para o conhecimento deles. A identificação das partes dos sistemas anatômicos em estudo pode gerar comparações inter e intra-específicas, estudos de filogenia e evolução, neurobiologia, fisiologia e biologia reprodutiva. O uso de Dietrich combinado com corantes (por exemplo, o Azul-de-Metileno) possibilita o armazenamento das estruturas anatômicas internas do sistema nervoso e/ou reprodutor, ou de qualquer outro tipo de estrutura interna para fins didáticos.

O sistema reprodutor dos machos da *M. scutellaris* se apresenta bastante diferente quando comparado com a morfologia dos zangões de *Apis*. As principais diferenças entre o sistema reprodutor da *M. scutellaris* e da *Apis* são: o aparelho genital do macho da *M. scutellaris* é relativamente simples e suas estruturas (testículo, ducto deferente, vesículas seminais e pênis) são de fácil

reconhecimento e dissecação (fig. 7C), ao contrário do aparelho genital do zangão na *Apis* (fig. 2); não há glândulas acessórias de muco no sistema reprodutor dos machos; o sêmen possui coloração branca, tendo composição leitosa, ao contrário do sêmen de *Apis* que possui coloração marrom claro; operárias e rainhas da *M. scutellaris* não possuem glândulas produtoras de veneno e nem estruturas destinadas ao armazenamento do mesmo, têm o aparelho ferroador atrofiado e não há presença da *Bursa Copulatrix* ou bolsa copulatória presente na *Apis*.

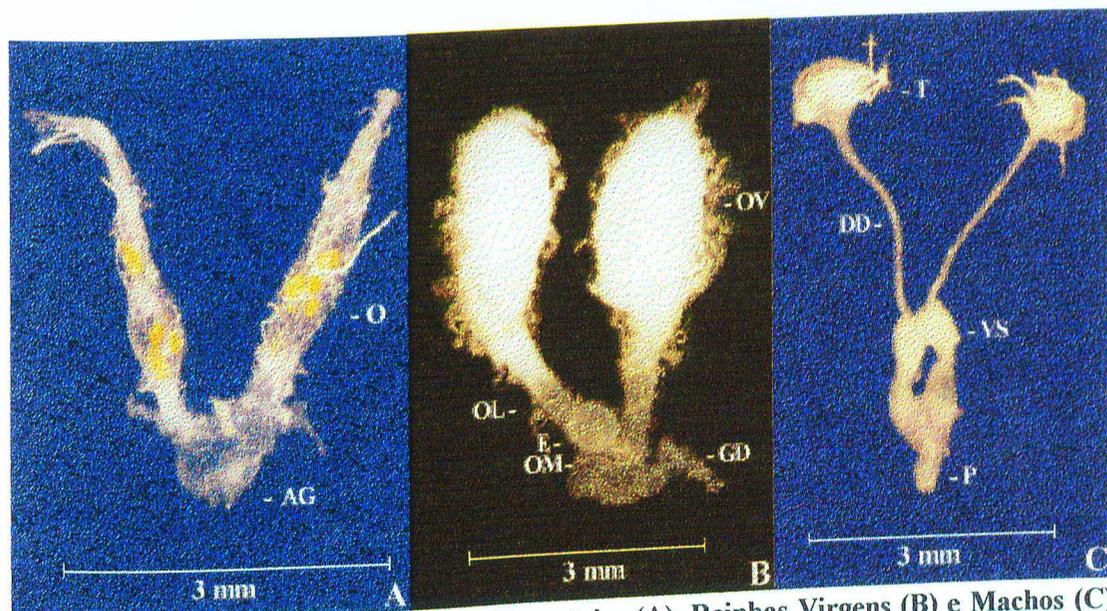


FIGURA 7: Sistemas reprodutores das Operárias (A), Rainhas Virgens (B) e Machos (C) da *Melipona scutellaris*. Os sistemas reprodutores completos foram dissecados com auxílio de instrumental adequado e documentados por meio de fotografia em microscópio estereoscópico e as imagens processadas em software apropriado para digitalização. O – Ovário de operária; AG – Abertura Genital; OV – Ovário de rainha virgem; OL – Oviduto Lateral; E – Espermateca; OM – Oviduto Médio; GD – Glândula Alcalina ou de Dufour; T – Testículo; DD – Duto Deferente; VS – Vesícula Seminal; P – Pênis

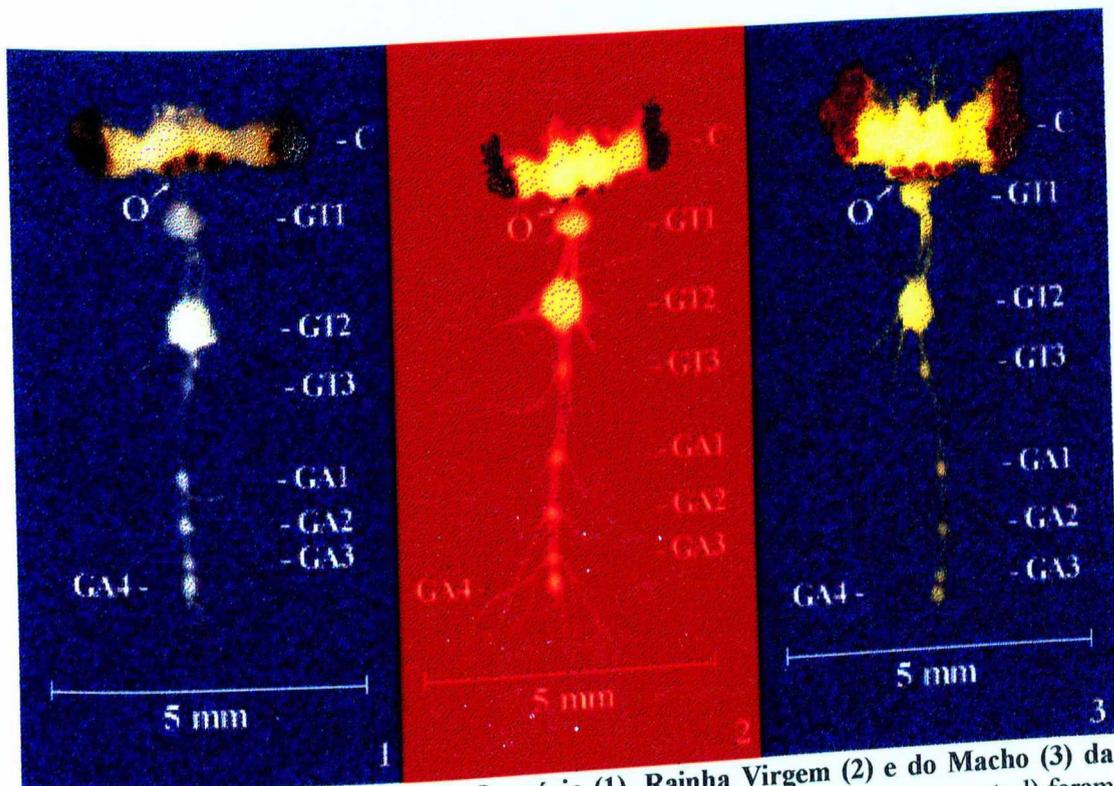


FIGURA 8 - Sistemas Nervosos da Operária (1), Rainha Virgem (2) e do Macho (3) da *Melipona scutellaris*. Os sistemas nervosos completos (cérebro e cordão nervoso ventral) foram dissecados com auxílio de instrumental adequado e documentados por meio de fotografia em microscópio estereoscópico e as imagens processadas em software apropriado para digitalização. C - cérebro; O - ocelo; GT1 - gânglio torácico 1; GT2 - gânglio torácico 2; GT3 - gânglio torácico 3; GA1 - gânglio abdominal 1; GA2 - gânglio abdominal 2; GA3 - gânglio abdominal 3; GA4 - gânglio abdominal 4.

TABELA 1 - Dados morfométricos das estruturas anatômicas referentes aos sistemas reprodutor e nervoso da *Melipona scutellaris*. O aumento no microscópio estereoscópico para essas medidas foi 16x (consultar dados originais e tabela de conversão para escala em milímetros no Anexo 3). O tamanho das amostras é mostrado à direita, dentro dos parênteses.

	OPERÁRIA	RAINHA VIRGEM	MACHO
SISTEMA REPRODUTOR	comprimento do ovário (mm) 3.28 ± 0.6 (20)	diâmetro da espermateca (mm) 0.68 ± 0.07 (30)	diâmetro da vesícula seminal (mm) 0.40 ± 0.1 (30)
SISTEMA NERVOSO	largura do cérebro (mm) 4.03 ± 0.2 (20)	largura do cérebro (mm) 3.19 ± 0.17 (20)	largura do cérebro (mm) 3.53 ± 0.22 (20)

TABELA 2 - Quadro de análise de variância referente as medidas das larguras dos cérebros das operárias, rainhas e dos machos da *Melipona scutellaris*.
 Média Geral = 5.858334 Coeficiente de Variação = 3.485 %

Causas da variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Prob.> F
Cérebro	2	17.8093345	8.9046673	213.5771	0.00001
Resíduo	57	2.3764999	0.0416930		
Total	59				

TABELA 3 - Teste de Tukey para médias das larguras dos cérebros das operárias, rainhas e dos machos de *Melipona scutellaris*.

D.M.S. 5% = 0.15551 - D.M.S. 1% = 0.19603

D.M.S. 5% = 0.15551

Num. Ordem	Num. Trat.	Nome	Num. Repet.	Médias	Médias Originais	5%	1%
1	1	Operária	20	6.555000	6.555000	a	A
2	3	Macho	20	5.795000	5.795000	b	B
3	2	Rainha	20	5.225000	5.225000	c	C

Essas diferenças anatômicas dos aparelhos genitais trazem implicações muito importantes, como por exemplo, para uma tentativa de inseminação instrumental na *M. scutellaris*. Isso porque a coleta de sêmen exigiria uma metodologia diferente daquela descrita por CAMARGO (1972), para o gênero *Apis*. O sistema reprodutor da *M. scutellaris* não exige cuidados com o muco diante da ausência de glândulas responsáveis por sua produção; portanto, para a coleta de sêmen, sugere-se a remoção das vesículas seminais e sua dissecação deve ser feita em um ambiente que contenha água de coco estéril ou estreptomicina. Além disso, dissecações em rainhas virgens demonstram a ausência de válvula copulatrix que ocorre em rainhas virgens da *Apis*, essa ausência pode facilitar a técnica de inseminação instrumental para a *M. scutellaris*. Na morfometria das vesículas seminais foi observado que, num mesmo indivíduo, essas vesículas apresentavam diâmetros diferentes, indicando volumes distintos de sêmen. Isso pode estar relacionado com a migração desigual de espermatozóides para as vesículas seminais ou, também, com a produção

desigual do líquido de manutenção e suspensão dos espermatozoides nas vesículas seminais ou relacionado a ambos os eventos.

Não há diferenças significativas no que se refere à disposição das partes componentes do sistema nervoso da *M. scutellaris*, quando comparado com as estruturas básicas do gênero *Apis*. Esse sistema se caracteriza pela presença do cérebro e o cordão nervoso ventral, que é formado apenas por quatro gânglios abdominais (Fig. 8), sendo que o último se localiza entre o terceiro e quarto segmento, enquanto que na *Apis* são cinco os gânglios abdominais e o último localiza-se no sexto segmento.

Com relação ao comprimento dos cérebros da *M. scutellaris* verificou-se diferença estatística significativa entre os indivíduos: o maior cérebro é o da operária, que tem um comprimento médio aproximado de 4 mm (+/- 0.2), seguido do macho com 4.5 mm (+/- 0.17) e, por último, o da rainha com 3.2 mm (+/- 0.22). As médias seguidas por letras distintas (a, b e c), (Tab. 3) diferem entre si, considerando o nível de significância indicado.

ROBINSON *et al.* (1997), numa revisão sobre insetos sociais e a biologia molecular do comportamento social, relacionam a plasticidade cerebral com o desenvolvimento comportamental das abelhas melíferas. Segundo esse autor e seus colaboradores, os corpos em forma de cogumelo das rainhas da *Apis*, seus colaboradores, exibem um padrão de mudança estrutural comparável àqueles vistos para operárias mas, ao contrário destas, as rainhas nunca forrageiam. No entanto as rainhas voam do ninho para acasalar-se. Essas observações sugerem que a plasticidade dos corpos em forma de cogumelo está associada com a aprendizagem do local da colônia em relação a outros pontos. As operárias retornam às suas colônias a cada carregamento de néctar ou pólen enquanto as rainhas retornam após vôo nupcial; ambas as castas realizam uma série de vôos prévios, no início do forrageamento ou do acasalamento, respectivamente. Machos da *Apis* (zangões) são geneticamente menos similares a operárias do que são as rainhas, mas também têm que aprender a localização da colmeia para que retornem a ela, após o vôo nupcial. Os autores completam o estudo, levantando a

hipótese de que, em relação às operárias, a plasticidade de seus corpos em forma de cogumelo contribuiria para uma mudança de função na colônia para o início da atividade de forrageamento; sem essa plasticidade, isso nunca aconteceria.

Diferentemente do gênero *Apis*, os machos dos meliponídeos exibem uma série de funções dentro e fora da colônia, além de serem muito mais parecidos fenotipicamente com as operárias do que com as rainhas. Vários trabalhos, que utilizam caracteres morfológicos externos, têm sido feitos para testar essa hipótese de maior semelhança entre machos e operárias, (para revisão, consultar KERR *et al*, 1978). Machos de meliponídeos passam o primeiro terço de sua vida cuidando das larvas, produzindo e manipulando cera, (KERR, 1987 *apud* KERR, 1990) e realizando trofalaxis (ENGELS & ENGELS, 1988 *apud* KERR, 1990). Além disso, desidratam néctar dentro da colônia, FONSECA, 1973, e fora da colônia (observações pessoais de KERR com a *Melipona scutellaris* e a *Melipona rufiventris*). Provavelmente, isto estaria relacionado à sua redução de peso para o momento do vôo de cópula com a rainha, ou para a coleta de alimento. No que se refere a rainha, ela realiza praticamente um único vôo em sua vida, o chamado vôo nupcial, no qual ela se acasala, é fecundada e retorna à colônia.

Os dados morfométricos dos cérebros para os indivíduos da *M. scutellaris* podem estar relacionados com as observações de ROBINSON e seus colaboradores (1997), uma vez que, se os corpos em forma de cogumelo constituem o centro da memória e aprendizagem das abelhas, essa diferença de tamanho dos cérebros poderia estar ligada à quantidade e qualidade das atividades sensoriais na exploração do ambiente. A operária, por desempenhar uma série de funções ao longo de sua vida média na exploração do ambiente, apresentaria um maior volume cerebral. Em seguida, viria o macho, que também realiza diferentes funções e, por último, a rainha, com função restrita a reprodução.

A diferença apresentada nos dados densitométricos para a imudeteção da Miosina-V, reforça essa hipótese sugerindo uma maior semelhança dos cérebros

da operária e do macho quanto à expressão dessa proteína, tão importante no transporte de vesículas e organelas e possivelmente envolvida com a decodificação dos sinais de transdução.

O tampão de homogeneização utilizado por CHENEY *et al.*, 1993, e adaptado para este trabalho, foi eficiente para a extração da Miosina-V, que é solubilizada na presença de ATP. A principal adaptação ao tampão de homogeneização descrito por CHENEY foi a utilização de PMSF como inibidor, enquanto o tampão descrito por aquele autor utilizou Perfablo. Os anticorpos produzidos contra domínio específico motor da Miosina-V de *Gallus gallus*, possibilitou a imunodeteção da Miosina-V nos tecidos analisados das abelhas, pois anticorpos gerados contra Miosina-V de aves reconhecem o mesmo epítipo na Miosina-V de abelha. O anticorpo policlonal utilizado para imunodeteção de CLD também foi eficiente em detectar essa proteína em abelha. Portanto, juntamente com os anticorpos contra domínio motor, esses anticorpos contra CLD foram as principais ferramentas que possibilitaram a execução da parte bioquímica deste trabalho. Esse reconhecimento de domínios específicos da Miosina-V por anticorpos produzidos em outros filós demonstra uma característica citada por TITUS (1993) quando se refere à molécula da Miosina-V, como um exemplo de convergência evolutiva harmônica, ou seja, essa proteína se mantém conservada de levedura até vertebrados, passando por filós intermediários como os Artrópodes.

O perfil eletroforético de proteínas totais dos cérebros da *M. scutellaris* (fig. 9A) mostra bandas bem definidas, para uma mesma concentração de tecido (5.5 µg/µL), no homogeneizado, no sobrenadante e no sedimento.

Já o imunoblot para detecção da Miosina-V em cérebro (fig. 9B) foi capaz de captar um sinal mais forte para as amostras de sobrenadante e sedimento de macho e operária do que o sinal apresentado para as mesmas amostras na rainha. Isso pode ser melhor visualizado no gráfico 1 que mostra a análise densitométrica das amostras de cérebro. A análise densitométrica sugere a existência de uma possível expressão diferencial dessa proteína entre esses

indivíduos. Entretanto, para um estudo mais profundo faz-se necessário o uso de experimentos controlados, com coleta de indivíduos na mesma faixa etária a fim de se comprovar tal hipótese.

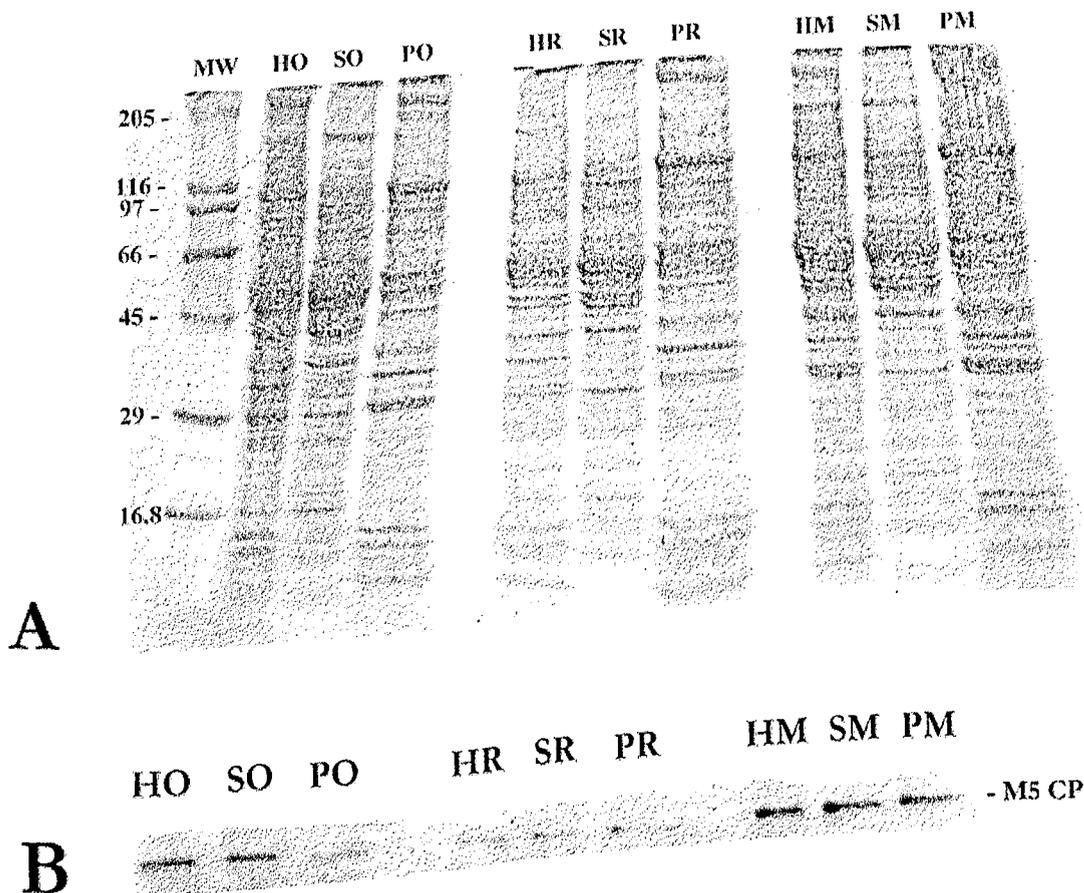


FIGURA 9 - Perfil eletroforético (A) e Imunoblot para Miosina-V (B) das amostras de rainhas (R) e dos machos (M) da *Melipona scutellaris* Lat. Dez cérebros de operárias, rainhas virgens e machos foram dissecados e homogeneizados em 500 μ L de tampão de extração. O homogeneizado foi centrifugado a 40000xg por 40 minutos e as amostras de H, S e P contendo 5.5 μ g de proteína/ μ L foram separadas em gel de poliacrilamida com SDS e transferidos eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose (blot). A membrana foi sondada com anticorpo anti domínio cabeça da Miosina-V (diluição 1:1000 e concentração de 0,2 μ g/ μ L).

Análise Densitométrica de Imunoblot de Miosina-V detectada nos Cérebros de *Melipona scutellaris*

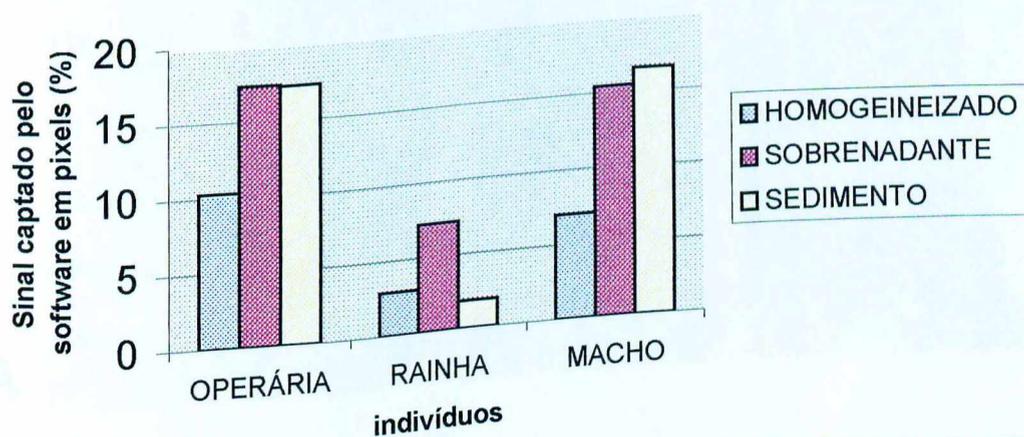


GRÁFICO 1 – Análise densitométrica do sinal apresentado pela imunodeteção da Miosina-V em cérebros de *Melipona scutellaris* por meio da técnica de Western Blot. A imagem do sinal ou marcação apresentada pela imunodeteção da Miosina-V foi digitalizada e realizou-se quantificação dos pixels (%) das bandas referentes as amostras de operária (O), rainha (R) e macho (M).

A **fig. 10A** mostra o perfil eletroforético dos sistemas nervosos completos, ou seja, cérebro e cordão nervoso ventral. A distinção das bandas é perfeita para as amostras de homogeneizado, sobrenadante e sedimento para uma mesma concentração de proteína ($13.87\mu\text{g}/\mu\text{L}$). O imunoblot para cadeia leve de dineína (CLD) demonstra eficiência do tampão de extração dessa proteína que permanece, em quase sua totalidade, no sobrenadante.

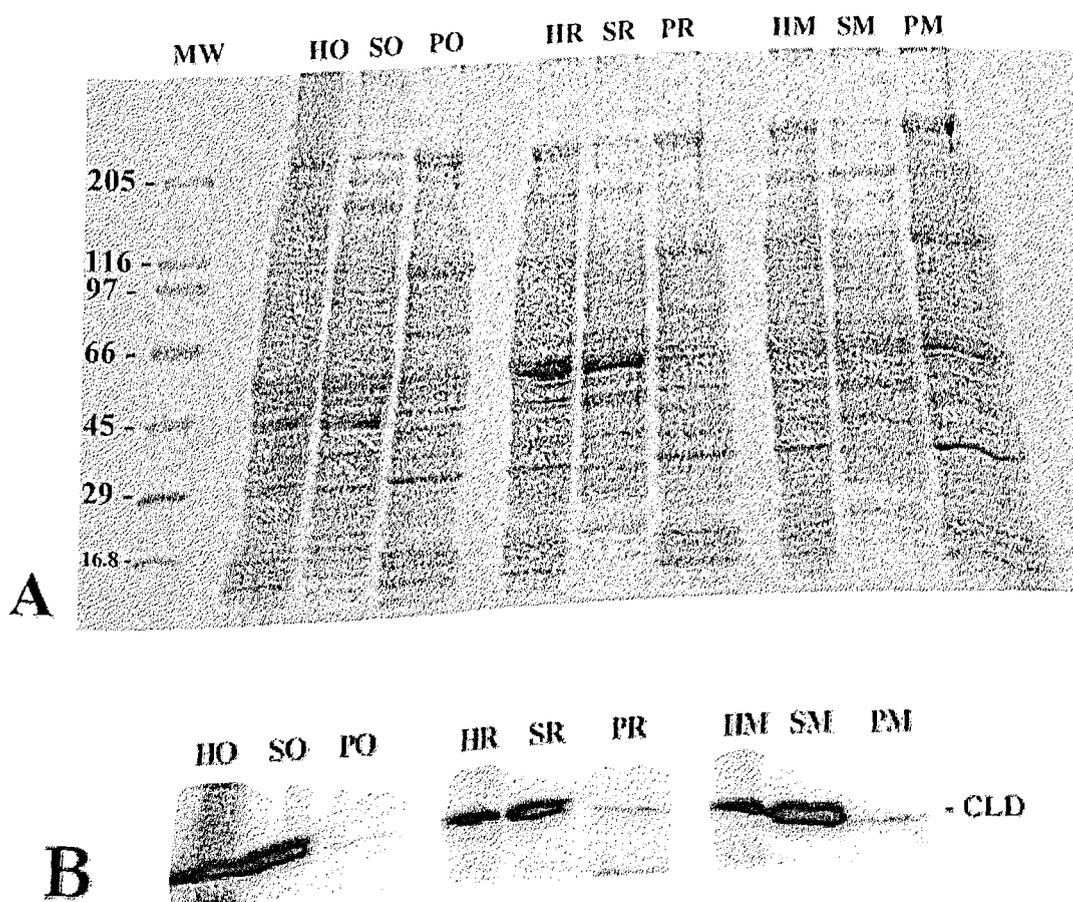


FIGURA 10 – Perfil eletroforético (A) e Imunoblot de Cadeia Leve de Dineína (B) com amostras de homogeneizado (H), sobrenadante (S) e sedimento (P) dos sistemas nervosos das operárias (O), rainhas virgens (R) e dos machos (M) da *Melipona scutellaris* Lat. Dez sistemas nervosos de operárias, rainhas virgens e machos foram dissecados e homogeneizados em 500 μL de tampão de extração como descrito na metodologia. Amostras de homogeneizado (H), sobrenadante (S) e pellet (P) contendo $13.87\mu\text{g}$ de proteínas/ μL foram separadas em gel de poliácridamida e transferidos eletroforéticamente para membrana de PVDF (0.2, blot). A membrana foi sondada com anticorpo anti - cadeia leve de dineína (CLD).

A **fig. 11A** mostra o perfil eletroforético do extrato de proteínas totais de ovários de rainhas para uma mesma concentração ($2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). A imunodeteccção da Miosina-V nas amostras de sobrenadante e sedimento dos ovários de rainhas virgens está disponível na **fig. 11B**. O sinal apresentado no imunoblot se mostra fraco em função do ajuste de brilho e do contraste realizados na imagem e, também, devido ao *background* presente no filme após a etapa de revelação por quimioluminescência. Esse dado é bastante importante, porque demonstra a presença da Miosina-V em tecido de natureza não-nervosa. LIMA (2000) também obteve identificação dessa proteína em diferentes tecidos de natureza nervosa (cérebro, cerebelo) e/ou não-nervosa (átrio, ventrículo, testículo e ovário) de *Calomys callosus*.

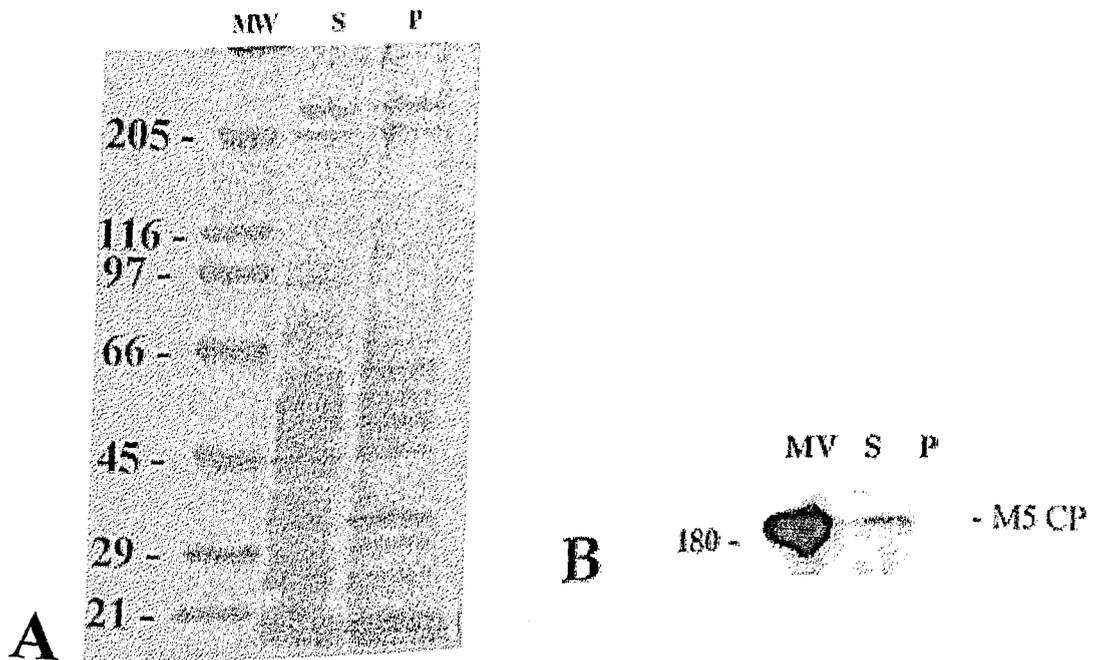


FIGURA 11: Imunodeteccção da Miosina-V no extrato total dos ovários das rainhas da *Melipona scutellaris*. Dez ovários de cinco rainhas virgens foram dissecados e homogeneizados em tampão de extração. Amostras de sobrenadante (S) e sedimento (P) contendo aproximadamente $2 \mu\text{g}$ de proteína foram separadas em eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidos eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose (blot). A membrana foi sondada com anticorpo anti - cabeça da Miosina-V. Uma amostra da Miosina-V purificada de cérebro de pintainho foi usada como controle (MV).

MW - Indica padrão de massa molecular relativa ($\text{Mr} \times 10^{-3}$)

MV hc - indica a banda da cadeia pesada de miosina V reconhecida pelo anticorpo no ovário.

A imunodeteccção da Miosina-V em sistema reprodutor da *M. scutellaris* pode estar relacionada com a secreção dos hormônios presentes nesse tecido, ou mesmo com o próprio armazenamento de gordura em regiões específicas. Ressalta-se, novamente, o trabalho de MacIVER *et al.* (1998), demonstrando que em *Drosophila melanogaster*, a expressão da Miosina-V é predominante na linhagem germinativa e em embriões precoces e, o transcrito do gene *didum*, responsável pela produção dessa proteína, foi localizado no oócito durante a oogênese. Experimentos genéticos e hibridização *in situ* foram fundamentais para a localização do transcrito no ovário de *D. melanogaster* durante estágios precoces, até estágios tardios de desenvolvimento e, também, foram importantes na localização desse gene na região 43C. Esses autores, também, tiveram evidências de traços de mutação nesta região, com um fenótipo embrionário letal. Ensaio dessa natureza podem ser conduzidos para investigar, futuramente, o papel da Miosina-V e até mesmo de outras miosinas não convencionais em tecidos reprodutores da *M. scutellaris*.

O perfil eletroforético para sistema reprodutor (fig. 12A) não apresentou uma distinção perfeita das bandas, que foi mais crítica nas amostras de sobrenadante de operária, bem como no sobrenadante e sedimento de macho. Nessa eletroforese, a concentração também foi a mesma para todas as amostras aplicadas (10µg/µL). Essa não distinção das bandas, provavelmente esteja relacionada com algum erro no processo de dosagem, homogeneização ou mesmo no momento de aplicação das amostras nos poços do gel, podendo não ter ocorrido solubilização homogênea das amostras, embora isso não tenha comprometido a imunodeteccção de CLD nesses tecidos (fig. 12B).

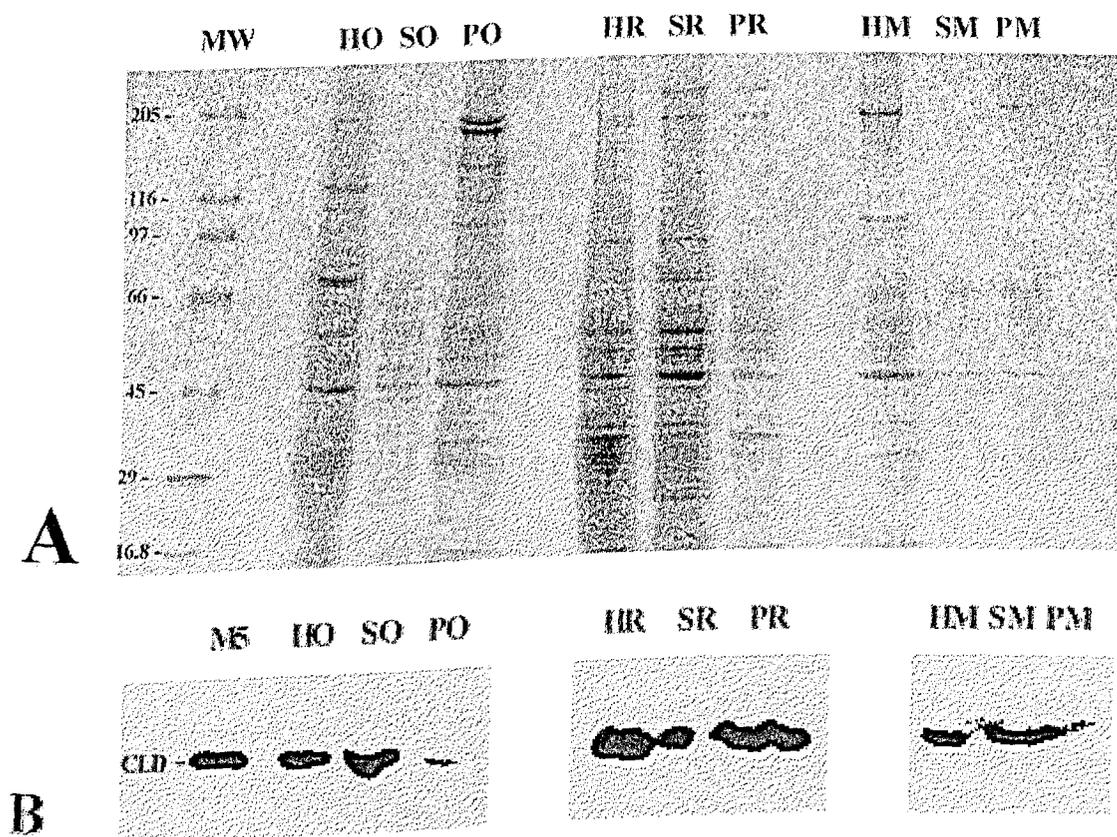


FIGURA 12 - Perfil eletroforético (A) e Imunoblot (B) com amostras de homogeneizado (H), sobrenadante (S) e sedimento (P) de sistema reprodutor das operárias (O), rainhas virgens (R) e dos machos (M) de *Melipona scutellaris* Lat.
 Dez sistemas reprodutores de operárias, rainhas virgens e machos foram dissecados e homogeneizados em 300 μ L de tampão de extração. O homogeneizado foi centrifugado a 40000xg por 40 minutos e as amostras de H, S e P contendo aproximadamente 10 μ g de proteínas/ μ L foram separadas em gel de poliacrilamida com SDS e transferidos para membrana de PVDF (blot). A membrana foi sondada com anticorpo eletroforético para cadeia leve de dineína (CLD). Uma amostra da Miosina-V purificada de cérebro de pintainho foi usada como controle (MV).

A identificação da Miosina-V em sistema nervoso de abelha é um indicativo de que essa proteína pode funcionar como um marcador molecular neuronal ligado à atividade sensorial desses animais. Esses dados abrem outra série de perspectivas para estudos futuros que tentem investigar o papel da Miosina-V no sistema nervoso de abelhas. Ensaios de motilidade, cultura de neurônios, co-sedimentação da Miosina-V, imunohistoquímica, seqüenciamento e expressão da Miosina-V e mutação dirigida constituem alguns exemplos de experimentos futuros que podem ser executados a partir dos dados contidos neste trabalho. Os himenópteros sociais, de modo geral, oferecem uma rica fonte de investigação acerca dos fatores comportamentais e/ou moleculares que garantem o sucesso da eussociabilidade.

COSTA (1998) demonstrou por meio de ensaios de imunoprecipitação e “overlay” em nitrocelulose, a associação física entre a Miosina-V de cérebro de pintainho (BM-V de *Gallus gallus*) e a proteína quinase II (CaMKII). A CaMKII é uma serina/treonina quinase, multifuncional, abundante em células nervosas e envolvida em vários processos, como síntese e liberação de neurotransmissores, regulação de canais iônicos e potenciação de longo prazo (LTP). Essa quinase apresenta a propriedade de autofosforilação, sendo estritamente dependente de Ca^{2+} /calmodulina. Esses resultados permitiram sugerir que a ativação dessa quinase é realizada pela própria cadeia leve do substrato, neste caso a BM-V. Esse mecanismo funcionaria como potencialização de resposta ao íon cálcio para a CaMKII e a BM-V, uma vez que este íon funciona como importante sinalizador de processos neuronais. Dados preliminares em nosso laboratório indicam imunodeteção preferencial da Miosina-V no lóbulo óptico da *M. scutellaris*, mas o papel dessa proteína nessa região específica do cérebro continua obscuro. Portanto, outro campo de investigação sugerido seria: uma investigação mais profunda acerca da possível interação de calmodulina, como substrato para a ativação da CaMKII e conseqüente efetivação de um sinal de transdução nos processos de memória e aprendizado dos himenópteros sociais.

A cadeia leve de dineína (CLD) foi imunodetectada nos sistemas nervoso e reprodutor. Isso pode estar relacionado com a ocorrência dessa proteína em associação com a cadeia leve da Miosina-V; ou então relacionado com sua presença na forma de dineína citoplasmática. Em *Aspergillus*, o mutante para CLD, **nudG8**, é uma fenocópia de uma dineína mutante de cadeia pesada, sugerindo que um papel para essa proteína nesse organismo poderia ser mediado através de sua interação com dineína, BECKWITH *et al*, 1998. Ensaios de co-sedimentação com F-actina poderiam ser conduzidos para confirmação de que a CLD imunoidentificada nos sistemas nervoso e reprodutor corresponderia à cadeia leve de dineína associada à Miosina-V.

V
CONCLUSÕES

Diante do exposto conclui-se que:

- 1 – Anticorpos produzidos contra o domínio específico motor da Miosina-V de cérebro de pintainho (*Gallus gallus*) podem ser utilizados em estudos de imunodeteção dessa proteína em invertebrados, como a abelha em questão, confirmando o aspecto de conservação evolutiva dessa molécula.
- 2 – A Miosina-V está presente em sistemas nervoso (cérebros de operárias, rainhas virgens e machos) e em sistema reprodutor (ovário de rainha virgem) da *M. scutellaris*, abrindo uma série de perspectivas para estudos futuros acerca da estrutura e função dessa proteína.
- 3 – A diferença no sinal da imunodeteção da Miosina-V, apresentada no Immunoblot e comprovada por dados densitométricos para cérebro da *M. scutellaris*, pode estar relacionada com possível expressão diferencial dessa proteína nas castas e no macho.
- 4 – A cadeia leve de dineína (CLD) associada à Miosina-V, também está presente em sistema nervoso e reprodutor da *M. scutellaris*.
- 5 – A técnica de perfusão de insetos sociais padronizada constitui importante ferramenta para obtenção de tecidos fixados em estudos de anatomia interna, morfometria, citologia e histologia, imunolocalização e imunocitoquímica.
- 6 – A anatomia e a morfologia do sistema reprodutor da *M. scutellaris* apresentam diferenças significativas, enquanto que o seu sistema nervoso não apresenta diferenças consideráveis quando comparados com a literatura disponível para o gênero *Apis*.

VI
RESUMO

Miosinas da classe V são proteínas motoras conservadas, evolutivamente, de leveduras a vertebrados e que pertencem a uma superfamília, composta por 15 classes. Essas proteínas possuem a particularidade de interagirem com Actina e hidrolizarem ATP para desempenharem suas funções. Miosinas, assim como cinesinas e dineínas, são motores moleculares responsáveis pelo transporte de organelas e vesículas ao longo de filamentos de actina e microtúbulos presentes no citoesqueleto. As mutações encontradas em *Saccharomyces cerevisiae* e *Mus musculus* revelaram a função da Miosina-V no transporte intracelular. Essa proteína é expressa em diversos tipos de células, sendo especialmente abundante em células nervosas (neurônios). Em insetos, o gene da Miosina-V foi sequenciado em *Drosophila melanogaster* e mutações nesse gene podem causar letalidade embrionária. Neste trabalho, utilizou-se a técnica de Western Blot e Imunodeteção com anticorpos imunopurificados contra domínios específicos da Miosina-V e também contra a cadeia leve de dineína, uma proteína associada a Miosina-V, para investigar a presença dessas proteínas no sistema nervoso e reprodutor de uma espécie de abelha brasileira indígena sem ferrão, conhecida popularmente como Uruçu do Nordeste (*Melipona scutellaris* Latreille). Os resultados obtidos foram comparados entre indivíduos das castas de operária e rainha e, também, no macho. Na segunda parte deste trabalho, realizou-se um estudo anatômico morfométrico das estruturas pertencentes aos tecidos mencionados acima. Os resultados foram documentados por meio de fotografia e processamento digital de imagem e, posteriormente, comparados intra espécie e, também, com os dados disponíveis em literatura para o gênero *Apis*. Com os ensaios de imunodeteção foi possível constatar a presença da Miosina-V em cérebros de operárias, rainhas virgens e machos. A Miosina-V foi detectada também em sistema reprodutor (ovários de rainhas virgens), mostrando que sua presença não se restringe aos tecidos de natureza não nervosa. Além disso, as cadeias leves de dineína associadas à Miosina-V também foram imunodetectadas em sistemas reprodutor e nervoso. Pesquisas como esta abrem uma série de perspectivas sobre a presença, papel e importância desse motor molecular - Miosina-V - contribuindo para o desenvolvimento de áreas como a bioquímica, a genética e a zoologia, bem como, possibilitam a divulgação da *M. scutellaris* (como novo modelo de estudos de neurobiologia) - espécie em risco de extinção, devido a ação antrópica nas diferentes comunidades vegetais.

VII

SUMMARY

Class V myosins are motor proteins that have been described from yeasts to vertebrates. Myosins, as well as kinesins and dyneins, are molecular motors responsible for the transport of organelles and vesicles along actin microfilaments and microtubules. The Myosin-V is a protein expressed in several types of cells, being especially abundant in neurons. In this study, *Melipona scutellaris* Latreille (Northeastern Uruçu), which is a type of Brazilian indigenous stingless bee in risk of extinction due to predatory action and devastation of forest areas, has been chosen. Stingless bees are responsible for the pollination of 30 to 90% of tropical areas. The objective of this study was investigate the presence of Myosin-V and dynein light chain (DLC) in nervous and reproductive systems by means of Western Blot using polyclonal antibodies immunopurified against specific domains of the Myosin-V. The tissues dissected by means of appropriate instruments were homogenized in buffer containing ATP and protease inhibitors and later on centrifuged at 40.000xG, obtaining soluble and particulate fractions. The proteins were then separated through electrophoresis in polyacrylamide denature gel and transferred to nitrocellulose membrane for survey with the antibodies by chemiluminescence reaction. The Myosin-V of *M. scutellaris* was identified by the antibodies obtained against the vertebrate Myosin-V (*Gallus gallus*) in the analyzed tissues. Another objective of this study was make an anatomic study of the nervous and reproductive system of males, virgin queens and workers of *M. scutellaris*. The anatomy and the morphology of the reproductive system of the *M. scutellaris* have presented significant differences, whereas its nervous system has not presented considerable differences when compared with the available literature on *Apis mellifera*.

VIII
BIBLIOGRAFIA

- BAKER, J. P. & TITUS, M. A. - 1998. Myosin: matching functions with motors. *Curr. Op. Cell Biol.*, **10**: 80-86.
- BECKWITH, S. M.; ROGHI, C. H., LIU, B. & MORRIS, R. N. - 1998. The "8-kD" Cytoplasmic Dynein Light Chain Is Required for Nuclear Migration and for Dynein Heavy Chain Localization in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol.* **143**, 1239-47.
- BEMENT, W. M.; HASSON, T.; WIRTH J. A.; CHENEY, R.E. & MOOSEKER, M. S. - 1994. Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosins in vertebrate cell types. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6549-53
- BENASHSKI, S. E.; HARRISON, A.; KING-PATEL, R. S. & KING, S.M. - 1997. Dimerization of the highly light chain shared by dynein and Myosin V. *J. Biol. Chemistry*, **272**, (33): 20929-20935.
- BRADFORD, M. M. - 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- BONAFE, N.; SELLERS, J.R. - 1997. Characterization of myosin V from *Drosophila melanogaster*. *J. Muscle Res. Cell Motil*, **19**: 129-141.
- CARVALHO, G. A.; KERR, W. E.; NASCIMENTO, V. A. - 1994. Sex Determination in Bees. XXXIII. Decrease of xo heteroalleles in a finite population of *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *Rev. Brasil. Genet.* **18**(1):13-16.
- CARVALHO, G. A. - 1996. Monitoramento dos Alelos Sexuais Xo em uma População Finita de *Melipona scutellaris* (APIDAE, MELIPONINI). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 52 p. (Tese de Mestrado).
- CAMARGO, J. M. F.; KERR, W. E.; LOPES, C. R. - 1967. *Papéis Avulsos de Zoologia*, São Paulo, **20**, art.20, 229-258.
- CAMARGO, J. M. F. - 1972. *Manual de Apicultura*, São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 59-96.
- CHENEY, R. E. & MOOSEKER, M.S. - 1992. Unconventional Myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 27-35.
- CHENEY, R. E.; O'SHEA, M. K.; HEUSER, J. E. - 1993. Brain Myosin V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* **75**, 13-23.

- CHENEY, R. E. - 1998. Purification and Assay of Myosin V. *Methods in Enzymology*, vol. 298, 3-18.
- COELHO, M. V. & LARSON, R. E. - 1993. Ca²⁺-dependent phosphorylation of the tail domain of myosin V, a calmodulin-binding myosin in vertebrate brain. *Brasilian J. Med. Biol. Res.* 26: 465-472.
- COLETTI, A. C. & KERR, W. E. - 1996. Considerações sobre comunicação entre operárias de *Melipona scutellaris* Latreille. *Revista Brasileira de Genética*, vol. 19, número 3, painel A-375, pág. 187.
- COSTA, M. C. R. - 1998. Caracterização estrutural e funcional da associação física entre a Miosina-V de cérebro e a proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 78 p. - (Tese de Mestrado).
- DEAG, J. M. - 1981. *O Comportamento Social dos Animais*. Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ENGLE, L. J. & KENNETT, R. H. - 1994. Cloning, analysis and chromosomal localization of myoxin (MYH12), the human homolog to the mouse dilute gene. *Genomics*, 19:407-16.
- ENGELS, E. & ENGELS, W. - 1988. Age-dependent queen attractiveness for drones and mating in the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *J. Apic. Research*. 27:3-8.
- ESPINDOLA, F.S.; ESPREAFICO, E.; COELHO, M.V.; MARTINS, A.R.; COSTA, F.R.C.; MOOSEKER, M. S. & LARSON, R. E. - 1992. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin binding myosin. *J. Cell Biol.* 118:359-68
- ESPINDOLA, F. S.; SUTER, D. M.; LIN, C-H & MOOSEKER, M. S. - 1996. Characterization of Unconventional myosins V and VI in Neurons. *Molecular Biology of the Cell*, (supplement) 7: 372a.
- ESPINDOLA, F.S.; CHENEY, R.E.; KING, S.M.; SUTER, D.M. & MOOSEKER, M.S. - 1996. Myosin-V and dynein share a similar light chain. *Molecular Biology of the Cell* (supplement) v7:372a
- ESPINDOLA, F. S.; SUTER, D. M.; PARTATA, L. B. E.; CHENEY, R.E.; KING, S. M. & MOOSEKER, M. S. - 2000. The Light Chain Composition of Chick Brain Myosin-Va: Calmodulin, Myosin-II Essential Light Chains, and 8 kDa Dynein Light Chain/PIN.

- ESPREADICO, E.M.; CHENEY, R. E.; MATTEOLI, M.; NASCIMENTO, A. A.C. & CAMILLI, P. V. - 1992. Primary structure and cellular location of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.*, 119: 1541-58.
- EVANS, H. E. - 1984. The Nervous System (chapter 6) in *Insect Biology*. 141-171, Colorado State University.
- EVANS, L. L.; HAMMER, J. & BRIGMAN, P. C. - 1997. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal neurons. *J. Cell Science* 110,439-449.
- EVANS, L. L.; LEE, A. J.; BRIGMAN, P. C. & MOOSEKER, M. S. - 1998. Vesicle-associated brain myosin-v can be activated to catalyze actin-base transport. *J. Cell. Sci.*, 111:2055-2066.
- FONSECA, V. - 1973. Miscellaneous observations on the behavior of *Schwarziana quadripunctata* (Hym., Apidae, Meliponinae). *Biol. Zool. e Bio. Mar. N. S.* 30: 633-640.
- GRISCELLI, C.; DURANDY, A.; GUY-GRAND, D.; DAGUILLARD, F.; HERZOG, C. & PRUNIERAS, M. - 1978. A Syndrome Associating Partial Albinism and Immunodeficiency. *Amer. J. Med.* 65:691-702.
- HAARER, B. K.; PETZOLD, A.; LILLIE, S. H. & BROWN, S. S. - 1994. Identification of MYO4, a second class V myosin gene in yeast. *J. Cell Sci.* 107:1055-64.
- HASSON, T. & MOOSEKER, M. S. - 1996. Vertebrate Unconventional Myosins. *J. Biol. Chem.*, 271 (28): 16431-16434.
- HIROKAWA, N.; NODA, Y. & OKADA, Y. - 1998. Kinesin and dinein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 60-73.
- HUNTINGFORD, F. A. - 1984. *The Study of Animal Behaviour*. Great Britain, Padstow, Cornwall: T. J. Press (Padstow) Ltd, 412 p.
- JOHNSTON, G. C.; PRENDERGAST, J. A. & SINGER, R. A. - 1991. The *Sacchomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.*, 113, 539-551.
- KERR, W. E.; CUNHA, R. & PISANI, J. F. - 1978. Genética da Determinação do Sexo em Abelhas. XII. Aplicação de Métodos Numéricos para Grupar Sexos e Castas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (APIDAE). *Rev. Brasil. Biol.*, 38 (2) :391-394.

- KERR, W. E. - 1990. Why Are Workers In Social Hymenoptera Not Males?
Rev. Brasil. Genet. **13**, 1, 133-136.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. - 1994. Há Salvação para os Meliponínios? *Anais do 1º Encontro Sobre Abelhas*, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto - SP, **1**: 60-65.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. - 1996. *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 144p.
- KING, S. M. & PATEL-KING, R. S. - 1995. The MR 8000 and 11000 outer arm dynein light chains from *Chlamydomonas flagella* have cytoplasmic homologues. *J. Biol. Chem.* **270**, 11445-11452.
- LAEMMLI, U. K. & FAVRE, M. - 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, **80**:575-599.
- LANGFORD, G. M. - 1995. Actin- and microtubule dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Current Opinion Cell Biol.* **7**: 82-88.
- LANGFORD, G. M.; MOLYNEAUX, B. J. - 1998. Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Research Reviews* **28**, 1-8.
- LARSON, R. E., ESPINDOLA, F. S. & ESPREÁFICO, E. M. - 1990. Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J. Neurochemistry.*, **54**, (4): 1288-1294.
- LARSON, R. E. - 1996. Myosin-V: a class of unconventional molecular motors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**: 309-318.
- LIMA, A. B. P.; COLETTI, A. C. S.; KERR, W. E. & ESPINDOLA, F. S. - 1999. Identificação de Miosina-V em Sistemas Nervoso e Reprodutor de *Melipona scutellaris Latreille* (MELIPONINAE, APIDAE). *Genetics and Molecular Biology*, **22**, (3), supplement.
- LIMA, A. B. P. - 2000. Identificação de Miosina-V em Tecidos Nervoso, Endócrino e Cardíaco de *Calomys callosus*. Universidade Federal de Uberlândia, 25 p. - Monografia apresentada no Curso de Ciências Biológicas.
- MacIVER, B.; McCORMACK, A.; SLEE, R. & BOWNES, M. - 1998. Identification of an essential gene encoding a class-V unconventional myosin in *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* **257**, 529-537.

- MEHTA, A. D.; RIEF, M.; SPUDICH, J. A.; SMITH, D. A.; SIMMONS, R. M. - 1999. Single-Molecule Biomechanics with Optical Methods. *Science*, **283**, 1689-1695.
- MEHTA, A. D.; ROCK, R. S.; RIEF, M.; SPUDICH, J. A.; MOOSEKER, M. S. & CHENEY, R. E. - 1999. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Science*, **283**, 1689-1695.
- MERCER, J. A.; SEPERACK, P.K.; STROBEL, M.C.; COPELAND, N.G. & JENKINS, N.A. - 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* **349**: 709-13.
- MERMALL, V.; POST, P. L. & MOOSEKER, M. S. - 1998. Unconventional Myosins in Cell Movement, Membrane Traffic and Signal Transduction. *Science*, **279**: 527-533
- MICHENER, M.H. - 1944. Comparative external morphology, phylogeny and a classification of the bees (Hymenoptera). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, **82** (6):151-326.
- MICHENER, V. & MICHENER, M.H. - 1951. *American Social Insects*, 267 p. (New York: van Nostrand).
- MICHENER, M.H. - 1965. Classification of bees of the Australian and South Pacific regions. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, **130**:1-362.
- MOLYNEAUX, B. J. & LANGFORD, G. M. - 1997. Squid myosin V transport organelles in nerve cells. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 371A.
- MOOSEKER, M. S & CHENEY, R. E. - 1995. Unconventional Myosins. *Annual Rev. Cell Develop. Biol.*, **11**: 633-675.
- NASCIMENTO, A.A.C.; CHENEY, R.E.; TAUHATA, S.B.F.; LARSON, R.E. & MOOSEKER, M.S. - 1995. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J. Biol. Chemistry*, **29**: 17561-17569.
- PASTURAL, E.; BARRAT, F. J.; LAGELOUSE, R. D.; CERTAIN, S.; SANAL, O.; JABADO, N.; SEGER, R.; GRISCELLI, C.; FISCHER, A. & BASILE, G. S. - 1997. Griscelli Disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the Myosin-Va gene. *Nature Gen.*, **16**:289-292.
- PAZOUR, G. J.; WILKERSON, C. G. & WITMAN, G. B. - 1998. A Dynein Light Chain is Essential for the Retrograde Particle Movement of Intraflagellar Transport (IFT). *J. Cell Biol* **141**, 979-992.

- POSEY, D. A. - 1986. Etoentomologia de Tribos Indígenas da Amazônia in Darcy Ribeiro (Ed.), Berta G. Ribeiro (Coord.), *Suma Etnológica Brasileira*, 1; 14: 251-271.
- RECK-PETERSON, S. L.; PROVANCE JR, D. W.; MOOSEKER, M. S. & MERCER, J. A. - 2000. Class V Myosins. *Biochem. Biophys. Acta.* 1496(1):36-51.
- ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. & WINSTON, M. L. - 1997. Insect societies and the molecular biology of the social behavior. *BioEssays*, vol. 19, n° 12. 1099:1108.
- SANDERS, G.; LICHTER, B.; MEYER, H.E. & KILIMANN, M.W. - 1992. cDNA encoding the chicken ortholog of the mouse *dilute* gene product. *FEBS Lett.* 311:295-98
- SMALL, V. J., ROTTNER, K. & KAVERINA, I. - 1999. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 11 (1):54-60, Review.
- SNODGRASS, R. E. - 1956. *Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publ. Ass. N.Y., USA.
- SOLC, C. K.; DERFLER, B.H.; DUYK, G. M. & COREY, D. P. - 1994. Molecular cloning of myosins from the bullfrog saccular macula: a candidate for the hair cell adaptation motor. *Audit. Neurosci.* 1:63-75.
- SPUDICH, J. A. - 1994. How molecular motors work. *Nature*, 372:515-18.
- TITUS, M. A. - 1993. From Fat Yeast and Nervous Mice to Brain Myosin-V. *Cell*, Vol. 75, 9-11.
- TITUS, M. A. - 1997. Motor Proteins: Myosin-V - the multi-purpose transport motor. *Curr. Biol.*, 7(5): 301-304.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. - 1979. Eletroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76: 4350-4354.
- VEIGEL, C., COLUCCIO, L. M., JONTES, J. D., SPARROW, J. C., MILLIGAN, R. A. & MOLLOY, J. E. - 1999. The Motor Protein Myosin-I Produces Its Working Stroke In Two Steps. *Nature*, 398, 8 April.
- ZHAO, L. P.; KOSLOVSKY, J. S.; REINHARD, J.; BÄHLLER, M.; WITT, A. E.; PROVANCE, D. W. & MERCER, J. A. - 1996. Cloning and characterization of myr6, an unconventional myosin of the dilute/myosin family. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 10826-10831.

- WU, X.; BOWERS, B.; RAO, K.; WEI, Q. & HAMEER, J. A. - 1998. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggest a paradigm for myosin-V function *in vitro*. *J.Cell Biol.*, 143:1899-1918.
- WU, X.; JUNG, G. & HAMEER, J. A. - 2000. Functions of unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol.*, 12 (1):42-51.

IX
ANEXO

TABELA 4 - Conversão de medidas no Microscópio Estereoscópio Leica - Wild Typ 308700, Heerburgg, Switzerland.

Aumento	Unidade Ocular
6.4	1U.O. = 0.72 mm
10	1U.O. = 1.01 mm
16	1U.O. = 0.61 mm
25	1U.O. = 0.37 mm
40	1U.O. = 0.24 mm

TABELA 5 - Medidas do Diâmetro maior das vesículas seminais dos machos da *Melipona scutellaris*. Aumento estereoscópio utilizado: 16, (ver anexo 3, tabela de conversão para escala em milímetros).

MEDIDA	PRIMEIRA VESÍCULA	SEGUNDA VESÍCULA	MEDIDA	PRIMEIRA VESÍCULA	SEGUNDA VESÍCULA
1	0.55	0.5	17	0.7	0.7
2	0.9	0.8	18	0.5	0.5
3	0.9	0.9	19	0.65	0.7
4	0.8	0.8	20	0.65	0.65
5	0.7	0.7	21	0.62	0.6
6	0.8	0.8	22	0.6	0.6
7	0.75	0.8	23	0.6	0.6
8	0.65	0.65	24	0.62	0.6
9	0.5	0.55	25	0.6	0.6
10	0.6	0.6	26	0.6	0.6
11	0.65	0.6	27	0.72	0.7
12	0.65	0.65	28	0.7	0.8
13	0.6	0.6	29	0.55	0.7
14	0.6	0.6	30	0.7	0.65
15	0.63	0.7			
16	0.5	0.5			
			MÉDIA	0.6556	

TABELA 6 - Medidas do comprimento dos ovários atrofiados das operárias da *Melipona scutellaris*. Aumento utilizado no microscópio estereoscópio: 16 (ver anexo 3, tabela de conversão para escala em milímetros).

MEDIDA	COMPRIMENTO DO OVÁRIO	MEDIDA	COMPRIMENTO DO OVÁRIO
1	6.3	12	5.6
2	5.8	13	5.7
3	6.7	14	5.7
4	6.1	15	6.7
5	5.4	16	6.0
6	5.0	17	5.0
7	5.5	18	4.7
8	5.7	19	5.0
9	5.3	20	5.8
10	5.0		
11	5.8		
		MÉDIA	5.37

TABELA 7 - Medidas do Diâmetro maior das espermatecas das rainhas virgens de *Melipona scutellaris*. Aumento utilizado no microscópio estereoscópio: 16 (ver anexo 3, tabela de conversão para escala em milímetros).

MEDIDA	ESPERMATECA	MEDIDA	ESPERMATECA
1	1.0	17	1.1
2	1.0	18	1.15
3	1.2	19	1.2
4	1.1	20	1.0
5	1.15	21	1.1
6	1.15	22	1.1
7	1.05	23	1.2
8	1.05	24	1.1
9	1.0	25	1.15
10	1.1	26	1.0
11	1.1	27	1.1
12	1.1	28	1.2
13	1	29	1.2
14	1.1	30	1.2
15	1.15	MÉDIA	1.11
16	1.2		

TABELA 8 - Medidas da largura dos cérebros das operárias, rainhas virgens e dos machos de *Melipona scutellaris*. Aumento utilizado no microscópio estereoscópio: 16 (ver anexo 3, tabela de conversão para escala em milímetros).

MEDIDA	OPERÁRIA	RAINHA	MACHO
1	6.8	5.0	6.0
2	6.8	5.5	6.0
3	6.7	5.0	5.5
4	6.8	5.3	6.0
5	6.5	5.3	5.6
6	6.4	5.4	5.7
7	6.3	4.8	5.2
8	6.6	5.2	5.9
9	6.4	5.3	5.5
10	6.8	5.3	5.8
11	6.3	5.3	6.0
12	6.3	5.5	5.9
13	6.8	5.5	5.9
14	6.5	5.2	5.8
15	6.6	5.2	5.8
16	6.2	5.4	5.9
17	6.2	5.4	5.7
18	6.3	5.1	6.0
19	6.7	5.3	5.6
20	6.3	5.1	5.6
	6.7	5.1	6.2
	6.4	5.1	5.8
	6.5	5.2	5.8
	6.7	5.1	5.8
MÉDIA	6.6	5.23	5.795

X
ANEXO

TABELA 9 - Padrões de massa molecular adquiridos da Sigma (SDS - 6H). Além dos polipeptídeos presentes por frasco do produto, foi adicionado calmodulina purificada (16.8 kDa).

205 kDa	Cadeia pesada da Miosina-II de músculo de coelho
116 kDa	β -Galactosidase <i>E. coli</i>
97 kDa	Fosforilase b de músculo de coelho
66 kDa	Albumina bovina
45 kDa	Ovoalbumina
29 kDa	Anidrase Carbônica de Eritrócito bovino
16.8 kDa	Calmodulina

TABELA 10 - Padrões de massa molecular adquiridos da Sigma (SDS - 7B).

180 kDa	α 2 macroglobulina
116 kDa	β -galactosidase
84 kDa	frutose 6 fosfato
58 kDa	piruvato quinase
48.5 kDa	Fumarose
36.5 kDa	lactato desidrogenase
26.6 kDa	Triosifosfato isomerase

XI

ÍNDICE REMISSIVO

- A**
- abelhas indígenas sem ferrão 17
- actina 9, 12, 14, 15, 48 e 52
- albinismo 15
- alfa hélice 11 e 12
- análise densitométrica 12, 40 e 42
- análise Filogenética 2 e 13
- anticorpos 11, 12, 15, 27, 28, 29, 40, 50 e 52
- Apidae 17, 55, 58, 59 e 60
- Apinae 17
- Apis mellifera* 2, 6, 7, 8 e 29
- Apoidea 17
- ATP 3, 9, 12, 24, 40 e 52
- B**
- Bradford 24, 25 e 56
- BSA 3, 24 e 25
- Bursa Copulatrix 8 e 35
- C**
- cadeia leve 2, 3, 12, 13, 14, 16, 20, 27, 29, 43, 46, 47, 48, 50 e 52
- cadeia leve de dineína 2, 14, 20, 27, 29, 43, 46, 48, 50 e 52
- cadeia pesada 14, 27, 28, 29, 44, 48 e 69
- células Kenyon 5
- cérebro 1, 2, 3, 5, 6, 11, 12, 24, 32, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 50, 52, 57 e 67
- Chapada Diamantina 22
- cinesinas 9, 10 e 52
- citoesqueleto 9 e 52
- citoplasma 9
- classe Insecta 5
- CLD 3, 12, 13, 14, 20, 27, 28, 40, 43, 45, 46, 48 e 50
- Comassie Brilliant Blue 26
- comportamento 5, 6, 34, 38 e 57
- comunicação 5, 6 e 57
- corpora pedunculata/corpos pareados em forma de cogumelo 5, 38 e 39
- D**
- Dietrich 23, 30 e 34
- dilute* 11, 16, 58, 59, 61, 62, 63 e 64
- dímero 10, 11 e 14
- dineína 2, 3, 9, 12, 14, 16, 20, 27, 29, 43, 46, 48, 50, 52 e 54
- dissecação 23, 34, 35 e 37
- DNA polimerases 9 e 10
- DNA 9, 10 e 63
- domínio cabeça 12, 28 e 41
- domínio cauda 11, 12 e 14
- domínio pescoço 13
- dosagem de proteína 24
- Drosophila melanogaster* 16, 45, 52, 56 e 61
- E**
- ecossistemas 18
- EDTA 3 e 26
- EGTA 3 e 24
- eletroforese 3, 26, 44 e 54
- espermateca 1, 7, 8, 32, 35, 36 e 67
- etnoentomologia 5 e 63
- F**
- filamentos intermediários 9
- G**
- Gallus gallus* 11, 40, 47, 50 e 54
- gânglio abdominal 36
- gânglio torácico 36
- gânglios 15 e 38

- H**
- HEPES 3 e 24
- hialotecnia 30
- hibridização *in situ* 16 e 45
- hidrólise do ATP 13
- Himenópteros sociais 5 e 47
- homogeinização 40
- homologia 2, 12 e 13
- Hymenoptera 5, 60 e 62
- I**
- imunoblot 2, 40, 41, 43, 44, 46 e 50
- imunodeteção 2, 28, 40, 42, 44, 45, 47, 50 e 52
- imunolocalização 12, 15 e 50
- inseminação instrumental 8, 30 e 37
- insetos sociais 5, 38 e 50
- K**
- Kayapó 5
- L**
- lóbulo ótico 6 e 32
- M**
- machos 1, 2, 20, 22, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 39, 41, 43, 46, 50, 52, 66 e 67
- manejo racional 22
- mecanoenzimas 9
- melanócitos 16
- Melipona scutellaris* 1, 2, 16, 17, 18, 20, 22, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 49, 50, 52, 54, 56, 57, 61, 66, 67 e 68
- Meliponário Uberlândia 22 e 29
- Meliponinae 17, 59 e 61
- meliponíneos 18
- Meliponini 17 e 56
- membrana de nitrocelulose 27, 41 e 44
- microscópio estereoscópio 1, 31, 34, 66 e 67
- microtúbulos 9, 15, 52 e 54
- Miosina-II 13, 14 e 69
- miosinas não-convencionais 10 e 11
- miosinas 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 45 e 52
- Miosina-V 2, 3, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 27, 28, 29, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 52, 57, 61 e 69
- morfometria 37 e 50
- motivos IQ 3, 11 e 13
- motores moleculares 9, 18 e 52
- myo2 3, 11 e 59
- myo4 3, 11 e 59
- myr6 3 e 11
- O**
- ocelo 6 e 36
- olho composto 6
- ordem Hymenoptera 5
- organelas 9, 10, 11, 14, 15, 40 e 52
- ovário 7, 31, 35, 36, 44, 45, 50 e 68
- ovariolos 7 e 8
- oviduto 7, 8 e 35
- óxido nítrico-sintetase 14
- P**
- pênis 7, 34 e 35
- perfusão 30 e 50
- pintainho 11, 44, 46, 47 e 50
- plasticidade cerebral 38
- PMSF 3 e 40
- proteínas totais 40 e 44
- Q**
- queratinócitos 16
- quimioluminescência 27, 28 e 44

R

rainhas virgens 20, 22, 29, 31, 34, 35, 37, 41,
43, 44, 46, 50 e 52
RNA 9 e 10

S

SDS 6H 69
SDS 7B 69
SDS 1, 3, 26, 27, 41, 46 e 69
sedimento 2, 24, 40, 41, 43, 44, 45 e 46
sinais de transdução 10 e 40
Síndrome de Griscelli 16
sistema nervoso 2, 5, 6, 9, 31, 32, 34, 38, 47 e
50
sistema reprodutor 7, 8, 31, 32, 34, 35, 37, 45,
46, 50 e 52
sistemas de armadilhas óticas 10 e 15
sobrenadante 2, 24, 40, 41, 43, 44, 45 e 46
soroalbumina bovina 24

T

tampão de homogeneização 24, 25 e 40
TBS 3, 28 e 29
Teste de Tukey 1, 32 e 37
Teste F 32
testículos 7
Tris 3, 26 e 27

U

Urnu do Nordeste 16 e 52

V

vesículas seminais 1, 32, 34, 37, 38 e 66

W

Western Blot 20, 26, 42, 52 e 54

Z

Zona da Mata 16